

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091573** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.08

(51) Int. Cl. *A01H 5/10* (2018.01)
A01H 6/46 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.21

(54) ЯЧМЕНЬ С ПОВЫШЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

(31) 17210964.7

(32) 2017.12.28

(33) EP

(86) PCT/EP2018/086733

(87) WO 2019/129739 2019.07.04

(71) Заявитель:
КАРЛСБЕРГ А/С (DK)

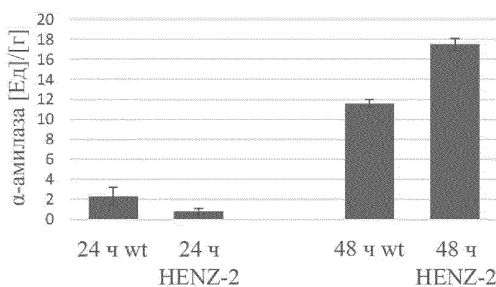
(72) Изобретатель:

Доктер Кристоф, Педас Пай Росагер,
Кнудсен Сорен, Олсен Оле, Марри
Лусиа, Крусевич Катаржина, Лок
Финн, Вендт Тони, Карчиофи
Массималлано, Томсен Ханне,
Расмуссен Магнус (DK)

(74) Представитель:

Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Глухарёва А.О., Строкова О.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к растениям ячменя с высокой активностью α -амилазы. Растения ячменя по настоящему изобретению могут, например, нести мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене HRT, в гене HBL12 и/или в гене WRKY38. Настоящее изобретение также относится к продуктам растительного происхождения, полученным из указанных растений ячменя.



A1

202091573

202091573

A1

ЯЧМЕНЬ С ПОВЫШЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

ОПИСАНИЕ

Уровень техники настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к растениям ячменя с повышенной активностью гидролитических ферментов. В частности, растения ячменя по настоящему изобретению могут характеризоваться повышенной активностью гидролитических ферментов на ранних стадиях прорастания.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

В случае промышленных способов солодования зерна ячменя проращивают или осолаживают в контролируемых условиях, при которых обеспечивается частичная мобилизация запасов крахмала и белка крахмалистого эндосперма в течение периода, составляющего 4-6 дней. Процесс солодования обычно инициируют путем погружения сухого зерна ячменя в воду. Этот процесс известен как замачивание, при котором целью является не только очистка зерна, но также увеличение влагосодержания до приблизительно 40% (вес/вес) с тем, чтобы последующая стадия мобилизации содержимого эндосперма происходила быстрее. В ходе замачивания для обеспечения повторной аэрации зерна воду один раз сливают. Эта стадия известна как «воздушная пауза» и считается необходимой в первую очередь потому, что погруженное зерно спустя приблизительно 16 ч становится обедненным на кислород. После «воздушной паузы» в течение приблизительно 8 ч, зерно повторно погружают в воду для завершения обработки путем замачивания в течение еще 8 ч или в ходе серий стадий повторного замачивания. Двухстадийный процесс замачивания с целью увеличения влагосодержания сухого зерна до 40% или выше занимает суммарно приблизительно 32 ч.

Замоченное зерно раскладывают для прорастания, в ходе которого ферменты, выделяемые клетками алейронового слоя и эпителиальными клетками щитка, наряду с таковыми, которые уже существуют в клетках крахмалистого эндосперма, разрушают клеточные стенки, крахмал и белок. В нормальных условиях прорастания фитогормон гибберелловая кислота (GA), как полагают, синтезируется в области узла, или в другом участке зародыша, откуда она диффундирует по движению воды.

Задачей солодовщика обычно является быстрая индукция синтеза как можно большего количества разрушающих крахмал ферментов в зернах. Согласно множеству режимов солодования GA можно добавлять для ускорения процесса выделения ферментов из алейронового слоя. Разрушающие крахмал ферменты, которые включают α - и β -амилазы, расщепляющие крахмал деветвящие ферменты (например, предельная декстриназа) и α -глюкозидазы, частично деполимеризируют запасы крахмала зерна до моносахаридов, олигосахаридов и глюкозы. Продукты деполимеризации крахмала впоследствии потребляются дрожжевыми клетками в качестве источника углерода и сбрасываются с образованием этанола в составе пива.

α -амилазы играют ключевую роль в разрушении крахмала в эндосперме. У злаковых растений экспрессия α -амилаз подвергается четкой регуляции. У ячменя дикого типа наблюдается очень небольшой уровень экспрессии генов α -амилазы в ходе роста и созревания эндосперма, что согласуется с обширным накоплением крахмала в ходе этого периода. В ходе прорастания активность α -амилазы повышается. Четкая регуляция активности α -амилазы важна, поскольку аберрантная активность α -амилазы может повлечь за собой серьезные последствия для здоровья растения. Например, у определенных разновидностей ячменя может происходить преждевременное прорастание. Это может быть ассоциировано с ростом побега и корня, высокой продукцией α -амилазы и высыханием зерна в состоянии спелости (Green et al., 1997). Также было обнаружено, что активность α -амилазы, по сравнению с нормальными зёрнами, в высохших зёрнах зачастую повышена (Green et al., 1997). В случае ячменя cv. Himalaya, несущего мутацию *sln1*, также стабильно наблюдали как преждевременное прорастание, так и высокую продукцию α -амилазы (Green et al., 1997). Сверхэкспрессия генов α -амилазы в развивающемся эндосперме риса приводит к образованию «меловых» зёрен различной степени, т. е. зёрен, содержащих незрелые рыхлоупакованные гранулы крахмала (Nakata et al. 2017).

Солодовщики также пытаются индуцировать выработку высоких уровней ферментов, которые разрушают полисахариды клеточной стенки в зерне ячменя, в частности, (1,3;1,4)- β -глюканы и арабиноксиланы. Не полностью разрушившиеся (1,3;1,4)- β -глюканы могут быть причиной особых затруднений для пивоваров, поскольку они могут экстрагироваться из солода в растворимых формах, образующих высоковязкие водные растворы, которые замедляют процессы фильтрации на пивоваренном заводе и способствуют образованию нежелательной мути в конечном пиве. Таким образом, низкие уровни растворимого (1,3;1,4)- β -глюкана являются важным параметром качества солодования, при этом высокие уровни ферментов (1,3;1,4)- β -глюканаз остаются важными показателями качества солода.

Как отмечалось выше, процесс проращивания обычно занимает приблизительно 4-5 дней. По завершении стадий контролируемого проращивания влажный солод сушат с изменением влагосодержания с приблизительно 40% до 4-5%. Такой процесс сушки, называемый сушкой в печи, является очень энергозатратным, и на его долю приходится основные расходы при производстве. Весь процесс, включая печную сушку, составляет обычно 6-7 дней.

На пивоваренном заводе высушенный в печи солод мелют с целью раскрытия зерна, и полученное в результате содержимое экстрагируют с использованием горячей воды в ходе процесса, известного как затирание. Экстрагированный материал включает частично разрушенный крахмал, белок и молекулы клеточной стенки, как описано выше, и перечисленное далее разрушается под действием эндогенных ферментов зерна, которые были экстрагированы из солода. На этой стадии некоторые пивовары добавляют дополнительные, и, как правило, более дешевые источники углерода (добавки) для содействия последующему процессу дрожжевого брожения и компенсации более высоких затрат на солод. Указанные добавки могут представлять собой ячменную, рисовую, пшеничную муку или виды муки других злаковых из непророщенного зерна, однако их добавление может повлечь за собой необходимость сопутствующего добавления гидролитических ферментов, поскольку количество эндогенных ферментов в солоде для разрушения компонентов добавки является недостаточным. Добавленные ферменты обычно получают из неочищенных и относительно недорогих экстрактов из грибковых и/или бактериальных культур. Добавление экзогенных ферментов не разрешено в некоторых странах, в которых, в частности, пиво должно производиться в строго регулируемых условиях.

Дополнительное разрушение крахмала и других компонентов эндосперма, экстрагируемых в горячей воде, происходит в ходе процесса, известного как осахаривание. После затирания экстракты фильтруют, зачастую в фильтрационном чане, и охлаждают. Экстракт можно кипятить в присутствии хмеля или экстрактов хмеля, и после охлаждения добавляют дрожжевые культуры для сбраживания высвобождаемых сахаров с образованием этанола. Полученное таким образом пиво перед розливом в бутылки подвергается созреванию и фильтрации. Также перед розливом в бутылки пиво можно насыщать углекислым газом.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Как указано выше, одной из стадий производства пива, требующих много времени и энергии, является солодование. Ограничивающей скоростью стадией в процедуре солодования является синтез достаточного количества разрушающих крахмал ферментов в зернах. Следовательно, существует потребность в обеспечении материалами и способами, с помощью которых можно уменьшить промежуток времени, требуемый для солодования. В частности, существует потребность в способах, обеспечивающих прорастание злаковых зерен, содержащих достаточное количество разрушающих крахмал ферментов, вскоре после инициации прорастания.

Однако, как отмечалось выше, высокая активность α -амилазы ассоциирована с нежелательными эффектами в отношении пригодности растения. В частности, высокая активность α -амилазы может быть ассоциирована со сниженным содержанием зернового крахмала и/или предуборочным прорастанием. Предуборочное прорастание представляет собой явление, при котором физиологически зрелые ядра зерен на растении начинают вести себя как прорастающее семя, а не как содержащее крахмал зерно. Предуборочное прорастание характеризуется преждевременным прорастанием зерен перед уборкой урожая с последующими сниженными показателями жизнеспособности семян и конечной ценности. Таким образом, предуборочное прорастание создает условия, при которых ячмень относительно быстро утрачивает жизнеспособность семян, и поскольку для процесса солодования необходимо прорастание, его появление является крайне нежелательным при солодовании культур ячменя. Предуборочное прорастание чаще всего ассоциировано с количеством атмосферных осадков и продолжительной влажной погодой после полного созревания зерна. Активность α -амилазы коррелирует с предвсходным состоянием и преждевременным прорастанием, и ее можно применять в качестве индикатора ущерба вследствие прорастания (Schwarz et al., 2004).

Таким образом, существует потребность в растениях ячменя с высоким уровнем активности разрушающих крахмал ферментов вскоре после инициации прорастания, но которые при этом имеют зерна с высоким содержанием крахмала, которые дают высокий урожай и/или характеризуются низкой частотой предуборочного прорастания.

Настоящее изобретение относится к растениям ячменя с высоким уровнем активности разрушающих крахмал ферментов вскоре после инициации прорастания, в частности, указанные растения ячменя характеризуются высокими уровнями активности α -амилазы и предельной декстриназы. Такие растения ячменя являются особенно пригодными для способов получения напитков на основе зерна злаковых культур с уменьшенным периодом времени прорастания.

Одной из технических задач, решаемых с помощью настоящего изобретения, является обеспечение растениями ячменя с высокой активностью α -амилазы и предельной декстриназы вскоре после инициации прорастания, например, уже спустя 72 ч или даже уже через 48 ч после инициации прорастания, причем растения ячменя в то же время характеризуются приемлемыми агрономическими признаками. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к растениям ячменя, несущим мутацию в гене HRT. Согласно настоящему изобретению неожиданно продемонстрировано, что растения ячменя с потерей функции HRT являются жизнеспособными, обладают надлежащими свойствами с агрономической точки зрения и характеризуются показателями урожайности, сопоставимыми с таковыми в случае других сортов ячменя. В то же время такие растения ячменя характеризуются высокой активностью α -амилазы и предельной декстриназы уже спустя 48 ч после инициации прорастания. Другой технической задачей, решаемой с помощью настоящего изобретения, является обеспечение растениями ячменя с достаточной степенью прорастания даже в условиях с низким содержанием кислорода. Интересно, что применение растений ячменя с потерей функции HRT также позволяет решить эту техническую задачу.

Raventos et al., 1998 описали, что полноразмерный белковый продукт гена *репрессора транскрипции Hv (HvREPRESSOR OF TRANSCRIPTION, HvHRT)* ячменя функционирует как транскрипционный репрессор на ряде разных промоторов, при тестировании с использованием клеток растений после транзientной экспрессии. Транзientная экспрессия обычно обеспечивает уровни экспрессии, которые намного выше, чем естественные уровни экспрессии, и, следовательно, невозможно окончательно определить функцию белка с применением анализов с транзientной экспрессией. В таких искусственных условиях транзientная экспрессия HRT приводит к сниженному уровню экспрессии репортерного гена, который находится под контролем разных промоторов гена α -амилазы (*Amy2* и *Amy1*), а также к сниженному уровню экспрессии с конститутивного промотора CaMV 35S (Raventos et al. 1998). Таким образом, согласно Raventos et al., HRT, белок с тремя ДНК-связывающими доменами, может связываться с разными промоторными последовательностями и влиять на экспрессию с них. Мутант с потерей функции HRT может характеризоваться aberrантной транскрипцией с множества генов. Кроме того, Raventos et al. описывают, что мРНК HRT накапливается в незрелых тканях, например, в незрелых семенах, незрелых зародышах и незрелых эндосперме/алеироновом слое. В отличие от этого, мРНК HRT почти не обнаруживается в слоях прорастающих семян. Исходя из этого, HRT потенциально может быть вовлечен в обеспечение того, что α -амилаза не экспрессируется в некоторые моменты времени в ходе развития ячменя, в

которые высокая активность α -амилазы является нежелательной. Высокая активность α -амилазы в ходе развития растения является нежелательной, поскольку она может нарушать надлежащий налив зерна, может обуславливать сниженное содержание зернового крахмала и приводить к предуборочному прорастанию. Настоящее изобретение демонстрирует, что такие мутанты ячменя при этом являются здоровыми и жизнеспособными. Кроме того, несмотря на то, что Raventos et al. описывают, что мРНК HRT почти не обнаруживается в слоях прорастающих семян, в соответствии с настоящим изобретением наблюдали, что потеря функции HRT приводит к повышенной активности α -амилазы в прорастающих семенах.

Эффект мутации с потерей функции предполагаемого репрессора, как правило, сложно предсказать. Прежде всего, нельзя окончательно предсказать, является ли репрессор фактически репрессором в условиях *in vivo* исходя из исследований с транзientной экспрессией. Кроме того, мутация репрессора может повлиять на множество генов, и, таким образом, эффект невозможно предсказать. Помимо этого, также невозможно предсказать, приведет ли мутация к повышенному уровню экспрессии генов-мишеней. Например, было описано, что KGM обеспечивает специфическую репрессию активности промотора гена альфа-амилазы на уровне функции GAMYB при транзientной трансфекции (Woodger et al., 2003). При этом две разные мутации в кодирующем KGM гене, одна из которых представляла собой мутацию, обуславливающую введение преждевременного стоп-кодона, не приводили к повышенной активности α -амилазы.

В настоящем изобретении дополнительно описана идентификация гена *HBL12* (HomeoBoxLike12) ячменя. Ген ячменя в настоящем документе также обозначается как *HvHBL12*. Mascher et al., 2017, описали секвенирование генома ячменя. Кроме того, Mascher et al., 2017, предоставляют транскриптом модельного cv. ячменя Morex, содержащий в общей сложности 123875 установленных последовательностей. Исходя из этих данных, авторы настоящего изобретения обнаружили, что *HvHBL12* экспрессируется в нескольких тканях, включая зародышевую ткань прорастающего зерна.

Arabidopsis thaliana содержит ген с ограниченной идентичностью последовательностей с *HvHBL12*. Таким образом, ген АТНВ12 (*гомеобокс 12 Arabidopsis thaliana*) *Arabidopsis thaliana* характеризуется приблизительно 70% идентичностью последовательностей ДНК с *HvHBL12*. *ATHB12* представляет собой фактор транскрипции I класса с гомеодоменом и лейциновой застежкой (HD-Zip), обнаруженный и изученный у модельного растения *Arabidopsis thaliana*. Valdés et al. (2012) описали, что экспрессия *ATHB12* индуцируется гормоном АВА. Son et al. (2010) описали, что генный продукт АТНВ12 обеспечивает репрессию вовлеченного в путь биосинтеза GA гена *GA 20-оксидазы*

1 (GA20ox1) в стеблях *Arabidopsis*. Растения *Arabidopsis thaliana* с мутацией с потерей функции АТНВ12 имеют более длинный стебель. Ни Valdés et al., 2012, ни Son et al., 2010, не обсуждают роль АТНВ12 в ходе раннего прорастания.

Как отмечалось выше, одной из технических задач, решаемых с помощью настоящего изобретения, является обеспечение растениями ячменя с высокой активностью α -амилазы и предельной декстриназы вскоре после инициации прорастания, например, уже спустя 72 ч или даже уже через 48 ч после инициации прорастания, причем растения ячменя в то же время характеризуются приемлемыми агрономическими признаками. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к растениям ячменя, несущим мутацию в гене *HvHBL12*. Согласно настоящему изобретению неожиданно продемонстрировано, что растения ячменя с потерей функции *HvHBL12* являются жизнеспособными, обладают надлежащими свойствами с агрономической точки зрения, имеют стебли длины, сопоставимой с таковой у ячменя дикого типа, и характеризуются показателями урожайности, сопоставимыми с таковыми в случае других сортов ячменя. В то же время такие растения ячменя характеризуются высокой активностью α -амилазы и предельной декстриназы уже спустя 48 ч после инициации прорастания. Другой технической задачей, решаемой с помощью настоящего изобретения, является обеспечение растениями ячменя с более низкой чувствительностью к содержанию кислорода и условиям гипоксии в ходе прорастания зерна. Интересно, что применение растений ячменя с потерей функции *HvHBL12* также позволяет решить эту техническую задачу.

Zou et al., 2008, предполагают, что модуляцию экспрессии *Amy32b* осуществляют белковые комплексы, и что относительные количества репрессорных или активаторных комплексов регулируют экспрессию. Zou et al., 2008, также предполагают, что *HvWRKY38* и *ВРВF* могут действовать как транскрипционные репрессоры. Однако эти предположения основаны на данных, полученных в полностью искусственных условиях с применением репортерного гена *GUS* под контролем промотора *Amy32b*. Кроме того, согласно Zou et al., 2008, невозможно предсказать, какие относительные количества репрессора или активатора будут приводить в результате к модуляции экспрессии *Amy32b*. Как отмечалось выше, эффект мутации с потерей функции предполагаемого репрессора, как правило, сложно предсказать.

Как отмечалось выше, одной из технических задач, решаемых с помощью настоящего изобретения, является обеспечение растениями ячменя с высокой активностью α -амилазы и предельной декстриназы вскоре после инициации прорастания, причем растения ячменя в то же время характеризуются приемлемыми агрономическими

признаками. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к растениям ячменя, несущим мутацию в гене *WRKY38*.

Таким образом, согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к растениям ячменя или их части с высокой активностью α -амилазы, причем указанное растение ячменя:

- несет мутацию в гене *HvHRT*, обуславливающую потерю функции HvHRT; и/или
- несет по меньшей мере один ген α -амилазы, содержащий мутантный промотор гена α -амилазы, предусматривающий мутацию в GARE-боксе; и/или
- несет по меньшей мере четыре гена α -амилазы, содержащих GARE-бокс с последовательностью ТААСААА; и/или
- несет по меньшей мере один ген α -амилазы в кластере *amy2*, содержащий мутантный промотор гена α -амилазы, предусматривающий мутацию в GARE-боксе, или который имеет последовательность ТААСААА; и/или
- несет мутацию в гене *HvHBL12*, обуславливающую потерю функции HvHBL12; и/или
- несет по меньшей мере четыре гена α -амилазы, содержащих промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, причем указанный нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс содержит последовательность (TGAC(C)_n(X)_mTTGACC), причем один или несколько из конкретных нуклеотидов были заменены или удалены, и причем X может представлять собой любой нуклеотид, n равняется 0 или 1 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20; и/или
- несет по меньшей мере один ген α -амилазы в кластере *amy2*, содержащий промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс;
- несет мутацию в гене *WRKY38*, обуславливающую потерю функции *WRKY38*.

Описание чертежей

На фиг. 1 показан % пророщенных зерен cv. Paustian (wt) и мутанта HENZ-2 ячменя после проведения стандартного теста на прорастание в присутствии либо 4 мл (столбцы слева), либо 8 мл (столбцы справа) воды.

На фиг. 2 показано содержание воды в зерне для зерен cv. Paustian (wt) и мутанта HENZ-2 ячменя после выдержки в течение 24 ч и 48 ч в воде с потоком воздуха 90 л/ч на кг сухого веса зерен ячменя.

На фиг. 3 показаны уровни экспрессии генов для мРНК α -амилазы, кодируемой генами α -амилазы кластера *amy1_1* (2 столбца слева), кластера *amy1_2* (2 средних столбца) и мРНК BGL2A+BGL2B (2 столбца справа – обозначено как «BGL2A»), определенные с помощью ddPCR у cv. Paustian (wt) и мутанта HENZ-2 ячменя после выдержки в течение 48 ч в воде с потоком воздуха 90 л/ч на кг сухого веса зерен ячменя.

На фиг. 4 показана активность α -амилазы (фиг. 4A), активность β -амилазы (фиг. 4B) и активность предельной декстриназы (фиг. 4C) у cv. Paustian (wt) и мутанта HENZ-2 ячменя после выдержки в течение 24 ч и 48 ч в воде с потоком воздуха 90 л/ч на кг сухого веса зерен ячменя.

На фиг. 5 показана активность α -амилазы (фиг. 5A), активность β -амилазы (фиг. 5B) и активность предельной декстриназы (фиг. 5C) в зернах cv. Paustian (wt) и мутанта HENZ-2 ячменя, которые подвергали лущению и выдерживали в течение 24 ч в воде (24 ч) или в течение 24 ч в воде и 24 ч на воздухе (48 ч) с потоком воздуха 90 л/ч на кг сухого веса зерен ячменя в ходе указанной выдержки.

На фиг. 6 показан % пророщенных зерен cv. голозерного ячменя 1 (wt) и мутанта HENZ-10 ячменя после проведения стандартного теста на прорастание в присутствии либо 4 мл (столбцы слева), либо 8 мл (столбцы справа) воды.

На фиг. 7 показаны уровни экспрессии генов для мРНК α -амилазы, кодируемой генами α -амилазы кластера *amy1_1*, кластера *amy1_2*, мРНК предельной декстриназы (LD), мРНК AGL97, мРНК BGL2A и мРНК BGL2B, определенные с помощью ddPCR у cv. голозерного ячменя 1 (wt) и мутанта HENZ-10 ячменя спустя 48 ч выдержки в воде.

На фиг. 8 показаны уровни экспрессии генов для мРНК α -амилазы, кодируемой генами α -амилазы кластера *amy1_1*, кластера *amy1_2*, мРНК предельной декстриназы (LD) и мРНК BGL2A у cv. голозерного ячменя 1 (wt) и мутанта HENZ-10 ячменя после выдержки в воде с потоком воздуха 90 л/ч на кг сухого веса зерен ячменя, определенные с помощью ddPCR.

На фиг. 9 показана активность α -амилазы (фиг. 9A), активность β -амилазы (фиг. 9B) и активность предельной декстриназы (фиг. 9C) у голозерного ячменя 1 (wt) и мутанта

HENZ-10 ячменя после выдержки в течение 24 ч и 48 ч в воде с потоком воздуха 90 л/ч на кг сухого веса зерен ячменя.

На фиг. 10 показана высота растения голозерного ячменя 1 (wt) и мутанта HENZ-10 ячменя после культивации на поле в одинаковых условиях.

На фиг. 11 показаны результаты выравнивания частей промотора гена α -амилазы, содержащего регуляторные боксы из разных генов α -амилазы кластеров *amy1_1* и *amy1_2*, а также из *amy1_1* мутанта HENZ-43 (фиг. 11A), а также из генов α -амилазы кластера *amy2* (фиг. 11B). Мутация мутанта HENZ-43 отмечена #.

На фиг. 12 показан пример оборудования, пригодного для получения зеленого солода. Оборудование включает чан (2), в котором зерна могут быть погружены в водный раствор и непрерывно подвергаться аэрации. Оборудование включает входное отверстие для зерен ячменя (1), чан, например замочный чан (2); входные отверстия для газа, например аэрационные камни из спеченной нержавеющей стали (3); насос, например воздушный насос (4); выходное отверстие для зерен ячменя (5); насос для перекачки зерна (6); оборудование для тонкого измельчения зерен ячменя, например мельницу (7); входное отверстие (8); емкость, например емкость для затирания (9), и выходное отверстие (10).

На фиг. 13 показана активность α -амилазы в зернах ячменя, прорастающих в погруженном в воду состоянии с потоком воздуха 9 л/ч, спустя 48 ч и 72 ч после начала прорастания. На фиг. 13A показана активность α -амилазы мутанта HENZ-2 ячменя и контрольных гомозиготных растений ячменя (WT), тогда как на фиг. 13B показана активность α -амилазы мутанта HENZ-10 ячменя и голозерного ячменя 1 дикого типа (wt).

На фиг. 14 показана активность α -амилазы в зернах ячменя, прорастающих в погруженном в воду состоянии без потока воздуха, спустя 24 ч, 48 ч и 72 ч после начала прорастания у мутанта HENZ-10 ячменя и голозерного ячменя 1 дикого типа (wt).

На фиг. 15 показана активность α -амилазы в зернах ячменя, прорастающих в погруженном в воду состоянии без потока воздуха, спустя 72 ч после начала прорастания. На верхней панели фиг. 15 показана активность α -амилазы мутанта HENZ-2а ячменя и ячменя дикого типа cv. Planet, на средней панели фиг. 15 показана активность α -амилазы

мутанта HENZ-54 ячменя и ячменя дикого типа cv. Planet и на нижней панели фиг. 15 показана активность α -амилазы мутанта HENZ-43 ячменя и ячменя дикого типа cv. Planet.

На фиг. 16 показаны уровни экспрессии генов для мРНК α -амилазы, кодируемой генами α -амилазы кластера *amy1_1* (фиг. 16A), геном *amy1_2* (фиг. 16B) и генами кластера *amy2* (фиг. 16C), определенные с помощью RT ddPCR в прорастающих зернах мутанта HENZ-2 ячменя и контрольных гомозиготных растений ячменя (WT) спустя 0, 12 ч, 24 ч и 48 ч после начала прорастания.

На фиг. 17 показаны уровни экспрессии генов спустя 72 ч для мРНК α -амилазы, кодируемой генами α -амилазы кластера *amy1_1*, определенные с помощью RT ddPCR в прорастающих зернах мутанта HENZ-2а ячменя и ячменя дикого типа cv Planet (фиг. 17A), мутанта HENZ-54 ячменя и ячменя дикого типа cv Planet (фиг. 17B) и мутанта HENZ-43 ячменя и ячменя дикого типа cv Planet (фиг. 17C).

На фиг. 18 показаны уровни экспрессии генов спустя 72 ч прорастания для мРНК α -амилазы, кодируемой генами α -амилазы кластера *amy1_2* (фигуры 18A, 18B и 18C) и кластера *amy2* (фиг. 18D), определенные с помощью RT ddPCR в прорастающих зернах мутанта HENZ-2а ячменя и ячменя дикого типа cv Planet (фиг. 18A), мутанта HENZ-54 ячменя и ячменя дикого типа cv Planet (фиг. 18B) и мутанта HENZ-43 ячменя и ячменя дикого типа cv Planet (фигуры 18C и 18D).

На фиг. 19 показаны уровни экспрессии спустя 72 ч мРНК предельной декстриназы, определенные с помощью RT ddPCR в прорастающих зернах мутанта HENZ-2а ячменя и ячменя дикого типа cv Planet (верхняя панель), мутанта HENZ-54 ячменя и ячменя дикого типа cv Planet (средняя панель) и мутанта HENZ-43 ячменя и ячменя дикого типа cv Planet (нижняя панель).

На фиг. 20 показаны уровни экспрессии генов спустя 72 ч для гена *Bgl2*, определенные с помощью RT ddPCR в прорастающих зернах мутанта HENZ-2а ячменя и ячменя дикого типа cv Planet (фиг. 20A), мутанта HENZ-54 ячменя и ячменя дикого типа cv Planet (фиг. 20B) и мутанта HENZ-43 ячменя и ячменя дикого типа cv Planet (фиг. 20C).

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Определения

В контексте настоящего документа форма единственного числа может означать «один или несколько», в зависимости от контекста, в котором она применяется.

В контексте настоящего документа термин « α -амилаза» относится к ферменту с активностью α -амилазы. В частности, α -амилаза в соответствии с настоящим изобретением представляет собой фермент, способный катализировать эндогидролиз (1 \rightarrow 4)- α -D-гликозидных связей в полисахаридах, содержащих три или более (1 \rightarrow 4)- α -связанных D-глюкозных звеньев. Активность α -амилазы можно определять с помощью K-CERA 01/12 (протокол и набор доступны от Megazyme, Ирландия).

Термин «добавка» в контексте настоящего документа относится к источникам сырья с высоким содержанием углерода, добавляемым в ходе получения пива. Добавка может представлять собой непроросшее злаковое зерно, которое может быть перемолото вместе с пророщенными зёрнами, полученными в соответствии с настоящим изобретением. Добавка также может представлять собой сироп, сахар и т. д.

Термин «примерно» в случае применения в настоящем документе по отношению к числовым значениям предпочтительно означает $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, еще более предпочтительно $\pm 1\%$.

Термин «аминокислота» в контексте настоящего документа относится к протеиногенной аминокислоте. Предпочтительно протеиногенные аминокислоты представляют собой одну из 20 аминокислот, кодируемых в соответствии со стандартным генетическим кодом. Для названия аминокислот применяются одно- и трехбуквенные коды согласно IUPAC.

Выражение «аминокислота, соответствующая X» применяется в настоящем документе для описания аминокислот данного полипептида (например, мутантного полипептида HRT, HBL12 или WRKY38) по отношению к аминокислотам эталонного полипептида (например, любого из полипептидов SEQ ID NO:2, 6, 11 или 12). Согласно выравниванию указанного полипептида и эталонного полипептида, аминокислота соответствует X, если она находится в том же положении, что и X при указанном выравнивании.

Термин «амилоза» относится к гомополимерам α -D-глюкозы. Амилоза имеет линейную молекулярную структуру, поскольку глюкозные звенья в ее составе почти исключительно связаны α -1-4-гликозидными связями.

Термин «амилопектин» относится к гомополимерам α -D-глюкозы. Молекулы амилопектина содержат частые α -1-6-гликозидные связи. Они вносят точки ветвления в α -1-4-связанные цепи глюкозы, что приводит в результате к тому, что кластеры параллельных цепей обнаруживаются через равные промежутки вдоль оси молекулы.

Термин «ячменная мука» в контексте настоящего документа относится к молотым ядрам зерна ячменя.

Термин « β -амилаза» относится к ферменту, катализирующему гидролиз (1->4)-альфа-D-гликозидных связей в полисахаридах с удалением последовательных мальтозных звеньев с невозстанавливаемых концов цепей. Активность β -амилазы можно определять с помощью К-ВЕТА3 (протокол и набор доступны от Megazyme, Ирландия).

Термин «побег» в контексте настоящего документа относится к растущей почке зародыша, видимой в ходе фазы прорастания злакового зерна.

В контексте настоящего документа термин «высокая урожайность» относится к урожайности, сопоставимой с урожайностью высокоурожайных сортов ячменя. В частности, «высокая урожайность» может представлять собой урожайность, которая составляет по меньшей мере 95%, как, например, по меньшей мере 98%, например, по меньшей мере 100% от урожайности растения ячменя cv. Planet, выращенного в аналогичных условиях.

Термин «ячмень» в контексте процесса изготовления напитков на основе ячменя, таких как пиво, в частности, в случае применения для описания процесса солодования, означает ядра зерен ячменя. Во всех остальных случаях, если не указано иное, «ячмень» означает растение ячменя (*Hordeum vulgare*, L.), включая любую линию скрещивания, или сорт, или разновидность, тогда как часть растения ячменя может представлять собой любую часть растения ячменя, например, любую ткань или клетки.

«Злаковое» растение, как определено в настоящем документе, является членом семейства растений Poaceae, культивируемых главным образом для получения их крахмал-содержащих семян или ядер зерен. Злаковые растения включают без ограничения ячмень (*Hordeum*), пшеницу (*Triticum*), рис (*Oryza*), маис (*Zea*), рожь (*Secale*), овес (*Avena*), сорго (*Sorghum*) и тритикале, гибрид ржи и пшеницы.

Под «кодирующим» или «кодируемым» в контексте указанной нуклеиновой кислоты подразумевается содержание информации для трансляции в конкретный белок. Кодирование белком нуклеиновая кислота или полинуклеотид могут содержать

нетранслируемые последовательности, например, интроны, в пределах транслируемых областей нуклеиновой кислоты, или у них могут отсутствовать такие промежуточные нетранслируемые последовательности, как, например, в кДНК. Информация, в которой закодирован белок, определяется применением кодонов.

В контексте настоящего документа «экспрессию» по отношению к нуклеиновым кислотам следует понимать как транскрипцию и образование мРНК. Термин «экспрессия», применяемый в контексте белков, относится к трансляции мРНК в полипептид.

Термин «ген» означает сегмент ДНК, вовлеченный в образование полипептидной цепи; он включает области, предшествующие кодирующей области, и расположенные за ней (промотор и терминатор). Кроме того, гены растений, как правило, состоят из экзонов, прерываемых интронами.

Термин «инициация прорастания» в контексте настоящего документа относится к моменту времени, в котором зерна ячменя с содержанием воды менее 15% приводят в контакт с достаточным количеством воды для инициации прорастания.

Термин «солодование» в контексте настоящего документа относится к контролируемому проращиванию ядер зерен злаков (в частности, ядер зерен ячменя), происходящему в контролируемых условиях окружающей среды. Согласно некоторым вариантам осуществления «солодование» может также предусматривать стадию сушки указанных пророщенных ядер зерен злаков, например, с помощью печной сушки.

Термин «пророщенное зерно» в контексте настоящего документа относится к зерну с развившимся видимым ростком и видимым стеблем.

Термин «зеленый солод» в контексте настоящего документа относится к пророщенным ядрам зерен злаков, которые не были подвергнуты стадии печной сушки. В целом указанные ядра зерен злаков были пророщены в контролируемых условиях окружающей среды. Согласно некоторым вариантам осуществления зеленый солод представляет собой молотый зеленый солод.

Термин «высушенный в печи солод» в контексте настоящего документа относится к пророщенным ядрам зерен злаков, которые были высушены с помощью печной сушки. В целом указанные ядра зерен злаков были пророщены в контролируемых условиях окружающей среды. Согласно некоторым вариантам осуществления высушенный в печи солод представляет собой молотый высушенный в печи солод.

Термин «предельная декстриназа» в контексте настоящего документа относится к ферменту, способному катализировать гидролиз (1->6)-альфа-D-гликозидных связей в альфа- и бета-предельных декстринах амилопектина и гликогена, в амилопектине и пуллулане. В частности, предельная декстриназа может представлять собой фермент,

классифицированный как ЕС 3.2.1.142. Активность предельной декстриназы определяют с помощью T-LDZ1000 (протокол и набор доступны от Megazyme, Ирландия).

«Затирание» представляет собой выдерживание молотого солода (например, зеленого солода или высушенного в печи солода) и/или непроросших ядер зерен злаков в воде. Затирание предпочтительно осуществляют при конкретной(-ых) температура(-х) и в конкретном объеме воды.

Термин «молотый» относится к материалу (например, ядрам зерен ячменя или солоду), который был тонко измельчен, например, путем резки, помола, перетирания или дробления. Ядра зерен ячменя можно молоть во влажном состоянии с применением, например, дробилки или мельницы влажного помола. Молотые ядра зерен ячменя или молотый солод являются в достаточной степени тонкоизмельченными с целью придания материалу пригодности для получения водных экстрактов. Молотые ядра зерен ячменя или молотый солод не могут быть регенерированы в интактное растение с помощью большинства биологических способов.

«Мутации» включают делеции, вставки, замены, трансверсии и точечные мутации в кодирующих и некодирующих областях гена. Делеции могут затрагивать весь ген или только участок гена. Точечные мутации могут касаться изменений в отношении одной пары оснований и могут приводить в результате к появлению преждевременных стоп-кодона, мутаций сдвига рамки считывания, мутации сайта сплайсинга или аминокислотным заменам. Предусматривающий мутацию ген может называться «мутантным геном». Если указанный мутантный ген кодирует полипептид с последовательностью, отличающейся от таковой дикого типа, указанный полипептид может называться «мутантным полипептидом». Мутантный полипептид может быть описан как несущий мутацию, если он содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от последовательности дикого типа. Обозначение «XnnnY» указывает на то, что аминокислота или нуклеотид X в положении nnn были замещены Y. Таким образом, например, XnnnStop указывает на то, что кодон, кодирующий аминокислоту X в положении nnn, был замещен стоп-кодоном.

Под термином «продукт растительного происхождения» подразумевается продукт, полученный в результате обработки растения или растительного материала. Таким образом, указанный продукт растительного происхождения может представлять собой, например, зеленый солод, высушенный в печи солод, сусло, получаемый при брожении напитков или напиток, получаемый отличным от сбраживания способом, продукт питания или кормовой продукт.

Под термином «потомство» в контексте настоящего документа подразумевается растение, которое прямо или косвенно является потомком данного растения. Таким образом, потомство не ограничивается прямым потомком, но также включает потомка в ряде множества поколений. В общем случае потомство растения ячменя, несущего конкретную мутацию, также несет такую конкретную мутацию.

Термин «идентичность последовательностей» в контексте настоящего документа относится к % идентичных аминокислот или нуклеотидов между последовательностью-кандидатом и эталонной последовательностью, полученному в результате выравнивания. Таким образом, в случае последовательности-кандидата, характеризующейся 80% аминокислотной идентичностью с эталонной последовательностью, требуется, чтобы в результате выравнивания 80% аминокислот в последовательности-кандидате были идентичны соответствующим аминокислотам в эталонной последовательности. Идентичность в соответствии с настоящим изобретением определяют с помощью компьютерного анализа, такого как, без ограничения, компьютерная программа для выравнивания Clustal Omega для выравнивания полипептидных последовательностей (Sievers et al. (2011 October 11) *Molecular Systems Biology* 7 :539, PMID: 21988835; Li et al. (2015 April 06) *Nucleic Acids Research* 43 (W1) :W580-4 PMID: 25845596; McWilliam et al., (2013 May 13) *Nucleic Acids Research* 41 (Web Server issue) :W597-600

PMID: 23671338, и предложенные в ней параметры по умолчанию. Программное обеспечение Clustal Omega доступно от EMBL-EBI по адресу <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. С применением такой программы с настройками по умолчанию осуществляют выравнивание зрелой (биологически активной) части заданного и эталонного полипептида. Число полностью консервативных остатков подсчитывают и делят на длину эталонного полипептида. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей можно применять алгоритмы MUSCLE или MAFFT. Показатели идентичности последовательностей можно рассчитывать таким же способом, как указано для аминокислотных последовательностей. Таким образом, идентичность последовательностей, как предусмотрено в настоящем документе, рассчитывают по всей длине эталонной последовательности.

Термин «замачивание» в контексте настоящего документа относится к процессу увеличения содержания воды в ядре зерна злаков.

Термин «крахмал» в контексте настоящего документа относится к соединению из одной или обеих из дискретных макромолекул: амилозы и амилопектина.

Термин «сайт сплайсинга» в контексте настоящего документа относится к консенсусным последовательностям, действующим как сплайс-сигналы для процесса

сплайсинга. Мутация сайта сплайсинга представляет собой генетическую мутацию, которая обуславливает вставки, делеции или изменения в отношении некоторого числа нуклеотидов в конкретном сайте, в котором происходит сплайсинг в ходе процесса сплайсинга, т. е. процессинга матричной РНК-предшественницы с образованием зрелой матричной РНК (мРНК). Консенсусные последовательности сайта сплайсинга, которые опосредуют распознавание экзонов, обычно расположены на самых концах интронов.

Термин «стоп-кодон» в контексте настоящего документа относится к триплету нуклеотидов в рамках генетического кода, который, находясь в пределах мРНК, приводит в результате к терминации трансляции. Термин «стоп-кодон» в контексте настоящего документа также относится к триплету нуклеотидов в пределах гена, кодирующему стоп-кодон в мРНК. Стоп-кодон в ДНК обычно характеризуется одной из следующих последовательностей: TAG, TAA или TGA.

Термин «содержание воды» в зерне в контексте настоящего документа относится к % H₂O вес/вес в указанном зерне.

Показатели активности фермента злаковых зерен в контексте настоящего документа относятся к показателям активности, измеряемым в муке, полученной из конкретного типа зерна. Например, 10 Ед/г активности α -амилазы на грамм злакового зерна относится к указанной активности α -амилазы (10 Ед), измеряемой в водном экстракте, полученном из 1 г муки (сухое вещество) из указанного злака.

Объем газа, как указано в настоящем документе, относится к объему указанного газа при 1 атм и 20°C.

Объем O₂, как указано в настоящем документе, относится к объему O₂ при 1 атм и 20°C. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых O₂ содержится в смеси газов, можно определить общий объем смеси газов, а затем можно рассчитать объем O₂ как процентную долю от общего объема, образуемую O₂. В качестве примера, атмосферный воздух содержит 21% O₂. Таким образом, объем O₂ в атмосферном воздухе в контексте настоящего документа составляет 21% от общего объема атмосферного воздуха.

Под термином «сусло» подразумевается жидкий экстракт солода и/или ядер зерен злаков, как, например, молотого солода и/или молотых ядер зерен злаков, и необязательно дополнительные добавки. Сусло в общем случае получают путем затиранья, необязательно с последующим «промыванием дробины», в процессе экстракции остаточных сахаров и других соединений из дробины после затиранья с использованием горячей воды. Промывание дробины обычно выполняют в фильтрационном чане, фильтре для отделения затора или другом устройстве для обеспечения отделения извлеченной воды от дробины.

Полученное после затирания сусло, как правило, называют «первым суслom», тогда как полученное после промывания дробины сусло, как правило, называют «вторым суслom». Если не указано, термин «сусло» может означать первое сусло, второе сусло или комбинацию как одного, так и другого. В ходе традиционного получения пива сусло кипятят вместе с хмелем. Сусло без хмеля также может называться «сладким суслom», тогда как сусло, кипяченое вместе с хмелем, может называться «прокипяченным суслom» или просто суслom.

А-амилаза и растения ячменя, несущие мутацию в промоторе гена α -амилазы

Термин « α -амилаза» в контексте настоящего документа относится к ферменту, который способен катализировать гидролиз альфа-связей в связанных альфа-связями полисахаридах, таких как крахмал. А-амилаза обычно представляет собой фермент, классифицированный как ЕС 3.2.1.1. А-амилаза также известна как альфа-амилаза.

Злаковые растения могут содержать более одного гена, кодирующего α -амилазу. Следовательно, растение ячменя в соответствии с настоящим изобретением может содержать более одного гена, кодирующего α -амилазу. Зачастую кодирующие α -амилазу гены могут образовывать генные кластеры.

А-амилаза в соответствии с настоящим изобретением может, в частности, представлять собой полипептид, имеющий последовательность с номером доступа HORVU6Hr1G078330.1, HORVU6Hr1G078360.1, HORVU6Hr1G078420.1, HORVU6Hr1G080790.1, HORVU7Hr1G091150.1, HORVU7Hr1G091240.1 или HORVU7Hr1G091250.3, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, причем указанные номера доступа представляют собой номера доступа из проекта по секвенированию генома ячменя, результаты которого опубликованы под авторством Mascher et al., 2017. Последовательности также доступны в базе данных BARLEX: <https://apex.ipk-gatersleben.de/apex/f?p=284:10>.

Таким образом, растение ячменя в соответствии с настоящим изобретением может содержать по меньшей мере 1, предпочтительно по меньшей мере 2, как, например, по меньшей мере 3, например, 3 кластера генов α -амилазы. В частности, растение ячменя может содержать кластер *amy1_1*, кластер *amy1_2* и кластер *amy2*. Кластер *amy1_2* зачастую содержит только один ген, однако в настоящем документе в целях упрощения он все равно называется кластером *amy1_2*. В дополнение к вышеупомянутым кластерам, растение ячменя может содержать дополнительные гены α -амилазы/кластеры (например,

гены *amy 3*, *amy4_1* и *amy4_2*). Каждый из этих кластеров может содержать один или несколько генов α -амилазы.

Примеры последовательностей генов α -амилазы доступны в рамках проекта по секвенированию генома ячменя, результаты которого опубликованы под авторством Mascher et al., 2017:

Название по Mascher 2017	ID гена
<i>amy1_1a</i>	HORVU6Hr1G078330.1
<i>amy1_1b</i>	HORVU6Hr1G078360.1
<i>amy1_1c</i>	HORVU6Hr1G078420.1
<i>amy1_1d</i>	HORVU0Hr1G032700.1
<i>amy1_1e</i>	HORVU0Hr1G032850.5
<i>amy1_2</i>	HORVU6Hr1G080790.1
<i>amy2_1</i>	HORVU7Hr1G091150.1
<i>amy2_2</i>	HORVU7Hr1G091240.1
<i>amy2_3</i>	HORVU7Hr1G091250.3
<i>amy3</i>	HORVU5Hr1G068350.1
<i>amy4_1</i>	HORVU2Hr1G071710.5
<i>amy4_2</i>	HORVU3Hr1G067620.1

Каждый ген α -амилазы обычно содержит промоторную область (в настоящем документе обозначенную как промотор гена α -амилазы), кодирующую область и один или несколько интронов. В контексте настоящего документа промотор гена α -амилазы содержит или состоит из последовательности из 1000 нуклеотидов, как, например, 800 нуклеотидов непосредственно выше старт-кодона (ATG) кодирующей последовательности гена α -амилазы. Точные последовательности копий отдельных генов в пределах каждого кластера и между разными сортами ячменя в областях промоторов генов α -амилазы могут существенно различаться, однако определенные регуляторные боксы являются консервативными среди множества генов α -амилазы. В частности, указанные регуляторные боксы могут быть консервативными среди генов α -амилазы кластера *amy1_1*, кластера *amy1_2* и кластера *amy2*. На фиг. 11 показаны результаты выравнивания частей промотора гена α -амилазы, содержащего указанные регуляторные боксы из разных генов α -амилазы кластеров *amy1_1* и *amy1_2* (фиг. 11А), а также из генов α -амилазы кластера *amy2* (фиг. 11В).

В частности, один или несколько из генов α -амилазы растений ячменя по настоящему изобретению может содержать GARE-бокс с последовательностью TAACARA, причем R представляет собой G или A. В частности, это справедливо в случае генов α -амилазы кластера *amy1_1*, кластера *amy1_2* или кластера *amy2*. В целом каждый промотор гена α -амилазы содержит не более чем один GARE-бокс. Гены α -амилазы кластеров *amy3* и *amy4* зачастую не содержат GARE-бокса.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения предпочтительно, чтобы растение ячменя содержало один или несколько генов α -амилазы, содержащих промоторы генов α -амилазы, содержащие мутированный GARE-бокс. Другими словами, один или несколько промоторов генов α -амилазы могут не содержать GARE-бокса дикого типа, а вместо этого они могут содержать мутантный GARE-бокс, причем один или несколько из нуклеотидов TAACARA были либо заменены, либо удалены. Предпочтительно указанный мутантный GARE-бокс представляет собой GARE-бокс, в котором только один из нуклеотидов TAACARA был либо заменен, либо удален. В частности, растение ячменя может содержать один или несколько генов α -амилазы кластера *amy1_1*, кластера *amy1_2* или кластера *amy2*, содержащих промоторы генов α -амилазы, содержащие мутированный GARE-бокс.

Согласно другому варианту осуществления предпочтительно, чтобы растение ячменя по настоящему изобретению содержало один или несколько генов α -амилазы, предпочтительно по меньшей мере 4, как, например, по меньшей мере 5, например, по меньшей мере 6 генов α -амилазы, как, например, по меньшей мере 7 генов α -амилазы, содержащих промоторы генов α -амилазы, содержащие один GARE-бокс с последовательностью TAACAAA. В частности, указанные гены α -амилазы могут представлять собой гены α -амилазы кластера *amy1_1*, кластера *amy1_2* или кластера *amy2*. Указанный ген α -амилазы также может содержать PYR-бокс. Термин «PYR-бокс» в контексте настоящего документа относится к последовательности CMTTTT, причем M представляет собой C или A.

Кроме того, один или несколько из генов α -амилазы растений ячменя по настоящему изобретению может содержать тандемно повторяющийся W-бокс. Стандартный тандемно повторяющийся W-бокс имеет последовательность (TGAC(C)_n(X)_mTTGACC), причем каждый X индивидуально может представлять собой любой нуклеотид, n равняется 0 или 1 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20. Следует понимать, что в пределах любого данного тандемно повторяющегося W-бокса отдельные X могут представлять собой одинаковые или разные нуклеотиды. В целом каждый промотор гена α -амилазы содержит только один тандемно повторяющийся W-бокс.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения предпочтительно, чтобы растение ячменя содержало один или несколько генов α -амилазы, содержащих промоторы генов α -амилазы, содержащие нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс. Другими словами, один или несколько промоторов генов α -амилазы могут не содержать стандартный тандемно повторяющийся W-бокс, а вместо этого они могут содержать нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, причем один или несколько из нуклеотидов стандартного тандемно повторяющегося W-бокса (TGAC(C)_n(X)_mTTGACC) были либо заменены, либо удалены. Следует понимать, что указанные один или несколько нуклеотидов, которые были заменены или удалены, представляют собой один или несколько из конкретных нуклеотидов стандартного тандемно повторяющегося W-бокса (т. е. не любые из X).

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению содержит один или несколько генов α -амилазы, например, по меньшей мере 4, как, например, по меньшей мере 5, например, по меньшей мере 6, как, например, по меньшей мере 7 генов α -амилазы, содержащих промоторы генов α -амилазы, содержащие нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, индивидуально выбранный из группы, состоящей из следующих последовательностей:

- (TGACR(X)_mYTGRCC), причем R представляет собой либо G, либо A, а Y представляет собой либо C, либо T, и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20; или
- (TGACR(X)_mTTGACC), причем R представляет собой либо G, либо A, и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20; или
- (TGACR(X)_mTTGAC), причем R представляет собой либо G, либо A, и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20; или
- (TGAC(C)_n(X)_mYTGRCC), причем R представляет собой либо G, либо A, а Y представляет собой либо C, либо T, n равняется 0 или 1 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20; или
- (TGAC(C)_n(X)_mCTGRCC), причем R представляет собой либо G, либо A, n равняется 0 или 1 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20;
- (TGAC(C)_n(X)_mYTGGCC), и причем Y представляет собой либо C, либо T, n равняется 0 или 1 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20; или
- (TGAC(C)_n(X)_mCTGACC), причем n равняется 0 или 1 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20;
- (TGAC(C)_n(X)_mTTGGCC), и причем n равняется 0 или 1 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20

- $(TGAC(C)_n(X)_mTTGATC)$, причем n равняется 0 или 1 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20;

Как упоминалось выше, m может представлять собой целое число в диапазоне 0-20, предпочтительно m представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 10, еще более предпочтительно m представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 6.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению содержит один или несколько генов α -амилазы, например, по меньшей мере 5 генов α -амилазы, содержащих промоторы генов α -амилазы, содержащие нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, индивидуально выбранный из нестандартных тандемно повторяющихся W-боксов со следующими последовательностями:

- TGACGGTCGTATTGACC (SEQ ID NO:31);
- TGACAGTGGTATTGGCC (SEQ ID NO:32);
- TGACAGTGGTACTGGCC (SEQ ID NO:33);
- GTGACAGTGGTATTGGCC (SEQ ID NO:34);
- TGACGGTCGTATTGATC (SEQ ID NO:35);
- TGACCGTCGTATTGATC (SEQ ID NO:36); и
- TTGACTTGATC (SEQ ID NO:37).

Из представленных в настоящем документе результатов поиска в базе данных и повторного секвенирования промоторов видно, что α -амилазные промоторы генов α -амилазы кластеров *amy1_1*, *amy1_2* и *amy2* содержат последовательности GARE-бокса. В частности, гены α -амилазы кластера *amy2* у ячменя дикого типа содержат GARE-бокс с последовательностью TAACAGA.

Кластер *amy1_1* может содержать 1-5 генов α -амилазы, однако не все гены α -амилазы обязательно экспрессируются. Таким образом, у некоторых растений ячменя (например, у cv. Varke или его потомства) кластер *amy1_1* содержит по меньшей мере три основных копии, тогда как другие растения ячменя (например, cv. Planet или его потомство) могут содержать три гена α -амилазы в кластере *amy1_1*, из которых только два могут быть экспрессированы. Например, у некоторых промоторов генов α -амилазы отсутствует PYR-бокс, и поэтому, как полагают, они не экспрессируются. А-амилаза в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой α -амилазу, кодируемую геном кластера *amy1_1*. Например, α -амилаза может представлять собой полипептид с последовательностью, имеющей номер доступа AAA98790.1 или ВАК03603.1, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, причем указанные номера доступа являются номерами доступа из базы данных NCBI. А-амилаза также может

представлять собой полипептид, имеющий последовательность с номером доступа HORVU6Hr1G078330.1, HORVU6Hr1G078360.1, HORVU6Hr1G078420.1, HORVU0Hr1G032700.1 или HORVU0Hr1G032850.5, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, причем указанные номера доступа являются номерами доступа из базы данных BARLEX (<https://apex.ipk-gatersleben.de/apex/f?p=284:10>) и опубликованными под авторством Mascher et al., 2017.

Растение ячменя по настоящему изобретению содержит кластер *amy1_1*, причем по меньшей мере один из промоторов генов α -амилазы, предпочтительно все из промоторов генов α -амилазы, содержит:

- только мутированный GARE-бокс, причем один из нуклеотидов GARE-бокса (TAACARA) был либо заменен, либо удален; и/или
- GARE-бокс с последовательностью TAACAAA; и/или
- только нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, причем один или несколько из конкретных нуклеотидов стандартного тандемно повторяющегося W-бокса (TGAC(C)_n(X)_mTTGACC) были либо заменены, либо удалены, например, указанный нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс может иметь любую из описанных в настоящем документе выше последовательностей нестандартного тандемно повторяющегося W-бокса.

Кроме того, указанные промоторы генов α -амилазы могут содержать PYR-бокс.

Термин «только мутированный GARE-бокс» в контексте настоящего документа относится к указанному промотору, содержащему только один GARE-бокс, причем указанный GARE-бокс является мутированным, т. е. этот указанный промотор не содержит GARE-бокса дикого типа в дополнение к указанному мутированному GARE-боксу. Подобным образом, термин «только нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс» в контексте настоящего документа относится к указанному промотору, содержащему только один тандемно повторяющийся W-бокс, причем указанный тандемно повторяющийся W-бокс представляет собой нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, т. е. этот указанный промотор не содержит стандартный тандемно повторяющийся W-бокс в дополнение к указанному нестандартному тандемно повторяющемуся W-боксу.

Как видно из настоящего изобретения, GARE-бокс с последовательностью TAACAAA характеризуется более низкой связывающей способностью в отношении HRT по сравнению с таковой в случае GARE-бокса с последовательностью TAACAGA. Подобным образом, полагают, что WRKY38 характеризуется более низкой связывающей способностью в отношении нестандартного тандемно повторяющегося W-бокса, в

сравнении с таковой в отношении стандартного тандемно повторяющегося W-бокса. В международной панели 96 сортов пивоваренного ячменя (2-рядный яровой ячмень, 2-рядный озимый ячмень, 6-рядный озимый ячмень) можно обнаружить шесть уникальных кластеров *amy1_1*. Из этой панели, растения ячменя с наиболее высокой активностью α -амилазы всегда имеют кластер *amy1_1*, содержащий по меньшей мере три гена α -амилазы, содержащие промотор гена α -амилазы, содержащий GARE-бокс с последовательностью ТААСААА. К сожалению, тестируемые в панели растения ячменя с наиболее высокой активностью α -амилазы не характеризовались наиболее высокой урожайностью. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к растениям ячменя как с высокими показателями урожайности, так и высокой активностью α -амилазы.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя содержит кластер *amy1_1*, причем по меньшей мере один из промоторов генов α -амилазы содержит нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, содержащий последовательность TTGATC. Например, растение ячменя может содержать кластер *amy1_1*, причем по меньшей мере один из промоторов генов α -амилазы содержит нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, содержащий последовательность CTGACGGTCGTATTGATC (SEQ ID NO:72). В частности, растение ячменя может содержать промотор гена α -амилазы, содержащий последовательность, показанную на фиг. 11A как «HENZ-43 *amy1_1*». Указанное растение ячменя может представлять собой, например, HENZ-43 или его потомство. Например, растение ячменя может представлять собой растение ячменя, идентифицированное, как описано в примере 13A, или его потомство.

Кластер *amy1_2* обычно содержит только один ген α -амилазы. Кластер *amy1_2* в геноме ячменя обычно тесно связан с кластером *amy1_1*. А-амилаза в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой α -амилазу, кодируемую геном кластера *amy1_2*. Например, α -амилаза может представлять собой полипептид, имеющий последовательность с номером доступа AAA98615.1, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, причем указанные номера доступа являются номерами доступа из базы данных NCBI. А-амилаза также может представлять собой полипептид, имеющий последовательность с номером доступа HORVU6Hr1G080790.1, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, причем указанные номера доступа являются номерами доступа из базы данных BARLEX (<https://apex.ipk-gatersleben.de/apex/f?p=284:10>), и они описаны в Mascher et al., 2017.

Зачастую ген α -амилазы кластера *amy1_2* содержит промотор гена α -амилазы, содержащий GARE-бокс с последовательностью ТААСААА. Растение ячменя по настоящему изобретению может содержать кластер *amy1_2*, содержащий ген α -амилазы с промотором гена α -амилазы, содержащим:

- только мутированный GARE-бокс, причем один из нуклеотидов GARE-бокса (ТААСААА) был либо заменен, либо удален; и/или
- GARE-бокс с последовательностью ТААСААА; и/или
- только нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, причем один или несколько из конкретных нуклеотидов стандартного тандемно повторяющегося W-бокса (TGAC(C)_n(X)_mTTGACC) были либо заменены, либо удалены, например, указанный нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс может иметь любую из описанных в настоящем документе выше последовательностей нестандартного тандемно повторяющегося W-бокса.

Кластер *amy2* может состоять из трех экспрессируемых копий гена α -амилазы. Например, это справедливо в случае cv. Morex. У ячменя дикого типа каждый ген α -амилазы кластера *amy2* может содержать GARE-бокс с последовательностью ТААСАГА.

α -амилаза в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой α -амилазу, кодируемую геном кластера *amy2*. Например, α -амилаза может представлять собой полипептид, имеющий последовательность с номером доступа HORVU7Hr1G091150.1, HORVU7Hr1G091240.1, HORVU7Hr1G091250.3, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 85%, как, например, по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, причем указанные номера доступа являются номерами доступа из базы данных BARLEX (<https://apex.ipk-gatersleben.de/apex/f?p=284:10>), и они описаны в Mascher et al., 2017.

В другом случае растения ячменя по настоящему изобретению могут предусматривать кластер *amy2*, содержащий один или несколько генов α -амилазы с промоторами генов α -амилазы, содержащими:

- только мутированный GARE-бокс, причем один или несколько из нуклеотидов ТААСААА были либо заменены, либо удалены,
- GARE-бокс с последовательностью ТААСААА,
- только нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, причем один или несколько из конкретных нуклеотидов стандартного тандемно повторяющегося W-бокса (TGAC(C)_n(X)_mTTGACC) были либо заменены, либо удалены, например, указанный нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс может иметь любую из описанных в

настоящем документе выше последовательностей нестандартного тандемно повторяющегося W-бокса.

В частности, растение ячменя может предусматривать кластер *amy2*, содержащий один или несколько генов α -амилазы с промоторами генов α -амилазы, содержащими мутированный тандемно повторяющийся W-бокс, содержащий последовательность TTGACTTGACC, причем по меньшей мере один нуклеотид был заменен или удален.

HRT

Полноразмерный белковый продукт гена *репрессора транскрипции Hv (HvHRT)* ячменя функционирует как транскрипционный репрессор на ряде разных промоторов, при тестировании с использованием клеток растений после транзиторной экспрессии. В таких полностью искусственных условиях транзиторная экспрессия HRT приводит к сниженному уровню экспрессии репортерного гена, который находится под контролем разных промоторов гена α -амилазы (*Amy2* и *Amy1*), а также к сниженному уровню экспрессии конститутивного промотора CaMV 35S. Было обнаружено, что репрессия промотора *Amy2* в этой системе является более сильной (Raventos et al. 1998). HRT связывается с так называемым «GARE-(элемент, реагирующий на GA)-боксом», который также является сайтом связывания предполагаемого активатора экспрессии гена α -амилазы, HvGAMYb, и блокирует его (Gubler et al. 1995).

Кодирующая последовательность дикого типа HRT ячменя в настоящем документе представлена как SEQ ID NO:1. Для *HvHRT* CDS-последовательностей AK362734.1 (cv. Naruna Nijo), AK252040.1 (Naruna Nijo), HORVU2Hr1G035630.1 (cv. Morex), AJ001317.1 (Himalaya), подвергнутых множественному выравниванию последовательностей, и собранных «вручную» последовательностей в случае cv. Bowman и Barke, происходящих из контигов геномной ДНК в IBSC2012 (доступно в базе данных BARLEX

<https://apex.ipk-gatersleben.de/apex/f?p=284:10>), была продемонстрирована 100% идентичность последовательностей между CDS-последовательностями. Белковая последовательность HRT ячменя дикого типа в настоящем документе представлена как SEQ ID NO:2. Для белковых последовательностей *HvHRT* AK362734.1 (cv. Naruna Nijo), AK252040.1 (Naruna Nijo), HORVU2Hr1G035630.1 (cv. Morex), AJ001317.1/CAA04677.1 (Himalaya), подвергнутых множественному выравниванию последовательностей, и собранных «вручную» и транслированных последовательностей в случае cv. Bowman и Barke, происходящих из контигов геномной ДНК в IBSC2012, была продемонстрирована 100% идентичность последовательностей между белковыми последовательностями. Белок HvHRT содержит два предполагаемых сигнала ядерной локализации (NLS). Таким образом,

предполагаемый NLS составляют аминокислоты 276-292 SEQ ID NO:2 (Arg276-Arg292) и аминокислоты 527-530 SEQ ID NO:2 (Arg527-Arg530) (Raventos et al., 1998). Кроме того, HvHRT содержит три предполагаемых ДНК-связывающих домена, напоминающих цинковые пальцы (в настоящем документе также обозначаются HRTdb), содержащих следующую консенсусную последовательность: VCG_{X4}DG_{X2}C_{X2}C_{X3}PV_{X2}RKRC_{X2}HKG_XR, причем X может представлять собой любую аминокислоту. Таким образом, предполагаемые ДНК-связывающие домены составляют аминокислоты 302-331 SEQ ID NO:2, аминокислоты 463-491 SEQ ID NO:2 и аминокислоты 509-539 SEQ ID NO:2.

Растение ячменя, несущее мутацию в гене HRT

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к растению ячменя, несущему мутацию в гене HRT, обуславливающую потерю функции HRT, и, в частности, полную потерю функции HRT. Потерю функции HRT можно определять путем определения уровня экспрессии HRT либо на уровне мРНК, либо на уровне белка. Согласно одному варианту осуществления считается, что растение ячменя характеризуется потерей функции HRT, если растение ячменя содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и еще более предпочтительно менее 10% мутантной мРНК HvHRT или мРНК HvHRT дикого типа по сравнению с уровнем мРНК HvHRT у растения ячменя, содержащего ген *HvHRT* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что растение ячменя характеризуется полной потерей функции HRT, если растение ячменя содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантной мРНК HvHRT или мРНК HvHRT дикого типа по сравнению с таковой у растения ячменя, содержащего ген *HvHRT* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный HvHRT представляет собой мРНК, кодируемую мутированным геном *HvHRT*, несущим мутацию в области, кодирующей мРНК. мРНК HvHRT представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:2 или его функциональный гомолог, а ген *HvHRT* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:2 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:2. Согласно одному варианту осуществления растение ячменя с полной потерей функции HRT может не содержать мутантной мРНК HvHRT или мРНК HvHRT дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR.

Согласно одному варианту осуществления считается, что растение ячменя характеризуется потерей функции HRT, если растение ячменя содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и еще более предпочтительно менее 10% мутантного белка HvHRT или белка HvHRT дикого типа по сравнению с уровнем белка HvHRT у растения ячменя, содержащего ген *HvHRT* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что растение ячменя характеризуется полной потерей функции HRT, если растение ячменя содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантного белка HvHRT или белка HvHRT дикого типа по сравнению с таковым у растения ячменя, содержащего ген *HvHRT* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный белок HvHRT представляет собой полипептид, кодируемый мутированным геном *HvHRT*, несущим мутацию в кодирующей области. Белок HvHRT представляет собой полипептид SEQ ID NO:2 или его функциональный гомолог, а ген *HvHRT* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:2 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:2. Согласно одному варианту осуществления растение ячменя с полной потерей функции HRT может не содержать мутантный белок HvHRT или белок HvHRT дикого типа в выявляемых количествах при выявлении с помощью стандартного вестерн-блоттинга.

Согласно одному варианту осуществления считается, что растение ячменя характеризуется потерей функции HRT, если можно наблюдать повышенный уровень экспрессии с промотора, содержащего GARE-бокс. Таким образом, потерю функции HRT можно определять с использованием транзientной трансфекции репортерной конструкцией, содержащей репортерный ген (например, люциферазы) под контролем промотора гена α -амилазы из кластера *Amy2*, например, конструкцией, описанной в Raventos et al., 1998, на стр. 23314 в разделе «*Transient Gene Expression Assays in Onion Epidermal and Barley Aleurone Cells*».

Повышение люциферазной активности по меньшей мере на 10%, как, например, по меньшей мере на 25% после трансфекции указанной репортерной конструкцией клеток данного растения ячменя, по сравнению с таковой при трансфекции указанной репортерной конструкцией клеток растения ячменя с геном HvHRT дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип, является показателем того, что указанное растение ячменя характеризуется потерей функции HRT.

Согласно одному варианту осуществления считается, что растение ячменя характеризуется потерей функции HRT, если указанное растение ячменя несет мутацию,

приводящую в результате к образованию гена HRT, кодирующего мутантный белок H ν HRT, в котором отсутствуют один или несколько из следующих доменов:

- NLS1: R276-R292 SEQ ID NO:2
- NLS2: R527-R530 SEQ ID NO:2
- HRTdb1: V302-R331 SEQ ID NO:2
- HRTdb2: L463-E491 SEQ ID NO:2
- HRTdb3: V509-A539 SEQ ID NO:2

Растение ячменя, несущее мутацию в гене HRT, обуславливающую потерю функции HRT, может нести разные типы мутаций, например, любую из описанных в этом разделе настоящего документа мутаций.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя несет мутацию в промоторной области гена H ν HRT или в интроне гена H ν HRT, обуславливающую aberrantную транскрипцию мРНК H ν HRT и/или aberrantную трансляцию белка H ν HRT. Такие растения ячменя могут, в частности, характеризоваться сниженными уровнями мРНК H ν HRT, как описано в этом разделе настоящего документа выше, и/или сниженными уровнями белка H ν HRT, как описано в этом разделе настоящего документа выше.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к делеции гена *H ν HRT*. Геномная последовательность гена *H ν HRT* отличается среди разных разновидностей ячменя, однако кодирующая область является высококонсервативной. Примеры геномных последовательностей гена H ν HRT ячменя включают последовательность с номером доступа ID# AJ001317.1 в NCBI. Кроме того, большую часть геномной последовательности гена H ν HRT можно найти в morex_contig_368180 и morex_contig_1570244 (cv. Morex) (IBSC, 2012), однако эти контиги не являются перекрывающимися, и часть интронной последовательности отсутствует. Кодирующая последовательность HRT некоторых растений ячменя дикого типа в настоящем документе представлена как SEQ ID NO:1.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *H ν HRT*, кодирующего мутантный белок *H ν HRT*. Согласно одному варианту осуществления мутация может представлять собой мутацию, приводящую в результате к появлению преждевременного стоп-кодона. Согласно другому варианту осуществления мутация

представляет собой мутацию в сайте сплайсинга гена *HvHRT*. Указанная мутация может обуславливать aberrантный сплайсинг мРНК *HvHRT*.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *HvHRT*, кодирующего мутантный белок *HvHRT*, в котором отсутствуют по меньшей мере аминокислоты, соответствующие аминокислотам 527-530 SEQ ID NO:2. Следует понимать, что в мутантном *HvHRT*, в котором отсутствуют по меньшей мере аминокислоты XX-YY, могут отсутствовать и другие аминокислоты, помимо аминокислот XX-YY.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя может содержать мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок *HvHRT*, в котором отсутствуют по меньшей мере аминокислоты 463-491 SEQ ID NO:2, например, в указанном мутантном белке *HvHRT* могут отсутствовать по меньшей мере аминокислоты 463-491 и аминокислоты 527-530 SEQ ID NO:2.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя может содержать мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок *HvHRT*, в котором отсутствуют по меньшей мере аминокислоты 509-539 SEQ ID NO:2.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению может содержать мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок *HvHRT*, в котором отсутствует по меньшей мере 21 наиболее близкая к С-концу аминокислота, например, по меньшей мере 39 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 85 наиболее близких к С-концу аминокислот, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO:2. Например, растение ячменя может содержать мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок *HvHRT*, в котором отсутствуют по меньшей мере 118 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO:2.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению может содержать мутантный ген *HvHRT*, кодирующий усеченный белок *HvHRT*, содержащий N-концевой фрагмент *HvHRT*, содержащий не более 526 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:2, например, не более 508 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:2, как, например, не более 462 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:2, предпочтительно не более 431 N-концевой аминокислоты SEQ ID NO:2.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению может содержать мутантный ген *HvHRT*, несущий преждевременный стоп-кодон среди любых из кодонов 1-527, например, среди любых из кодонов 1-509, как, например, среди любых из кодонов 1-463, например, среди любых из кодонов 1-431.

Например, растение ячменя может содержать мутантный ген *HvHRT*, несущий преждевременный стоп-кодон в положении кодона 431. Кодоны пронумерованы в соответствии с SEQ ID NO:1, начиная с 5'-конца, причем один кодон составляют 3 нуклеотида.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению содержит мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок HvHRT с мутацией W431stop SEQ ID NO: 2. Согласно одному предпочтительному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению содержит мутантный ген *HvHRT*, кодирующий полипептид SEQ ID NO:4. В частности, указанное растение ячменя может предусматривать мутацию G→A по нуклеотиду 1293 кодирующей последовательности *HvHRT* SEQ ID NO:1. Например, растение ячменя может содержать мутантный ген *HvHRT*, содержащий кодирующую последовательность SEQ ID NO:3.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению содержит мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок HvHRT с мутацией W170stop SEQ ID NO: 2. Например, растение ячменя может содержать мутантный ген *HvHRT*, несущий преждевременный стоп-кодон в положении кодона 170 (нумерация кодонов представлена в привязке к SEQ ID NO:1, как объяснялось выше). В частности, указанное растение ячменя может предусматривать мутацию G→A по нуклеотиду 510 кодирующей последовательности *HvHRT* SEQ ID NO:1. Указанное растение ячменя может представлять собой, например, HENZ-53 или его потомство. Например, растение ячменя может представлять собой растение ячменя, идентифицированное, как описано в примере 14, или его потомство.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению содержит мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок HvHRT с мутацией W371stop SEQ ID NO: 2. Например, растение ячменя может содержать мутантный ген *HvHRT*, несущий преждевременный стоп-кодон в положении кодона 371 (нумерация кодонов представлена в привязке к SEQ ID NO:1, как объяснялось выше). В частности, указанное растение ячменя может предусматривать мутацию G→A по нуклеотиду 1113 кодирующей последовательности *HvHRT* SEQ ID NO:1. Указанное растение ячменя может представлять собой, например, HENZ-54 или его потомство. Например, растение ячменя может представлять собой растение ячменя, идентифицированное, как описано в примере 14, или его потомство.

Для целей настоящей заявки на выдачу патента семена растения ячменя (*Hordeum vulgare*), обозначенного как «HENZ-2», были переданы в депозитарий NCIMB Ltd. Ferguson Building, Craibstone Estate, Баксберн, Абердин, AB21 9YA, Шотландия, в соответствии с

положениями Будапештского договора о признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры. Растение ячменя HENZ-2 было депонировано 12 ноября 2018 года и получило номер доступа NCIMB 43270.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению представляет собой растение ячменя (*Hordeum vulgare*), депонированное 12 ноября 2018 года в NCIMB под номером доступа NCIMB 43270 и названное «HENZ-2»; или его потомство. Таким образом, растение ячменя по настоящему изобретению может представлять собой растение ячменя HENZ-2, депонированное в NCIMB 12 ноября 2018 года и имеющее номер доступа NCIMB 43270, или любое потомство растения ячменя, причем потомство растения ячменя несет мутацию G→A по нуклеотиду 1293 кодирующей последовательности *HvHRT* SEQ ID NO:1, и/или причем ген *HvHRT* указанного растения ячменя кодирует мутантный белок HvHRT, предусматривающий мутацию W431stop SEQ ID NO: 2.

HvHBL12

Ген HvHBL12 ячменя ранее не был описан. Кодирующая последовательность гена HvHBL12 ячменя сорта Naguna Nijo в настоящем документе представлена как SEQ ID NO:5. Последовательность белка HvHBL12, кодируемого этой последовательностью, в настоящем документе представлена как SEQ ID NO:6. Дополнительную кодирующую последовательность можно получить из Naguna Nijo, однако такая последовательность несет стоп-кодон в положении кодона 216. Авторы настоящего изобретения полагают, что она представляет собой нефункциональную копию. Две последовательности HvHBL12 были внесены в базу данных NCBI под номерами доступа AK376953.1 и AK361212.1. Указанные последовательности кодируют белки с различными полиморфизмами по сравнению с SEQ ID NO:6, включая следующее: N141D, M142V и E184D. Все из полипептида SEQ ID NO:6, а также полипептидов SEQ ID NO:6 с любыми из полиморфизмов N141D, M142V и E184D, в настоящем документе считаются белками HvHBL12 дикого типа.

Геномная последовательность гена HvHBL12 может отличаться среди различных разновидностей ячменя. Примеры геномных последовательностей гена HvHBL12 ячменя можно найти в morex_contig_56855 (cv. Morex) (IBSC, 2012) и последовательностях с номером доступа AK376953.1 и AK361212.1 в базе данных NCBI (частичные последовательности). Однако начало кодирующей последовательности, указанной в базе данных NCBI, вероятно, неверно. Кодирующая последовательность гена HvHBL12 также несколько отличается среди различных разновидностей ячменя. Предпочтительно

кодирующая последовательность функционального гена HvHBL12 имеет последовательность, в настоящем документе представленную как SEQ ID NO:5, или последовательность, характеризующуюся с ней по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, причем указанная последовательность кодирует полипептид SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей. Примеры кодирующих последовательностей гена HvHBL12 у ячменя включают последовательность, в настоящем документе представленную как SEQ ID NO:5, или последовательность с номером доступа HORVU5Hr1G081090.1 (Mascher et al., 2017).

С помощью поиска с использованием blast в отношении белковых последовательностей с применением последовательности белка HvHBL12 было показано, что HvHBL12 характеризуется некоторой степенью гомологии с белками, содержащими гомеодомен и лейциновую застежку.

Аминокислоты 26-79 SEQ ID NO:6 составляют предполагаемый кодируемый гомеобоксом домен, тогда как аминокислоты 81-122 SEQ ID NO:6 составляют предполагаемую ассоциированную с гомеодоменом лейциновую застежку.

Растение ячменя, несущее мутацию в гене *HvHBL12*

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к растению ячменя, несущему мутацию в гене HvHBL12, обуславливающую потерю функции HvHBL12, и, в частности, полную потерю функции HvHBL12. Потерю функции HvHBL12 можно определять путем определения уровня экспрессии HvHBL12 либо на уровне мРНК, либо на уровне белка. Согласно одному варианту осуществления считается, что растение ячменя характеризуется потерей функции HvHBL12, если растение ячменя содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и еще более предпочтительно менее 10% мутантной мРНК HvHBL12 или мРНК HvHBL12 дикого типа по сравнению с уровнем мРНК HvHBL12 у растения ячменя, содержащего ген HvHBL12 дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что растение ячменя характеризуется полной потерей функции HvHBL12, если растение ячменя содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантной мРНК HvHBL12 или мРНК HvHBL12 дикого типа по сравнению с таковой у растения ячменя, содержащего ген HvHBL12 дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный HvHBL12 представляет собой мРНК, кодируемую мутированным геном HvHBL12, несущим мутацию в области, кодирующей мРНК. мРНК HvHBL12 представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог, а ген HvHBL12 дикого типа представляет собой ген,

кодирующий полипептид SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:6. Согласно одному варианту осуществления растение ячменя с полной потерей функции HvHBL12 может не содержать мутантной мРНК HvHBL12 или мРНК HvHBL12 дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR.

Согласно одному варианту осуществления считается, что растение ячменя характеризуется потерей функции HvHBL12, если растение ячменя содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и еще более предпочтительно менее 10% мутантного белка HvHBL12 или белка HvHBL12 дикого типа по сравнению с уровнем белка HvHBL12 у растения ячменя, содержащего ген HvHBL12 дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что растение ячменя характеризуется полной потерей функции HvHBL12, если растение ячменя содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантного белка HvHBL12 или белка HvHBL12 дикого типа по сравнению с таковым у растения ячменя, содержащего ген HvHBL12 дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный белок HvHBL12 представляет собой полипептид, кодируемый мутированным геном HvHBL12, несущим мутацию в кодирующей области. Белок HvHBL12 представляет собой полипептид SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог, а ген HvHBL12 дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:6. Согласно одному варианту осуществления растение ячменя с полной потерей функции HvHBL12 может не содержать мутантный белок HvHBL12 или белок HvHBL12 дикого типа в выявляемых количествах при выявлении с помощью стандартного вестерн-блоттинга.

Согласно одному варианту осуществления считается, что растение ячменя характеризуется потерей функции HvHBL12, если указанное растение ячменя несет мутацию, приводящую в результате к образованию гена HvHBL12, кодирующего мутантный белок HvHBL12, в котором отсутствуют один или несколько из следующих доменов:

- кодируемый гомеобоксом домен: аминокислоты 26-79 SEQ ID NO:6
- ассоциированная с гомеодоменом лейциновая застежка: аминокислоты 81-122 SEQ ID NO:6
- С-концевая часть: аминокислоты 228-250 SEQ ID NO:6

Растение ячменя, несущее мутацию в гене HvHBL12, обуславливающую потерю функции HvHBL12, может нести разные типы мутаций, например, любую из описанных в этом разделе настоящего документа мутаций.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя несет мутацию в промоторной области гена HvHBL12 или в интроне гена HvHBL12, обуславливающую aberrантную транскрипцию мРНК HvHBL12 и/или aberrантную трансляцию белка HvHBL12. Такие растения ячменя могут, в частности, характеризоваться сниженными уровнями мРНК HvHBL12, как описано в этом разделе настоящего документа выше, и/или сниженными уровнями белка HvHBL12, как описано в этом разделе настоящего документа выше.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к делеции гена HvHBL12.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена HvHBL12, кодирующего мутантный белок HvHBL12. Согласно одному варианту осуществления мутация может представлять собой мутацию, приводящую в результате к появлению преждевременного стоп-кодона. Согласно другому варианту осуществления мутация представляет собой мутацию в сайте сплайсинга гена HvHBL12. Указанная мутация может обуславливать aberrантный сплайсинг мРНК HvHBL12.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена HvHBL12, кодирующего мутантный белок HvHBL12, в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот SEQ ID NO:6, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя может содержать мутантный ген HvHBL12, кодирующий мутантный белок HvHBL12, в котором отсутствуют по меньшей мере:

- аминокислоты 26-79 SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:6, несущей один или несколько из полиморфизмов N141D, M142V или E184D; или
- аминокислоты 81-122 SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:6, несущей один или несколько из полиморфизмов N141D, M142V или E184D; или
- аминокислоты 228-250 SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:6, несущей один или несколько из полиморфизмов N141D, M142V или E184D.

Следует понимать, что в мутантном HvHBL12, в котором отсутствуют по меньшей мере аминокислоты XX-YY, могут отсутствовать и другие аминокислоты, помимо аминокислот XX-YY.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению может содержать мутантный ген HvHBL12, кодирующий мутантный белок HvHBL12, в котором отсутствуют по меньшей мере 5 наиболее близких к С-концу аминокислот, например, по меньшей мере 10 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 15 наиболее близких к С-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO:6, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей. Например, растение ячменя может содержать мутантный ген HvHBL12, кодирующий мутантный белок HvHBL12, в котором отсутствуют по меньшей мере 22 наиболее близкие к С-концу аминокислоты SEQ ID NO:6, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению может содержать мутантный ген HvHBL12, кодирующий усеченный белок HvHBL12, содержащий N-концевой фрагмент HvHBL12, содержащий не более 245 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:6, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, например, не более 240 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:6, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, как, например, не более 235 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:6, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей, предпочтительно не более 227 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:6, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению может содержать мутантный ген HvHBL12, несущий преждевременный стоп-кодон среди любых из кодонов 1-245, например, среди любых из кодонов 1-240, как, например, среди любых из кодонов 1-235, например, среди любых из кодонов 1-228. Например, растение ячменя может содержать мутантный ген *HvHBL12*, несущий преждевременный стоп-кодон в положении кодона 228. Кодоны пронумерованы в соответствии с SEQ ID NO:5, начиная с 5'-конца, причем один кодон составляет 3 нуклеотида.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению содержит мутантный ген *HvHBL12*, кодирующий мутантный белок HvHBL12 с мутацией W228stop SEQ ID NO:6. Согласно одному предпочтительному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению содержит мутантный ген HvHBL12, кодирующий полипептид SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:9, несущей один или несколько из полиморфизмов N141D, M142V или E184D. В частности, указанное растение ячменя может предусматривать мутацию G→A по нуклеотиду 684 кодирующей последовательности *HvHBL12* SEQ ID NO:5. Например, растение ячменя может содержать мутантный ген HvHBL12, содержащий кодирующую последовательность SEQ ID NO:8.

Упомянутый в этом разделе функциональный гомолог SEQ ID NO:6 может представлять собой, в частности, SEQ ID NO:6, несущую один или несколько из следующих полиморфизмов: N141D, M142V и E184.

Для целей настоящей заявки на выдачу патента семена растения ячменя (*Hordeum vulgare*), обозначенного как «HENZ-10», были переданы в депозитарий NCIMB Ltd. Ferguson Building, Craibstone Estate, Баксберн, Абердин, AB21 9YA, Шотландия, в соответствии с положениями Будапештского договора о признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры. Растение ячменя HENZ-10 было депонировано 12 ноября 2018 года и получило номер доступа NCIMB 43271.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению представляет собой растение ячменя (*Hordeum vulgare*), депонированное 12 ноября 2018 года в NCIMB под номером доступа NCIMB 43271 и названное «HENZ-10»; или его потомство. Таким образом, растение ячменя по настоящему изобретению может представлять собой растение ячменя HENZ-10, депонированное в NCIMB 12 ноября 2018 года и имеющее номер доступа NCIMB 43271, или любое потомство растения ячменя, причем растение ячменя несет мутацию G→A по нуклеотиду 684 кодирующей последовательности *HvHBL12* SEQ ID NO:5, и/или причем ген *HvHBL12* указанного растения ячменя кодирует мутантный белок HvHBL12, предусматривающий мутацию W228stop SEQ ID NO: 6.

HvWRKY38

Полноразмерный белковый продукт гена *HvWRKY38* ячменя, как полагают, действует как транскрипционный репрессор путем связывания с тандемно повторяющимися W-боксами. *HvWRKY38* является членом II группы факторов транскрипции WRKY, которые содержат только один WRKY-домен. Zou et al., 2008,

предположили, что HvWRKY38 и VPBF могут действовать как транскрипционные репрессоры Amy32b.

Одна из кодирующих последовательностей дикого типа *WRKY38* ячменя в настоящем документе представлена как SEQ ID NO:10. Для *HvWRKY38* CDS-последовательностей, происходящих из последовательностей с номерами доступа AJ536667.1 (cv. Ingrid), AK360269.1 (cv. Haruna Nijo), AY541586.1 (cv. Nure), MLOC_60890.1 (cv. Morex), подвергнутых множественному выравниванию последовательностей, и последовательностей из contig_242376 cv Bowman (IBSC, 2012) была продемонстрирована очень высокая степень идентичности последовательностей между CDS-последовательностями с 2 полиморфизмами по нуклеотидам 159 и 292 SEQ ID NO:10. Белковая последовательность HvWRKY38 ячменя дикого типа в настоящем документе представлена как SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12. В результате множественного выравнивания последовательностей в отношении последовательностей белка HvWRKY38, транслируемого с вышеупомянутых геномных последовательностей, было продемонстрировано, что все белки HvWRKY38 имеют последовательность, представленную в настоящем документе как SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12, причем аминокислота 98 может представлять собой либо Val, либо Met. Обе из этих последовательностей в настоящем документе считаются последовательностями HvWRKY38 дикого типа. Белок HvWRKY38 содержит WRKY-домен, охватывающий аминокислоты 200-206 SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12, консервативные гидрофобные остатки Leu63, Val70, Leu77, Val84 и Leu91 в мотиве типа лейциновой застежки SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12 и предполагаемый подобный лейциновой застежке мотив ($C_{X4}-5C_{X22-23}N_{X1}H$), включая Cys220, Cys226, His250 и His252 SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12.

Геномная последовательность гена *WRKY38* может отличаться среди различных разновидностей ячменя. Примером геномных последовательностей гена *WRKY38* ячменя является последовательность с номером доступа AY541586.1 в базе данных NCBI, а также morex_contig_44877 (cv. Morex) (IBSC, 2012) и bowman_contig_242376 (cv. Bowman), доступные из базы данных BARLEX (<https://apex.ipk-gatersleben.de/apex/f?p=284:10>)).

Растение ячменя, несущее мутацию в гене *WRKY38*

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к растению ячменя, несущему мутацию в гене HvWRKY38, обуславливающую потерю функции HvWRKY38, и, в частности, полную потерю функции HvWRKY38. Потерю функции HvWRKY38 можно определять путем определения уровня экспрессии HvWRKY38 либо на уровне мРНК, либо на уровне белка. Согласно одному варианту

осуществления считается, что растение ячменя характеризуется потерей функции HvWRKY38, если растение ячменя содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и еще более предпочтительно менее 10% мутантной мРНК HvWRKY38 или мРНК HvWRKY38 дикого типа по сравнению с уровнем мРНК HvWRKY38 у растения ячменя, содержащего ген HvWRKY38 дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что растение ячменя характеризуется полной потерей функции HvWRKY38, если растение ячменя содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантной мРНК HvWRKY38 или мРНК HvWRKY38 дикого типа по сравнению с таковой у растения ячменя, содержащего ген HvWRKY38 дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный HvWRKY38 представляет собой мРНК, кодируемую мутированным геном HvWRKY38, несущим мутацию в области, кодирующей мРНК. мРНК HvWRKY38 представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12 или его функциональный гомолог, а ген HvWRKY38 дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12. Согласно одному варианту осуществления растение ячменя с полной потерей функции HvWRKY38 может не содержать мутантной мРНК HvWRKY38 или мРНК HvWRKY38 дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR.

Согласно одному варианту осуществления считается, что растение ячменя характеризуется потерей функции HvWRKY38, если растение ячменя содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и еще более предпочтительно менее 10% мутантного белка HvWRKY38 или белка HvWRKY38 дикого типа по сравнению с уровнем белка HvWRKY38 у растения ячменя, содержащего ген HvWRKY38 дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что растение ячменя характеризуется полной потерей функции HvWRKY38, если растение ячменя содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантного белка HvWRKY38 или белка HvWRKY38 дикого типа по сравнению с таковым у растения ячменя, содержащего ген HvWRKY38 дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный белок HvWRKY38 представляет собой полипептид, кодируемый мутированным геном HvWRKY38, несущим мутацию в кодирующей области. Белок HvWRKY38 представляет собой полипептид SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12 или его функциональный гомолог, а ген HvWRKY38 дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно

характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12. Согласно одному варианту осуществления растение ячменя с полной потерей функции HvWRKY38 может не содержать мутантный белок HvWRKY38 или белок HvWRKY38 дикого типа в выявляемых количествах при выявлении с помощью стандартного вестерн-блоттинга.

Согласно одному варианту осуществления считается, что растение ячменя характеризуется потерей функции HvWRKY38, если можно наблюдать повышенный уровень экспрессии с промотора, содержащего tandemно повторяющийся W-бокс. Таким образом, потерю функции HvWRKY38 можно определять с использованием транзientной трансфекции репортерной конструкцией, содержащей репортерный ген (например, люциферазы) под контролем промотора гена α -амилазы, например, гена *Amy2-1*. Такую конструкцию можно получать таким же образом, что и в случае конструкций, описанных в Raventos et al., 1998, на стр. 23314 в разделе «*Transient Gene Expression Assays in Onion Epidermal and Barley Aleurone Cells.*» Повышение люциферазной активности по меньшей мере на 10%, как, например, по меньшей мере на 25% после трансфекции указанной репортерной конструкцией клеток данного растения ячменя, по сравнению с таковой при трансфекции указанной репортерной конструкцией клеток растения ячменя с геном HvWRKY38 дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип, является показателем того, что указанное растение ячменя характеризуется потерей функции HvWRKY38.

Согласно одному варианту осуществления считается, что растение ячменя характеризуется потерей функции HvWRKY38, если указанное растение ячменя несет мутацию, приводящую в результате к образованию гена HvWRKY38, кодирующего мутантный белок HvWRKY38, в котором отсутствуют одна или несколько из следующих аминокислот:

- аминокислоты 200-206 SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12
- аминокислота 63 (Leu) SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12
- аминокислота 70 (Val) SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12
- аминокислота 77 (Leu) SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12
- аминокислота 84 (Val) SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12
- аминокислота 91 (Leu) SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12
- аминокислота 220 (Cys) SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12
- аминокислота 226 (Cys) SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12
- аминокислота 250 (His) SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12
- аминокислота 252 (His) SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12

Растение ячменя, несущее мутацию в гене HvWRKY38, обуславливающую потерю функции HvWRKY38, может нести разные типы мутаций, например, любую из описанных в этом разделе настоящего документа мутаций.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя несет мутацию в промоторной области гена HvWRKY38 или в интроне гена HvWRKY38, обуславливающую aberrantную транскрипцию мРНК HvWRKY38 и/или aberrantную трансляцию белка HvWRKY38. Такие растения ячменя могут, в частности, характеризоваться сниженными уровнями мРНК HvWRKY38, как описано в этом разделе настоящего документа выше, и/или сниженными уровнями белка HvWRKY38, как описано в этом разделе настоящего документа выше.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к делеции гена HvWRKY38.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена HvWRKY38, кодирующего мутантный белок HvWRKY38. Согласно одному варианту осуществления мутация может представлять собой мутацию, приводящую в результате к появлению преждевременного стоп-кодона. Согласно другому варианту осуществления мутация представляет собой мутацию в сайте сплайсинга гена HvWRKY38. Указанная мутация может обуславливать aberrantный сплайсинг мРНК HvWRKY38.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена HvWRKY38, кодирующего мутантный белок HvWRKY38, в котором отсутствует по меньшей мере одна из аминокислот, соответствующих аминокислотам 200-206, 220, 226, 250 и/или 252 SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12. Следует понимать, что в мутантном HvWRKY38, в котором отсутствуют по меньшей мере аминокислоты XX-YY, могут отсутствовать и другие аминокислоты, помимо аминокислот XX-YY.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя может содержать мутантный ген HvWRKY38, кодирующий мутантный белок HvWRKY38, в котором отсутствуют по меньшей мере аминокислоты 200-206 SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12. Согласно одному варианту осуществления растение ячменя может содержать мутантный ген HvWRKY38, кодирующий мутантный белок HvWRKY38, в котором отсутствует по меньшей мере одна из аминокислот 220, 226, 250 и/или 252 SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя может содержать мутантный ген HvWRKY38, кодирующий мутантный белок HvWRKY38, в котором

отсутствует по меньшей мере одна из аминокислот 63, 70, 77, 84 и/или 91 SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению может содержать мутантный ген *HvWRKY38*, кодирующий мутантный белок *HvWRKY38*, в котором отсутствуют по меньшей мере 102 наиболее близкие к С-концу аминокислоты, например, по меньшей мере 104 наиболее близкие к С-концу аминокислоты, как, например, по меньшей мере 128 наиболее близких к С-концу аминокислот, например, по меньшей мере 134 наиболее близкие к С-концу аминокислоты SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12. Например, растение ячменя может содержать мутантный ген *HvWRKY38*, кодирующий мутантный белок *HvWRKY38*, в котором отсутствуют по меньшей мере 154 наиболее близкие к С-концу аминокислоты SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению может содержать мутантный ген *HvWRKY38*, кодирующий усеченный белок *HvWRKY38*, содержащий N-концевой фрагмент *HvWRKY38*, содержащий не более 251 N-концевой аминокислоты SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12, например, не более 249 N-концевых аминокислот SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12, как, например, не более 225 N-концевых аминокислот SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12, например, не более 219 N-концевых аминокислот SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12, предпочтительно не более 199 N-концевых аминокислот SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению может содержать мутантный ген *HvWRKY38*, несущий преждевременный стоп-кодон среди любых из кодонов 1-252, например, среди любых из кодонов 1-250, как, например, среди любых из кодонов 1-226, например, среди любых из кодонов 1-220, предпочтительно среди любых из кодонов 1-200. Например, растение ячменя может содержать мутантный ген *HvWRKY38*, несущий преждевременный стоп-кодон в положении кодона 200. Кодоны пронумерованы в соответствии с SEQ ID NO:10, начиная с 5'-конца, причем один кодон составляют 3 нуклеотида.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению содержит мутантный ген *HvWRKY38*, кодирующий мутантный белок *HvWRKY38* с мутацией W200stop SEQ ID NO:11 или 12. Согласно одному предпочтительному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению содержит мутантный ген *HvWRKY38*, кодирующий полипептид SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:14, в которой аминокислота 98 представляет собой Met. В частности, указанное растение ячменя может предусматривать мутацию G→A по нуклеотиду 600 кодирующей последовательности *HvWRKY38* SEQ ID NO:10. Например, растение ячменя может

содержать мутантный ген HvWRKY38, содержащий кодирующую последовательность SEQ ID NO:13.

Растение ячменя

Растение ячменя, несущее мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*, в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой любое растение вида *Hordeum vulgare*, включая любую линию скрещивания, или сорт, или разновидность.

«Дикий ячмень», *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*, считается прародителем существующих в настоящее время культурных форм ячменя. Окультуренные, но гетерогенные сочетания ячменя, называют местными сортами ячменя. В настоящее время большинство местных сортов в передовых земледельческих хозяйствах были вытеснены сортами, представляющими собой чистые линии. По сравнению с местными сортами современные сорта ячменя обладают рядом улучшенных свойств (Nevo, 1992; Pelger et al., 1992).

В настоящем изобретении термин «растение ячменя» предусматривает любое растение ячменя, как, например, местные сорта ячменя или современные сорта ячменя. Таким образом, настоящее изобретение относится к любому растению ячменя, предусматривающему мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*, например, любую из описанных в настоящем документе мутаций.

Однако предпочтительными растениями ячменя для применения в отношении настоящего изобретения являются современные сорта ячменя или чистые линии. Сорт ячменя, подлежащий применению в отношении настоящего изобретения, например, может быть выбран из группы, состоящей из Paustian, Sebastian, Quench, Celeste, Lux, Prestige, Saloon, Neruda, Harrington, Klages, Manley, Schooner, Stirling, Clipper, Franklin, Alexis, Blenheim, Ariel, Lenka, Maresi, Steffi, Gimpel, Cheri, Krona, Camargue, Chariot, Derkado, Prisma, Union, Beka, Kym, Asahi 5, KOU A, Swan Hals, Kanto Nakate Gold, Hakata No. 2, Kirin Choku No. 1, позднеспелого сорта Kanto Gold, Fuji Nijo, New Golden, Satukio Nijo, Seijo No. 17, Akagi Nijo, Azuma Golden, Amagi Nijpo, Nishino Gold, Misato golden, Haruna Nijo, Scarlett, Rosalina и Jersey, предпочтительно из группы, состоящей из Haruna Nijo, Sebastian, Quench, Celeste, Lux, Prestige, Saloon, Neruda и Power, предпочтительно из группы, состоящей из Paustian, Harrington, Klages, Manley, Schooner, Stirling, Clipper, Franklin, Alexis, Blenheim, Ariel, Lenka, Maresi, Steffi, Gimpel, Cheri, Krona, Camargue, Chariot, Derkado, Prisma, Union, Beka, Kym, Asahi 5, KOU A, Swan Hals, Kanto Nakate Gold, Hakata No. 2, Kirin

Choku No. 1, позднеспелого сорта Kanto Gold, Fuji Nijo, New Golden, Satukio Nijo, Seijo No. 17, Akagi Nijo, Azuma Golden, Amagi Nijpo, Nishino Gold, Misato golden, Haruna Nijo, Scarlett и Jersey, предпочтительно из группы, состоящей из Paustian, Haruna Nijo, Sebastian, Tangent, Lux, Prestige, Saloon, Neruda, Power, Quench, NFC Tipple, Barke, Class, Vintage, Applaus, Bowie, Broadway, Champ, Chanson, Charles, Chimbon, Cosmopolitan, Crossway, Dragoon, Ellinor, Embrace, Etoile, Evergreen, Flair, Highway, KWS Beckie, KWS Cantton, KWS Coralie, KWS Fantex, KWS Irina, KWS Josie, KWS Kellie, LG Diablo, LG Figaro, LG Nabuco, LG Tomahawk, Laureate, Laurikka, Lauxana, Luther, Odyssey, Ovation, Prospect, RGT Elysium, RGT Observer, RGT Planet, Rotator, Sarbi, Scholar, Subway и Golden Promise.

Растение ячменя может находиться в любой подходящей форме. Например, растение ячменя в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой жизнеспособное растение ячменя, высушенное растение, гомогенизированное растение или молотое ядро зерна ячменя. Растение может представлять собой зрелое растение, зародыш, ядро зерна, пророщенное ядро зерна, осоложенное ядро зерна (например, в форме зеленого солода или высушенного в печи солода), молотое осоложенное ядро зерна, молотое ядро зерна и т. д.

Части растений ячменя могут представлять собой любую подходящую часть растения, такую как ядра зерен, зародыши, листья, стебли, корни, цветки или их фрагменты. Фрагмент может представлять собой, например, сегмент ядра зерна, зародыша, листа, стебля, корня или цветка. Части растений ячменя также могут представлять собой фракцию гомогената или фракцию измельченного растения ячменя или молотого ядра зерна.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения части растений ячменя могут представлять собой клетки указанного растения ячменя, такие как жизнеспособные клетки, которые могут быть размножены *in vitro* в тканевых культурах. Однако согласно другим вариантам осуществления части растений ячменя могут представлять собой жизнеспособные клетки, которые не способны к развитию в целое растение ячменя, т. е. клетки, которые не являются материалом для размножения.

Характеристики растений ячменя по настоящему изобретению

Настоящее изобретение относится к растениям ячменя, несущим мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*. Одним из основных преимуществ таких растений ячменя является повышение активности α -амилазы. В частности, указанные растения ячменя могут характеризоваться повышением активности α -амилазы в ядрах зерен на ранних стадиях прорастания.

Активность α -амилазы растений ячменя подвергается четкой регуляции. В ходе прорастания активность α -амилазы способствует превращению крахмала в сахар. Однако в другие моменты времени развития растения, например, в процессе налива зерна, активность α -амилазы является нежелательной, поскольку может привести в результате к снижению налива зерна, снижению содержания крахмала, высуханию зерен и/или предуборочному прорастанию.

При этом растения ячменя по настоящему изобретению также характеризуются наличием надлежащих агрономических качеств, таких как агрономические качества, сопоставимые с таковыми ячменя дикого типа. Таким образом, например, может быть предпочтительно, чтобы растения ячменя характеризовались высокой урожайностью, например, урожайностью, сопоставимой с урожайностью современных высокоурожайных сортов, таких как cv. Planet.

Следовательно, одним из аспектов настоящего изобретения является обеспечение растениями ячменя, которые характеризуются повышенной активностью α -амилазы в ходе прорастания, но которые при этом характеризуются надлежащей пригодностью растений.

В частности, растения ячменя по настоящему изобретению, несущие любую из описанных в настоящем документе мутаций, могут характеризоваться урожайностью, которая составляет по меньшей мере 90% от урожайности растения ячменя, не предусматривающего указанную мутацию, но в остальном имеющего тот же генотип. Растения ячменя по настоящему изобретению, несущие мутацию в гене *HvHRT*, могут, например, характеризоваться урожайностью, которая составляет по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% от урожайности растения ячменя, содержащего ген *HvHRT* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Растения ячменя по настоящему изобретению, несущие мутацию в гене *HvHBL12*, могут, например, характеризоваться урожайностью, которая составляет по меньшей мере 90% от урожайности растения ячменя, содержащего ген *HvHBL12* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип.

Таким образом, растения ячменя в соответствии с настоящим изобретением могут характеризоваться весом 1000 зерен (TKW), составляющим по меньшей мере 38 г, как, например, по меньшей мере 40 г. В частности, растения ячменя по настоящему изобретению, несущие любую из описанных в настоящем документе мутаций, могут характеризоваться TKW, который составляет по меньшей мере 90% от TKW растения ячменя, не предусматривающего указанную мутацию, но в остальном имеющего тот же генотип. Растения ячменя по настоящему изобретению, несущие мутацию в гене *HvHRT*, могут, например, характеризоваться TKW, который составляет по меньшей мере 90%, как,

например, по меньшей мере 95% от ТКW растения ячменя, содержащего ген *HvHRT* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Растения ячменя по настоящему изобретению, несущие мутацию в гене *HvHBL12*, могут, например, характеризоваться ТКW, который составляет по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 95% от ТКW растения ячменя, содержащего ген *HvHBL12* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип.

Растения ячменя в соответствии с настоящим изобретением могут характеризоваться содержанием крахмала по меньшей мере 55% вес/вес, как, например, по меньшей мере 60% вес/вес. Процентная доля представлена как % сухого веса крахмала от общего сухого веса зерна. В частности, растения ячменя по настоящему изобретению, несущие любую из описанных в настоящем документе мутаций, могут характеризоваться содержанием крахмала, которое составляет по меньшей мере 90% от содержания крахмала растения ячменя, не предусматривающего указанную мутацию, но в остальном имеющего тот же генотип. Растения ячменя по настоящему изобретению, несущие мутацию в гене *HvHRT*, могут, например, характеризоваться содержанием крахмала, которое составляет по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 95% от содержания крахмала растения ячменя, содержащего ген *HvHRT* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Растения ячменя по настоящему изобретению, несущие мутацию в гене *HvHBL12*, могут, например, характеризоваться содержанием крахмала, которое составляет по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 95% от содержания крахмала растения ячменя, содержащего ген *HvHBL12* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип.

Растения ячменя в соответствии с настоящим изобретением могут характеризоваться содержанием белка по меньшей мере 9,5% вес/вес. Процентная доля представлена как % сухого веса белка от общего сухого веса зерна. В частности, растения ячменя по настоящему изобретению, несущие любую из описанных в настоящем документе мутаций, могут характеризоваться содержанием белка, которое составляет по меньшей мере 90% от содержания белка растения ячменя, не предусматривающего указанную мутацию, но в остальном имеющего тот же генотип. Растения ячменя по настоящему изобретению, несущие мутацию в гене *HvHRT*, могут, например, характеризоваться содержанием белка, которое составляет по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 95% от содержания белка растения ячменя, содержащего ген *HvHRT* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Растения ячменя по настоящему изобретению, несущие мутацию в гене *HvHBL12*, могут, например, характеризоваться содержанием белка, которое составляет по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 95% от

содержания белка растения ячменя, содержащего ген *HvHBL12* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип.

Растения ячменя по настоящему изобретению, несущие любую из описанных в настоящем документе мутаций, могут иметь высоту, которая составляет по меньшей мере 90% от высоты растения ячменя, не предусматривающего указанную мутацию, но в остальном имеющего тот же генотип. Растения ячменя по настоящему изобретению, несущие мутацию в гене *HvHRT*, могут, например, иметь высоту, которая составляет по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 95% от высоты растения ячменя, содержащего ген *HvHRT* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Растения ячменя по настоящему изобретению, несущие мутацию в гене *HvHBL12*, могут, например, иметь высоту, которая составляет по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 95% от высоты растения ячменя, содержащего ген *HvHBL12* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип.

Снижение уровней гибберелловой кислоты в растениях ячменя, как было описано, ассоциировано с более высоким числом колосьев. Таким образом, мутант *sdw1/denso* ячменя характеризуется сниженным уровнем экспрессии генов, участвующих в биосинтезе ГА, и повышенным числом колосьев на единицу площади (Jia et al., 2011). Следовательно, существует риск, что растения ячменя с повышенными уровнями ГА будут характеризоваться сниженным числом колосьев. Однако растения ячменя по настоящему изобретению предпочтительно характеризуются примерно таким же числом колосьев, что и растения ячменя дикого типа. Таким образом, растения ячменя по настоящему изобретению, несущие любую из описанных в настоящем документе мутаций, могут характеризоваться числом колосьев/м², которое составляет по меньшей мере 90% от числа колосьев/м² растения ячменя, не предусматривающего указанную мутацию, но в остальном имеющего тот же генотип. Растения ячменя по настоящему изобретению, несущие мутацию в гене *HvHRT*, могут, например, характеризоваться числом колосьев/м², которое составляет по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 95% от числа колосьев/м² растения ячменя, содержащего ген *HvHRT* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Растения ячменя по настоящему изобретению, несущие мутацию в гене *HvHBL12*, могут, например, характеризоваться числом колосьев/м², которое составляет по меньшей мере 90%, как, например, по меньшей мере 95% от числа колосьев/м² растения ячменя, содержащего ген *HvHBL12* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип.

Растения ячменя в соответствии с настоящим изобретением, несущие любую из описанных в настоящем документе мутаций, предпочтительно не подвергаются предуборочному прорастанию. В частности, растения ячменя по настоящему изобретению

характеризуются процентом всхожести ядер зерен, собранных с растений ячменя, подвергавшихся регулярному опрыскиванию водой в течение 20 дней, который является таким же или превышает процент всхожести растения ячменя того же вида, не подвергавшегося указанному опрыскиванию и собранного в состоянии спелости. В частности, растения ячменя в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно не подвергаются предуборочному прорастанию при определении способом, описанным в настоящем документе ниже в примере 3В.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению характеризуется активностью α -амилазы, составляющей по меньшей мере 16 Ед/г спустя 48 ч после инициации прорастания.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению характеризуется активностью α -амилазы, составляющей по меньшей мере 4 Ед/г спустя 48 ч и/или по меньшей мере 7 Ед/г спустя 72 ч после инициации прорастания, в случае, когда указанные растения ячменя были пророщены при погружении в воду с потоком воздуха 9 л/ч. Это, например, может быть справедливо в случае растений ячменя, несущих мутацию в гене *HvHRT*.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению характеризуется активностью α -амилазы, составляющей по меньшей мере 15 Ед/г спустя 48 ч и/или по меньшей мере 20 Ед/г спустя 72 ч после инициации прорастания, в случае, когда указанные растения ячменя были пророщены при погружении в воду с потоком воздуха 9 л/ч. Это, например, может быть справедливо в случае растений ячменя, несущих мутацию в гене *HvHBL12*.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению характеризуется активностью α -амилазы, составляющей по меньшей мере 6 Ед/г спустя 72 ч после инициации прорастания, в случае, когда указанные растения ячменя были пророщены при погружении в воду без потока воздуха. Это, например, может быть справедливо в случае растений ячменя, несущих мутацию в гене *HvHRT*.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению характеризуется активностью α -амилазы, составляющей по меньшей мере 4 Ед/г спустя 48 ч и/или по меньшей мере 14 Ед/г спустя 72 ч после инициации прорастания, в случае, когда указанные растения ячменя были пророщены при погружении в воду без потока воздуха. Это, например, может быть справедливо в случае растений ячменя, несущих мутацию в гене *HvHBL12*, или растений ячменя, несущих по меньшей мере четыре гена α -амилазы, содержащих промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-блок.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению характеризуется активностью α -амилазы спустя 48 ч после инициации прорастания, которая составляет по меньшей мере 105%, как, например, по меньшей мере 110%, например, по меньшей мере 120% активности α -амилазы у растения ячменя, которое не несет указанной мутации, но в остальном имеет тот же генотип.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению характеризуется активностью α -амилазы спустя 72 ч после инициации прорастания, которая составляет по меньшей мере 120%, как, например, по меньшей мере 150%, например, по меньшей мере 170% активности α -амилазы у растения ячменя, которое не несет указанной мутации, но в остальном имеет тот же генотип. Это, в частности, может быть справедливо в случае растений ячменя, несущих мутацию в *HvHRT*, такую как любая из описанных в настоящем документе мутаций.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению характеризуется активностью α -амилазы спустя 72 ч после инициации прорастания, которая составляет по меньшей мере 120%, например, по меньшей мере 150%, как, например, по меньшей мере 170% активности α -амилазы растения ячменя, которое не несет указанной мутации, но в остальном имеет тот же генотип, в случае проращивания при погружении в воду без аэрации. Это, в частности, может быть справедливо в случае растений ячменя, несущих мутацию в *HvHBL12*, такую как любая из описанных в настоящем документе мутаций.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению характеризуется активностью α -амилазы спустя 72 ч после инициации прорастания, которая составляет по меньшей мере 150%, как, например, по меньшей мере 200%, например, по меньшей мере 300% активности α -амилазы растения ячменя, которое не несет указанной мутации, но в остальном имеет тот же генотип, в случае проращивания при погружении в воду без аэрации. Это, в частности, может быть справедливо в случае растений ячменя, несущих по меньшей мере четыре гена α -амилазы, содержащих промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, такой как любой из описанных в настоящем документе.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению является голозерным растением ячменя, и при этом указанное растение ячменя характеризуется активностью α -амилазы, составляющей по меньшей мере 140 Ед/г, как, например, по меньшей мере 150 Ед/г, например, по меньшей мере 160 Ед/г, как, например, по меньшей мере 170 Ед/г спустя 48 ч после инициации прорастания. Согласно одному варианту осуществления растение ячменя является голозерным растением ячменя,

и при этом указанное растение ячменя характеризуется активностью α -амилазы, составляющей по меньшей мере 100 Ед/г, как, например, по меньшей мере 110 Ед/г спустя 48 ч после инициации прорастания.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя является голозерным растением ячменя и характеризуется активностью предельной декстриназы, составляющей по меньшей мере 30 мЕд/г, как, например, по меньшей мере 35 мЕд/г, например, по меньшей мере 40 мЕд/г спустя 48 ч после инициации прорастания. Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению характеризуется активностью предельной декстриназы, составляющей по меньшей мере 20 мЕд/г спустя 48 ч после инициации прорастания.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя является пленчатым растением ячменя, которое характеризуется активностью α -амилазы, составляющей по меньшей мере 140 Ед/г, как, например, по меньшей мере 150 Ед/г, например, по меньшей мере 160 Ед/г, как, например, по меньшей мере 170 Ед/г спустя 48 ч после инициации прорастания, при условии, что по меньшей мере часть пленки была удалена с ядер зерен ячменя до инициации прорастания. Согласно одному варианту осуществления растение ячменя является пленчатым растением ячменя, которое характеризуется активностью α -амилазы, составляющей по меньшей мере 100 Ед/г, как, например, по меньшей мере 110 Ед/г спустя 48 ч после инициации прорастания, при условии, что по меньшей мере часть пленки была удалена с ядер зерен ячменя до инициации прорастания. Согласно одному варианту осуществления растение ячменя является пленчатым растением ячменя, которое характеризуется активностью предельной декстриназы, составляющей по меньшей мере 30 мЕд/г, как, например, по меньшей мере 35 мЕд/г, например, по меньшей мере 40 мЕд/г спустя 48 ч после инициации прорастания, при условии, что по меньшей мере часть пленки была удалена с ядер зерен ячменя до инициации прорастания. Согласно одному варианту осуществления растение ячменя является пленчатым растением ячменя, которое характеризуется активностью предельной декстриназы, составляющей по меньшей мере 20 мЕд/г, при условии, что по меньшей мере часть пленки была удалена с ядер зерен ячменя до инициации прорастания. Например, указанная пленка может быть удалена с помощью механической обработки. Указанная пленка может быть удалена с помощью механической обработки способом, например, обеспечивающим в результате снижение общего веса ядер зерен ячменя по меньшей мере на 2%, как, например, по меньшей мере на 3%, например, на значение в диапазоне 3-6%.

Согласно одному варианту осуществления растения ячменя по настоящему изобретению могут характеризоваться улучшенной способностью к прорастанию в стрессовых условиях. Таким образом, согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 75% ядер зерен указанного растения ячменя прорастают в условиях с высоким содержанием воды, например, при определении способом, описанным в примере 3С.

Растения ячменя, предусматривающее более чем одну мутацию

Настоящее изобретение также относится к растениям ячменя, предусматривающим более чем одну мутацию. Следовательно, растения ячменя по настоящему изобретению могут предусматривать одну или несколько из следующих мутаций:

- мутация в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, например, любая из мутаций, описанных в настоящем документе выше в разделе «А-амилаза и растения ячменя, несущие мутацию в промоторе гена α -амилазы»,
- мутация в гене *HvHRT*, например, любая из мутаций, описанных в настоящем документе выше в разделе «Растение ячменя, несущее мутацию в гене *HRT*»
- мутация в гене *HvHBL12*, например, любая из мутаций, описанных в настоящем документе выше в разделе «Растение ячменя, несущее мутацию в гене *HvHBL12*»
- мутация в гене *HvWRKY38*, например, любая из мутаций, описанных в настоящем документе выше в разделе «Растение ячменя, несущее мутацию в гене *WRKY38*»

В дополнение к описанным в настоящем документе мутациям, растения ячменя могут также предусматривать одну или несколько дополнительных мутаций. Следовательно, растение ячменя может предусматривать одну или несколько из следующих мутаций.

В дополнение к одной или нескольким из описанных выше мутаций, растение ячменя может также предусматривать мутацию в кодирующем LOX-1 гене, приводящую в результате к полной потере функционального LOX-1. Указанная мутация, например, может представлять собой любую из мутаций, описанных в международной заявке на патент WO 2005/087934. Например, растение ячменя может содержать кодирующий LOX-1 ген, предусматривающий преждевременный стоп-кодон, причем указанный кодон соответствует основаниям №№ 3572-3574 SEQ ID NO:2 из WO 2005/087934, или мутацию сайта сплайсинга, причем указанная мутация соответствует основанию № 2311 SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO:2 из WO 2005/087934.

В дополнение к одной или нескольким из описанных выше мутаций, растение ячменя может также предусматривать мутацию в кодирующем LOX-2 гене, приводящую в результате к полной потере функционального LOX-2. Указанная мутация, например, может представлять собой любую из мутаций, описанных в международной заявке на патент WO 2010/075860. Например, растение ячменя может содержать кодирующий LOX-2 ген, предусматривающий мутацию в нуклеотидном положении 2689 SEQ ID NO:1 из WO 2010/075860, обуславливающую появление преждевременного стоп-кодона.

В дополнение к одной или нескольким из описанных выше мутаций, растение ячменя может также предусматривать мутацию в кодирующем MMT гене, приводящую в результате к полной потере функционального MMT. Указанная мутация, например, может представлять собой любую из мутаций, описанных в международной заявке на патент WO 2010/063288. Например, растение ячменя может содержать кодирующий MMT ген, предусматривающий мутацию G→A по основанию № 3076 SEQ ID NO:3 из WO 2010/063288, или кодирующий MMT ген, предусматривающий мутацию G→A по основанию № 1462 SEQ ID NO:16 из WO 2010/063288.

В дополнение к одной или нескольким из описанных выше мутаций, растение ячменя может также предусматривать мутацию в кодирующем CslF6 гене, причем указанный мутантный ген кодирует мутантный белок CslF6 со сниженной активностью CslF6. Указанная мутация может представлять собой, например, любую из мутаций, описанных в родственной заявке под названием «Злаковые растения с улучшенными свойствами клеточной стенки» («Cereal plants with improved cell wall properties»), принадлежащей тому же заявителю, и имеющей ту же дату подачи, что и настоящая заявка. Например, растение ячменя может содержать кодирующий CslF6 ген, кодирующий мутантный CslF6, предусматривающий мутацию G847E, или мутацию G748D, или мутацию T709I SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3 из указанной родственной заявки. SEQ ID NO:1 из указанной родственной заявки имеет номер доступа в GenBank NCBI: EU267181.1.

Продукты растительного происхождения

Настоящее изобретение также относится к продуктам растительного происхождения, полученным из растения ячменя, несущего мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*, например, любого из описанных в настоящем документе растений ячменя.

Продукт растительного происхождения может представлять собой любой полученный из растения ячменя продукт, например, продукт питания, кормовой продукт или напиток. Таким образом, продукт растительного происхождения может представлять

собой любой из напитков, описанных в настоящем документе ниже в разделе «Напиток и способ его получения». Продукт растительного происхождения также может представлять собой водный экстракт растения ячменя и/или солода, полученных из ядер зерен указанного растения ячменя, например, продукт растительного происхождения может представлять собой сусло. Указанный водный экстракт можно получать, например, как описано в настоящем документе ниже в разделе «Водный экстракт и способы его получения».

Согласно одному варианту осуществления продукт растительного происхождения может представлять собой солод, например, зеленый солод или высушенный в печи солод, такой как любой из видов солода, описанных в настоящем документе ниже в разделе «Зеленый солод, солод и способы их получения», или продукты на основе солода, такие как напитки на основе солода. Хотя основным назначением зеленого солода и/или высушенного в печи солода является получение напитка, он также может быть использован в других производственных процессах, например, в качестве источника ферментов в хлебопекарной промышленности или в пищевой промышленности в качестве вкусоароматического вещества и красителя, например, в форме солода, или солодовой муки, или опосредованно в виде солодового сиропа и т. д. Таким образом, продукт растительного происхождения в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой любой из вышеупомянутых продуктов.

Согласно другому аспекту продукты растительного происхождения в соответствии с настоящим изобретением содержат сироп или даже состоят из него, как, например, ячменный сироп или сироп из ячменного солода. Продукт растительного происхождения также может представлять собой экстракт ячменя или солода. Таким образом, продукт растительного происхождения может представлять собой сусло.

Зеленый солод, высушенный в печи солод и способы их получения

Настоящее изобретение также относится к солоду, полученному из растения ячменя, несущего мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*, например, любого из описанных в настоящем документе растений ячменя. Указанный солод может представлять собой зеленый солод или высушенный в печи солод, полученный из зерен ячменя растения ячменя, несущего мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*. Указанная мутация может представлять собой любую из описанных в настоящем документе выше мутаций.

Зеленый солод можно получать путем солодования, т. е. путем проращивания злаковых зерен в контролируемых условиях окружающей среды. Обычно указанное проращивание может предусматривать стадию замачивания ядер зерен ячменя с последующим осуществлением стадии проращивания. Замачивание и проращивание также можно осуществлять одновременно или частично одновременно. Согласно некоторым вариантам осуществления получение солода может предусматривать стадию сушки пророщенных зерен. Указанная стадия сушки предпочтительно может представлять собой печную сушку пророщенных ядер зерен при повышенных температурах. Таким образом, высушенный в печи солод можно получать, подвергая зеленый солод стадии печной сушки.

Таким образом, согласно одному варианту осуществления способ солодования может предусматривать стадии:

(a) обеспечения ядер зерен растения ячменя, в частности, растения ячменя, несущего мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*;

(b) замачивания указанных ядер зерен ячменя;

(b) проращивания указанного ядра зерна ячменя; и

(c) сушки указанных пророщенных ядер зерен ячменя, предпочтительно с помощью печной сушки.

Пророщенные зерна ячменя можно получать с помощью способа, предусматривающего стадии:

(a) обеспечения ядер зерен растения ячменя, в частности, растения ячменя, несущего мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*;

(b) замачивания указанных ядер зерен ячменя;

(b) проращивания указанного ядра зерна ячменя.

Стадии замачивания и проращивания можно осуществлять последовательно, одновременно или частично одновременно.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления замачивание и проращивание осуществляют одновременно в рамках процесса проращивания, который предусматривает выдерживание зерен ячменя в водном растворе, обычно с аэрацией, в течение не более 72 ч.

Замачивание можно осуществлять с помощью любого известного специалисту в данной области стандартного способа. Один из неограничивающих примеров включает замачивание при температуре в диапазоне 10-25°C с чередованием сухих и влажных условий. В ходе замачивания, например, ядра зерен ячменя можно выдерживать во влажном

состоянии в течение времени в диапазоне от 30 мин до 3 ч с последующим выдерживанием в сухом состоянии в течение времени в диапазоне от 30 мин до 3 ч, и необязательно с повторением указанной схемы выдерживания в диапазоне от 2 до 5 раз. Конечное содержание воды после замачивания может, например, находиться в диапазоне от 40 до 50%, например, в диапазоне 40-45%.

Представленные в настоящем изобретении растения ячменя характеризуются тем, что они несут мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*. Одним из основных преимуществ таких растений ячменя является повышенная активность гидролитических ферментов, таких как α -амилаза и предельная декстриназа, в ходе прорастания. Зерна таких растений ячменя могут быть успешно пророщены в ходе короткого способа проращивания, поскольку одной из целей солодования является индукция достаточной активности гидролитических ферментов. Интересно, что растения ячменя по настоящему изобретению характеризуются определенным уровнем активности гидролитических ферментов на ранних стадиях прорастания, что позволяет применять короткие способы проращивания.

Примеры пригодных коротких способов проращивания описаны в международной заявке на патент PCT/EP2017/065498, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Одним из примеров пригодного короткого способа проращивания является способ проращивания, предусматривающий стадию, на которой зерна ячменя выдерживают в водном растворе, обычно с аэрацией, причем весь способ проращивания осуществляется не более чем за 72 ч.

Как описано выше, проращивание может предусматривать стадию выдерживания зерен растения ячменя, несущего мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*, в водном растворе с аэрацией. Зерна ячменя можно выдерживать в указанном водном растворе в течение достаточного периода времени для обеспечения прорастания большинства указанных зерен ячменя. Зерна ячменя также можно выдерживать в указанном водном растворе в течение достаточного периода времени с целью получения содержания воды по меньшей мере 35%, предпочтительно по меньшей мере 37%, например, в диапазоне 35-60%. Обычно зерна ячменя выдерживают в водном растворе в течение по меньшей мере 20 ч, как, например, по меньшей мере 24 ч. Обычно зерна выдерживают в указанном водном растворе в течение не более 72 ч, как, например, не более 60 ч, например, в течение не более 48 ч. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления зерна ячменя выдерживают в указанном водном растворе в течение времени в диапазоне 20-72 ч, как, например, в течение времени

в диапазоне 20-60 ч, например, в течение времени в диапазоне 20-48 ч, например, в течение времени в диапазоне 20-30 ч, как, например, в течение времени в диапазоне 22-26 ч.

Может быть предпочтительно, чтобы зерна ячменя были полностью покрыты указанным водным раствором в течение всей выдержки.

Указанные зерна ячменя зачастую выдерживают в указанном водном растворе, при этом через водный раствор пропускают O_2 . Указанный O_2 можно добавлять в указанный водный раствор в виде чистого O_2 . Однако зачастую указанный O_2 содержится в смеси газов. Согласно одному варианту осуществления указанный O_2 содержится в атмосферном воздухе.

В целом через указанный водный раствор пропускают по меньшей мере 2 л, предпочтительно по меньшей мере 3 л, более предпочтительно по меньшей мере 4 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 5 л, даже более предпочтительно по меньшей мере 6 л O_2 на кг зерен ячменя в ч. Вес указанных зерен ячменя представляет собой сухой вес. Например, через смесь указанного водного раствора/зерна ячменя пропускают O_2 в количестве, находящемся в диапазоне 2-100 л, например, в диапазоне 2-75 л, как, например, в диапазоне 2-50 л, например, в диапазоне 4-100 л, например, в диапазоне 4-75 л, как, например, в диапазоне 4-50 л, например, в диапазоне 6-100 л, например, в диапазоне 6-75 л, как, например, в диапазоне 6-50 л на кг зерен ячменя (сухой вес) в ч.

Как отмечалось выше, зачастую он находится в составе атмосферного воздуха, который пропускают через водный раствор. Таким образом, способ может предусматривать пропускание через указанный водный раствор по меньшей мере 10 л, предпочтительно по меньшей мере 15 л, более предпочтительно по меньшей мере 20 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 25 л, даже более предпочтительно по меньшей мере 30 л атмосферного воздуха на кг зерен ячменя в ч. Вес указанных зерен ячменя представляет собой сухой вес. Например, через указанный водный раствор пропускают атмосферный воздух в количестве, находящемся в диапазоне 10-500 л, например, в диапазоне 10-375 л, как, например, в диапазоне 10-250 л, например, в диапазоне 20-500 л, например, в диапазоне 20-375 л, как, например, в диапазоне 20-250 л, например, в диапазоне 30-500 л, например, в диапазоне 30-375 л, как, например, в диапазоне 30-250 л на кг зерен ячменя (сухой вес) в ч.

Согласно некоторым вариантам осуществления стадия проращивания предусматривает:

а. по меньшей мере одну стадию выдерживания указанных ядер зерен в водном растворе, причем через указанный водный раствор пропускают по меньшей мере 2 л O_2 на кг сухого веса ядер зерен ячменя в ч; и

b. по меньшей мере одну стадию выдерживания указанных ядер зерен ячменя на воздухе.

Согласно некоторым вариантам осуществления после выдержки зерен ячменя в указанном водном растворе зерна ячменя характеризуются содержанием воды по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 30%, например, в диапазоне 30-60%, как, например, в диапазоне 30-50%, например, в диапазоне 30-60%, как, например, в диапазоне 30-50%.

В ходе указанной стадии выдерживания указанных ядер зерен ячменя на воздухе, через указанные ядра зерен ячменя можно пропускать по меньшей мере 2 л O₂ на кг сухого веса ядер зерен ячменя в ч. Например, аналогичное количество O₂ можно пропускать через ядра зерен ячменя в ходе выдержки на воздухе, как и в ходе выдержки в указанном водном растворе, как описано выше.

Полученные с помощью такого способа пророщенные ядра зерен ячменя в настоящем документе также называют зеленым солодом.

Содержание воды зерен ячменя можно определять путем определения веса зерен ячменя с последующей сушкой указанных зерен ячменя и определением веса высушенных зерен ячменя. Разница в весе между влажными и сухими зернами ячменя приходится на воду, а содержание воды получают как вес воды, деленный на общий вес зерен ячменя (влажных зерен ячменя). Таким образом, содержание воды, представленное как %, является вес/вес%.

Зерно ячменя можно выдерживать при любой пригодной температуре, однако может быть предпочтительно, чтобы выдержка осуществлялась при температуре, достаточно высокой для обеспечения быстрого увеличения содержания воды.

В частности, согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых зерна ячменя выдерживают при температуре в диапазоне 20-30°C, указанные зерна ячменя можно выдерживать в течение времени в диапазоне 20-48 ч.

Проращивание зерен также можно осуществлять с помощью любого известного специалисту в данной области стандартного способа. Один из неограничивающих примеров включает проращивание при температуре в диапазоне 10-25°C, необязательно с изменением температуры с интервалом в диапазоне 1-4 дня.

Как упоминалось выше, согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения пророщенные зерна ячменя (т. е. зеленый солод) можно подвергать печной сушке. Согласно некоторым вариантам осуществления предпочтительно, чтобы зеленый солод не подвергался печной сушке. В частности, предпочтительно, чтобы в том случае, если зеленый солод получают путем проращивания, предусматривающего стадию

выдерживания указанных зерен ячменя в водном растворе с аэрацией, зеленый солод не подвергался печной сушке.

Если зеленый солод подвергают печной сушке, ее можно выполнять при стандартных температурах, как, например, по меньшей мере 75°C, например, в диапазоне 80-90°C, как, например, в диапазоне 80-85°C. Таким образом, солод, например, можно получать с помощью любого из способов, описанных Hough et al. (1982). Однако для целей настоящего изобретения можно также применять любой другой подходящий способ получения солода, как, например, способы получения специального солода, включая без ограничения способы обжаривания солода.

Высушенный в печи солод и зеленый солод можно дополнительно обрабатывать, например, путем помола. Таким образом, продукт растительного происхождения в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой солод любого типа, такой как необработанный солод или молотый солод, такой как мука. Таким образом, продукт растительного происхождения может представлять собой, например, молотый, высушенный в печи солод или молотый зеленый солод. Молотый солод и мука из него содержат химические компоненты солода и мертвые клетки, которые утратили способность к повторному проращению.

Согласно некоторым вариантам осуществления ячмень представляет собой пленчатый ячмень, и способ предусматривает стадию удаления по меньшей мере части указанной пленки до выдерживания указанных ядер зерен в водном растворе. Пленчатые злаковые зерна можно обрабатывать с целью удаления пленки, подвергая злаковые зерна механической обработке, обеспечивающей удаление пленки. Указанная механическая обработка, например, может быть выбрана из группы, состоящей из полирования, абразивного шелушения, лущения и шлифования. Предпочтительно механическая обработка приводит в результате к потере пленки. Потеря пленки может быть определена как потеря относительно суммарного веса. Таким образом, механическая обработка предпочтительно приводит к потере 1-4%, как, например, к потере 1,5-3,0% общего веса злаковых зерен.

Водный экстракт и способы его получения

Настоящее изобретение относится к напиткам на основе ячменя, а также способам их получения, причем растение ячменя несет мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*, например, любую из описанных в настоящем документе мутаций. Настоящее изобретение также относится к водным экстрактам ядер зерен растений ячменя, несущих мутацию в одном или нескольких

промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*. Указанный водный экстракт можно получать, например, из зеленого солода или высушенного в печи солода.

Зачастую способы получения напитка предусматривают стадию получения водного экстракта ядер зерен растений ячменя по настоящему изобретению и/или видов солода, полученных из растений ячменя по настоящему изобретению.

Водный экстракт в обычном случае можно получать путем выдерживания ячменной муки, муки из зеленого солода и/или муки из высушенного в печи солода в воде или в водном растворе. Указанный водный раствор в настоящем документе также называют «раствором для затирания». В частности, водный экстракт можно получать путем затирания.

Настоящее изобретение также относится к способу получения водного экстракта, причем указанный способ предусматривает стадии:

a. обеспечения ядер зерен растения ячменя, причем указанное растение ячменя несет мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*, например, любую из описанных в настоящем документе мутаций;

b. подвержения ядер зерен ячменя стадии проращивания, с получением тем самым пророщенных ядер зерен, причем указанная стадия проращивания предусматривает выдерживание указанных ядер зерен в водном растворе не более 72 ч;

c. тонкого измельчения указанных пророщенных ядер зерен, при этом указанные пророщенные ядра зерен характеризуются содержанием воды по меньшей мере 20%, с условием, что указанные ядра зерен ячменя не характеризуются содержанием воды ниже 20 ни в один из моментов времени между стадиями b) и c);

d. получения водного экстракта указанных молотых пророщенных ядер зерен, с получением тем самым водного экстракта ячменя.

Стадия проращивания более подробно описана выше в разделе «Зеленый солод, высушенный в печи солод и способы их получения».

Обычно указанный раствор для затирания может представлять собой воду, такую как водопроводная вода, в которую можно добавлять одно или несколько дополнительных средств. Дополнительные средства могут присутствовать в водном растворе с самого начала, или они могут быть добавлены в ходе процесса получения водного экстракта. Указанные дополнительные средства могут представлять собой ферменты. Таким образом, раствор для затирания может содержать один или несколько ферментов. Указанные ферменты можно добавлять в водный раствор с самого начала или позже в ходе процесса.

Указанные ферменты могут представлять собой, например, один или несколько гидролитических ферментов. Подходящие ферменты включают липазы, разрушающие крахмал ферменты (например, амилазы), глюканызы [предпочтительно (1-4)- и/или (1,3;1,4)-β-глюканызы], и/или ксиланызы (такие как арабиноксиланызы), и/или протеазы, или смеси ферментов, содержащие один или несколько из вышеупомянутых ферментов, например, Cereflo, Ultraflo или Ondea Pro (Novozymes). Например, водный раствор может содержать один или несколько гидролитических ферментов, выбранных из группы, состоящей из α-амилазы, β-амилазы, предельной декстриназы, пуллуланызы, β-глюканызы (например, эндо-(1,3;1,4)-β-глюканызы или эндо-1,4-β-глюканызы), ксиланызы (например, эндо- или экзо-1,4-ксиленызы, арабинофуранозидазы или эстеразы феруловой кислоты), глюкоамилазы и протеазы.

Согласно одному варианту осуществления в указанный раствор для затириания добавляют лишь ограниченные количества α-амилазы, или вовсе ее не добавляют.

Согласно одному варианту осуществления в указанный раствор для затириания добавляют лишь ограниченные количества предельной декстриназы и пуллуланызы, или вовсе их не добавляют.

Указанные дополнительные средства, предпочтительно пищевого назначения, также могут представлять собой соль, например CaCl_2 , или кислоту, например H_3PO_4 .

Водный экстракт, как правило, получают путем выдержки ячменной муки, муки из зеленого солода и/или муки из высушенного в печи солода в растворе для затириания при одной или нескольких заданных температурах. Указанная заданная температура в настоящем документе также может называться «температурой затириания». Указанные температуры затириания могут представлять собой, например, стандартные температуры, применяемые для затириания. Температуру затириания обычно либо поддерживают постоянной (изотермическое затириание), либо постепенно увеличивают, например, последовательно увеличивают. В любом случае растворимые вещества в зернах ячменя и/или солоде высвобождаются в указанный раствор для затириания, в результате чего образуется водный экстракт.

Температура(-ы) затириания обычно представляет(-ют) собой температуру(-ы) в диапазоне 30-90°C, как, например, в диапазоне 40-85°C, например, в диапазоне 50-85°C. Зачастую выдержка с раствором для затириания включает конечную стадию нагревания до более высокой температуры, например, до температуры в диапазоне 75-80°C.

После выдержки в водном растворе, например, емкости для затириания, водный раствор можно переносить в другой контейнер, например, фильтрационный чан, и

выдерживать в течение дополнительного промежутка времени при повышенной температуре.

Неограничивающие примеры пригодных протоколов затирания можно найти в посвященной пивоварению литературе, например, в Hough et al. (выше).

Затирание (т. е. выдержка ячменной муки, муки из зеленого солода и/или муки из высушенного в печи солода в растворе для затирания) может происходить в присутствии добавок, которые, как считается, предусматривают любой источник углеводов, отличный от солода или пророщенных зерен ячменя, такой как без ограничения ячмень, ячменные сиропы или маис, или рис, либо в виде цельных ядер зерен, либо в виде продуктов переработки, таких как крупа, сиропы или крахмал. Все из вышеупомянутых добавок можно применять преимущественно как дополнительный источник экстракта (сиропы в ходе нагревания сусла обычно вводят дозированно). Требования касательно обработки добавки на пивоваренном заводе зависят от состояния и типа применяемой добавки.

После выдержки в растворе для затирания водный экстракт обычно можно разделять, например, посредством фильтрации с разделением на водный экстракт и остаточные не растворившиеся твердые частицы, последние также называют «дробинкой». Фильтрование можно осуществлять, например, в фильтрационном чане. В качестве альтернативы, фильтрование может представлять собой фильтрование через фильтр для отделения затора. Полученный таким образом водный экстракт также может называться «первым суслом». В ходе процесса, также называемого промыванием дробины, в дробину можно добавлять дополнительную жидкость, такую как вода. После промывания дробины и фильтрации может быть получено «второе сусло». Дополнительные фракции сусла можно получать путем повторения процедуры. Таким образом, водный экстракт может представлять собой сусло, например, первое сусло, второе сусло, дополнительное сусло или их комбинацию.

Согласно одному варианту осуществления способ получения водного экстракта можно осуществлять с применением любого из устройств, описанных в международной заявке на патент РСТ/EP2017/065498, например, любого из устройств, описанных в ней на стр. 20-22. Неограничивающий пример пригодного устройства представлен в настоящем документе на фиг. 12.

Напиток и способ его получения

Настоящее изобретение также относится к напиткам на основе ячменя и способам получения таких напитков, причем напитки получают из растения ячменя, несущего

мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*, например, любую из описанных в настоящем документе мутаций.

Указанный напиток может представлять собой алкогольные напитки на основе ячменя или безалкогольные напитки на основе ячменя. Алкогольные напитки на основе ячменя могут представлять собой, например, пиво или полученный путем перегонки спирт.

Указанное пиво может представлять собой пиво любого типа, например, лагер или эль. Таким образом, пиво, например, может быть выбрано из группы, состоящей из следующего: Альтбир, Амбер-эль, ячменное вино, Берлинер Вайссе, Бьер-де-Гард, горькое пиво, Блонд-эль, Бок, коричневый эль, калифорнийское обыкновенное пиво, сливочный эль, Дортмундер, Доппельбок, Дункель, Дункельвайцен, Айсбок, Фруктовый ламбик, Золотой эль, Гозе, Гез, Хефевайцен, Хеллес, Индийский пейл-эль, Кельш, Ламбик, светлый эль, Майбок, солодовый ликер, Майлд, Мартовское пиво, Старый эль, Фландрийский коричневый эль, Пейл-эль, Пильзнер, Портер, Красный эль, ржаное пиво, сезонное пиво, Шотландский эль, паровое пиво, Стаут, черное пиво, лагер, бельгийское белое пиво, пшеничное пиво и пшеничный бок.

Указанный полученный путем перегонки спирт может представлять собой полученный путем перегонки спирт любого типа. В частности, полученный путем перегонки спирт может быть получен на основе ячменя, например, ячменного солода. Неограничивающие примеры такого полученного путем перегонки спирта включают виски и водку.

Напиток может представлять собой безалкогольный напиток, такой как безалкогольный напиток на основе ячменя, например, безалкогольное пиво или безалкогольные солодовые напитки, такие как *Maltina*.

Например, напиток можно получать с помощью способа, предусматривающего стадии:

(i) обеспечения ядер зерен растения ячменя в соответствии с настоящим изобретением, и/или зеленого солода и/или высушенного в печи солода, полученного из ядер зерен растения ячменя в соответствии с настоящим изобретением

(ii) получения водного экстракта указанных ядер зерен, и/или указанного зеленого солода, и/или указанного высушенного в печи солода, например, как описано в настоящем документе выше в разделе «Получение водного экстракта»

(iii) переработки указанного водного экстракта в напиток.

Водный экстракт можно кипятить с хмелем или без него, после чего он может называться прокипяченным суслом. Первое, второе и дополнительное сусло можно

объединять, а затем подвергать кипячению. Водный экстракт можно кипятить в течение любого подходящего промежутка времени, например, в диапазоне от 60 мин до 120 мин.

Стадия (iii) может предусматривать:

- a. нагревание указанного водного экстракта, необязательно в присутствии хмеля или экстракта хмеля;
- b. охлаждение водного экстракта;
- c. сбраживание указанного водного экстракта с использованием дрожжей с получением тем самым получаемого при брожении напитка.

Стадия (iii), в частности, предусматривает сбраживание указанного водного экстракта, например, путем сбраживания суслу. Таким образом, напиток можно получать путем сбраживания водного экстракта с использованием дрожжей.

Сразу после получения водного экстракта, он может быть переработан в пиво с помощью любого способа, включая традиционные способы пивоварения. Неограниченные описания примеров подходящих способов пивоварения можно найти, например, в публикациях под авторством Hough et al. (1982). Многочисленные регулярно обновляемые методы анализа ячменя и пивных продуктов предлагают, например, без ограничения Американская ассоциация химиков по переработке зерновых продуктов (1995), Американское общество химиков пивоваренной промышленности (1992), Европейская пивоваренная конвенция (1998) и Институт пивоварения (1997). Признано, что для конкретного пивоваренного завода используется множество специфических процедур, причем наиболее значимые различия касаются предпочтений местного потребителя. В отношении настоящего изобретения можно применять любой такой способ получения пива.

Первая стадия получения пива из водного экстракта предпочтительно включает кипячение указанного водного экстракта, как описано в настоящем документе выше, с последующей фазой охлаждения и необязательно вихревой паузой. К водному экстракту можно добавлять одно или несколько дополнительных соединений, например, одно или несколько из дополнительных соединений, описанных ниже в разделе «Дополнительные соединения». После охлаждения водный экстракт можно переносить в бродильные чаны, содержащие дрожжи, например пивные дрожжи, такие как *S. pastorianus* или *S. cerevisiae*. Водный экстракт можно сбраживать в течение любого подходящего периода времени, обычно в течение периода времени в диапазоне 1-20 дней, как, например, 1-10 дней. Сбраживание осуществляют при любой пригодной температуре, например, при температуре в диапазоне 10-20°C. Способы также могут предусматривать добавление одного или нескольких ферментов, например, один или несколько ферментов можно

добавлять в сусло до или в ходе сбраживания. В частности, указанный фермент может представлять собой пролин-специфическую эндопротеазу. Неограничивающим примером пролин-специфической эндопротеазы является «Brewer's Clageh», доступная от DSM. Согласно другим вариантам осуществления в ходе указанных способов экзогенные ферменты не добавляют.

В ходе длежащегося несколько дней процесса сбраживания сахар превращается в спирт и CO_2 , одновременно с образованием некоторых ароматических веществ. Сбраживание может быть остановлено в любой требуемый момент времени, например сразу после того, как прекращает наблюдаться дальнейшее снижение %Р.

Затем пиво может быть дополнительно обработано, например, охлаждено. Также его можно фильтровать и/или подвергать выдержке в лагерном подвале, процессу, в результате которого образуется приятный запах и уменьшается дрожжевой привкус и запах. Также можно вносить добавки. Кроме того, можно добавлять CO_2 . Наконец, пиво можно пастеризовать и/или фильтровать перед его упаковкой (например, перед перенесением в контейнеры или бочки, разливом по бутылкам или жестяным банкам). Также пиво можно пастеризовать с помощью стандартных способов.

Дополнительные соединения

Способы по настоящему изобретению могут предусматривать стадию добавления одного или нескольких дополнительных соединений. Указанные дополнительные соединения могут представлять собой, например, пищевой ароматизатор, консервант, функциональный ингредиент, краситель, подсластитель, средство, регулирующее рН, или соль. Средство, регулирующее рН, может представлять собой, например, буфер или кислоту, такую как фосфорная кислота.

Функциональные ингредиенты могут представлять собой любой ингредиент, добавляемый для обеспечения конкретной функции. Предпочтительно функциональный ингредиент делает напиток более диетическим. Неограничивающие примеры функциональных ингредиентов включают витамины или минеральные вещества.

Консервант может представлять собой любой пищевой консервант, например, он может представлять собой бензойную кислоту, сорбиновую кислоту, сорбаты (например, сорбат калия), сульфиты и/или их соли.

Дополнительным соединением также может быть CO_2 . В частности, CO_2 можно добавлять для получения газированного напитка.

Применяемое в отношении настоящего изобретения вкусоароматическое вещество может представлять собой любое пригодное вкусоароматическое вещество.

Вкусоароматическое вещество, например, может быть выбрано из группы, состоящей из ароматизаторов, растительных экстрактов, растительных концентратов, частей растений и травяных настоев. В частности, вкусоароматические вещества могут представлять собой хмель.

Способ получения растения ячменя, несущего мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*

Растения ячменя, несущие мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*, например, любую из описанных в настоящем документе мутаций, можно получать любым пригодным способом.

Например, такие растения ячменя можно получать с помощью способа, предусматривающего стадии:

- подвержения множества растений ячменя или ядер зерен ячменя неспецифическому мутагенезу, например, путем облучения или химической обработки, например обработки азидом натрия;
- идентификации растений ячменя или ядер зерен ячменя, несущих требуемую мутацию (например, мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*).

Такие способы также могут включать одну или несколько стадий размножения указанных растений ячменя/ядер зерен ячменя с целью получения множества растений ячменя/ядер зерен, каждое из которых несет случайные мутации.

В частности, несущие конкретную мутацию растения ячменя можно получать и идентифицировать, по сути, как описано в международной заявке на патент РСТ/ЕР2017/065516 с применением праймеров и зондов, разработанных для идентификации требуемой мутации. Неограничивающий пример праймеров и зондов, пригодных для идентификации растения ячменя, несущего мутацию в промоторе гена α -амилазы, представлен в примере 13А. Неограничивающий пример праймеров и зондов, пригодных для идентификации растения ячменя, несущего мутацию в гене *HRT*, представлен в примере 2А. Два дополнительных неограничивающих примера праймеров и зондов, пригодных для идентификации растения ячменя, несущего мутацию в гене *HRT*, представлены в примере 14. Неограничивающий пример праймеров и зондов, пригодных для идентификации растения ячменя, несущего мутацию в гене *HBL12*, представлен в примере 7А. Неограничивающий пример праймеров и зондов, пригодных для идентификации растения ячменя, несущего мутацию в гене *WRKY38*, представлен в

примере 12А. Специалисты в данной области, опираясь на общеизвестные знания в различных областях и/или руководство, представленное в международной заявке на патент РСТ/EP2017/065516, которая включена в настоящий документ посредством ссылки, смогут разработать пригодные праймеры и зонды для идентификации других мутантов.

Растения ячменя, несущие мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*, также можно получать с применением различных методов сайт-направленного мутагенеза, которые, например, могут быть разработаны на основе последовательности представленных в настоящем документе промоторов генов α -амилазы, гена *HRT*, гена *HBL12* и/или гена *WRKY38*. Согласно одному варианту осуществления растение ячменя получают с применением любого из методов с использованием CRISPR, TALEN, нуклеаз с цинковыми пальцами, мегануклеазы и разрезающего ДНК антибиотика, как описано в WO 2017/138986. Согласно одному варианту осуществления растение ячменя получают с применением методики CRISPR/cas9, например, с применением РНК-направляемой нуклеазы Cas9. Эту методику можно выполнять, как описано в Lawrenson et al., *Genome Biology* (2015) 16:258; DOI 10.1186/s13059-015-0826-7, за исключением того, что последовательность одиночной направляющей РНК сконструирована на основе последовательностей генов, представленных в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления растение ячменя получают с применением комбинации методик с использованием как TALEN, так и CRISPR/cas9, например, с применением РНК-направляемой нуклеазы Cas9. Эту методику можно выполнять, как описано в Holme et al., *Plant Mol Biol* (2017) 95:111-121; DOI: 10.1007/s11103-017-0640-6, за исключением того, что TALEN и последовательность одиночной направляющей РНК сконструированы на основе последовательностей генов, представленных в настоящем документе.

Согласно одному варианту осуществления злаковое растение получают с применением процесса гомологичной репарации, комбинации разрезающей ДНК нуклеазы и донорного фрагмента ДНК. Эту методику можно выполнять, как описано в Sun et al., *Molecular Plant* (2016) 9:628-631; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.01.001>, за исключением того, что разрезающая ДНК нуклеаза сконструирована на основе последовательностей генов, представленных в настоящем документе, и донорный фрагмент ДНК сконструирован на основе кодирующей последовательности подвергнутого мутации варианта злака, представленного в настоящем документе.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения целью является обеспечение агрономически пригодных растений ячменя, несущих мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*.

В дополнение к мутации в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*, имеют место дополнительные факторы, которые также могут учитываться в области создания коммерческого сорта ячменя, пригодного для солодования и/или пивоварения, и/или в качестве основы для напитков, например, выход и размер ядра зерна, а также другие параметры, которые относятся к производственным показателям при солодовании или производственным показателям при пивоварении. Поскольку было показано, что многие, если не все значимые признаки обусловлены генетически, настоящее изобретение также относится к современным гомозиготным высокоурожайным пивоваренным сортам, которые можно получать в результате скрещивания с растениями ячменя, раскрытыми в настоящей заявке. Квалифицированный селекционер ячменя сможет отобрать и вырастить растения ячменя, которые после скрещивания с другими растениями ячменя дадут усовершенствованные сорта. В качестве альтернативы, селекционер может использовать растения по настоящему изобретению для дополнительного мутагенеза с целью получения новых сортов, несущих дополнительные мутации в дополнение к мутации в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*.

Настоящее изобретение также включает растения ячменя, несущие мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*, полученные в результате осуществления способа селекции растений, включая способы самоопыления, возвратного скрещивания, скрещивания популяций и т. д. Способы возвратного скрещивания можно применять в отношении настоящего изобретения для введения в другой сорт мутации в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к потомству растения ячменя, депонированного 12 ноября 2018 года в NCIMB под номером доступа NCIMB 43270 и названного «HENZ-2», или потомству растения ячменя, депонированного 12 ноября 2018 года в NCIMB под номером доступа NCIMB 43271 и названного «HENZ-10».

Способ ускорения процесса селекции растений предусматривает начальное размножение полученных мутантов путем применения методик культивирования тканей и регенерации. Таким образом, другим аспектом настоящего изобретения является обеспечение клеток, которые впоследствии роста и дифференцировки дают растения ячменя, несущие мутацию в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, в гене *HRT*, в гене *HBL12* и/или в гене *WRKY38*. Например, селекция может включать

традиционные скрещивания, получение фертильных растений в культуре пыльников или применение культуры микроспор.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя по настоящему изобретению не было получено исключительно посредством по существу биологического процесса. Потомство полученного с помощью технологического способа растения ячменя в настоящем документе считается таким, которое не было получено исключительно посредством по существу биологического процесса, поскольку родительское растение получено с помощью технологического способа.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя несет любую из описанных в настоящем документе мутаций, причем указанная мутация была индуцирована химическими средствами и/или физическими факторами.

Согласно одному варианту осуществления растение ячменя было получено с помощью способа, включающего стадию индуцированного мутагенеза, или указанное растение представляет собой потомство растения, полученного с помощью способа, включающего стадию индуцированного мутагенеза. Таким образом, растение ячменя может представлять собой растение ячменя, полученное с помощью способа, предусматривающего следующие стадии, или потомство растения, полученного с помощью способа, предусматривающего следующие стадии:

- мутагенез растений ячменя или его частей, например, с использованием химического мутагена, такого как NaN_3
- отбор растений ячменя, несущих любую из описанных в настоящем документе мутаций.

Последовательности

<p>SEQ ID NO:1 Кодирующая последовательность гена HvHRT ID# AK362734 (cv. Haruna Nijo)</p>	<p>ATGCCTGCGGTCGCCGCTGCCAGATTGAAGCGGGAGGAC TGCCCCCGCACCAAACACGATTCCTCTTCTCCCATGGA AGGTTCTTGTCGGGCCGTCGGACTGGGAGGACCACTCCGC CGGCAAGGAGGGGGTCCAGAGGTATCACACACGCAACCT CCCGGACAACCTCCCTGGCCTCTACGAGCTGGGCGTTGCA AGGCCTTCCTATGATGGTGTTCAGGGCTCGCAGAAATCGAT CAGTTGTCGTCGTGGTGGTATACCTCGGGCAGGCCGATAA TGTCAGGGCGAGGCTCCAGCAGTACGGGCGGACAGGGTC ACACCTGGACACCGGGAATCCGTTGGCTGCTGTCTGTA GCTGAGATGAACGCGCTCACGGCAGGACCTGGATTGTTCA GGGAAGTCTTCTCCAGAGGCTACTCTATGATGTTTCGATG</p>
---	---

	<p>TGCGCTGATGGGTTCCAAAAAGGCAGCTGAGAAGACTGA AGGTCAGCTACTGGGAGTATTTGATTATGCATGGAATAAA CTGCAGAATGGTGC GTGTCGTCGCGAAGAAATACTGCTCA AGTTAGAACAGGGAAGCAATAGATTATCTTTGCTTAGCAG AGTCCGGCACTTAAAACAGAGGGTGT TGGAGAGAAAGC AGGTATAAAGATTAACAGCAGTGGGTCTGTTGAGATTTCA TCTAGCAGTATGAAAAATATGCTTCCAAGAGTCCGTACGT TTGTCGGCTTCAGGCCTCGTTTGGTTAACTCTGGCGACGA TTTAAACGAGGCAAGTGATATTCACCGAAAATGCACACCT CAGGCCAATACTGCTGGTAAACAAGCACATAGAAGGTCT GAAGGATACAAGGTGAAAAAGATCGATGTTATTAACGG CGAACTGCACCGATAAGAGAAGCCGAAGCTGTTTGTGGA GTAATGCTAGAAGATGGTTCTTCTTGT TGGAGGATCCAA TGGAAGGAAGGAAGAGGTGTGAGTTGCACAAAGGTAGAA GAGTCAGAGTGGCATAACAGTCGCAAAGTATCCTCTTCTAG CTCCACTTGCCAAGTTGCTATTCCA ACTGTTGAATCCATAC CTCAACAAACTGCTAATCCAAGCAAACGAGATCAAGCCT GGCAAACCAGTGCAGACCAATCCAAAAATCTGTCCACAA ATGCAAAGGAGCCATCTTGGCAAAGGAACAGCTTCAAAG CAAATGAGATGAAAATCGGAGAAGCTCCTACAGAAGATG AAGCATATGGAACCTCCCATGCAGAATCTCAGTTCCACGA AGATGAGCCTTGTGGAAGGAAGTGGTTT GAGCGGCTCAA AGCACAGAAATCAGCCAACGCACCATCGTCGAGAGGCCA AGGATGTCAGCCAAGAGAAGCAAACAACGACGCATCAGC CTTATGTGGAGTAGTGACAGATAATGGATACTGCAA ACTG GAACCGGTGATAGGAAGGGAAAGATGCGAGGAGCACAG AGGAATTGAGGTCACTGGTGC GTCATCGGCACCATGTTCC GGAAGGTCGGTATTGCCATCTGTCTGTGGAGCTCGGGCAT CCGATGGTTCACCTTGCAAGAATCAGCCAATCGCAAGGA GGAAGAGATGTGCGTTGCACAAAGGTCAAAGAGCGTGCT GCGCCTCCGCGCCATCAGTCAA</p>
<p>SEQ ID NO:2 Белковая последовательность HvHRT</p>	<p>MPAVAAARLKREDCPRTKHDSLFPWKVLVGPSDWEDHSA GKEGVQRYHTRNLPDNFPGLYELGVARPSYDGVRRARRNRS VVVVVYLGQADNVRARLQQYGR TGSHLDTGNPLAAVCK AEMNALTAGPLFREVF SRGYSMFRCALMGSKKAAEKTE</p>

<p>ID# AK362734 (cv. Haruna Nijo)</p>	<p>GQLLGVFDYAWNKLQNGACRREEILLKLEQGSNRLSLLSRV RHLKQRFVGEKAGIKINSSGSVEISSSSMKNMLPRVRTFVGF RPRLVNSGDDLNEASDIHRKCTPQANTAGKQAHRRSEGYKV KKIDVIKRRRTAPIREAEAVCGVMLEDGSSCLEDPMEGRKRCE LHKGRRVRVAYSRKVSSSSSTCQVAIPTVESIPQQTANPSKR DQAWQTSADQSKNLSTNAKEPSWQRNSFKANEMKIGEAPT EDEAYGTSHAESQFHEDEPCGRKWFERLKAQKSANAPSSRG QGCQPREANNNDASALCGVVTDNGYCKLEPVIGRERCEEHRG IEVTGASSAPCSGRSVLPSVCGARASDGSPCKNQPIARRKRC ALHKGQRACCASAPSVK*</p>
<p>SEQ ID NO:3 Кодирующая последовательность гена HvHRT мутанта HENZ-2 ячменя. Замена G на A приводит в результате к появлению мутации W431stop белка</p>	<p>ATGCCTGCGGTGCGCCGCTGCCAGATTGAAGCGGGAGGAC TGCCCCCGCACCAAACACGATTCCCTCTTCTCCCATGGA AGGTTCTTGTCGGGCCGTCGGACTGGGAGGACCACTCCGC CGGCAAGGAGGGGGTCCAGAGGTATCACACACGCAACCT CCCGGACAACCTCCCTGGCCTCTACGAGCTGGGCGTTGCA AGGCCTTCCTATGATGGTGTCAGGGCTCGCAGAAATCGAT CAGTTGTCGTCGTGGTGGTATACCTCGGGCAGGCCGATAA TGTCAGGGCGAGGCTCCAGCAGTACGGGCGGACAGGGGTC ACACCTGGACACCGGAATCCGTTGGCTGCTGTCTGTAAA GCTGAGATGAACGCGCTCACGGCAGGACCTGGATTGTTCA GGGAAGTCTTCTCCAGAGGCTACTCTATGATGTTTCGATG TGCGCTGATGGGTTCCAAAAGGCAGCTGAGAAGACTGA AGGTCAGCTACTGGGAGTATTTGATTATGCATGGAATAAA CTGCAGAATGGTGCGTGTGTCGTCGGAAGAAATACTGCTCA AGTTAGAACAGGGAAGCAATAGATTATCTTTGCTTAGCAG AGTCCGGCACTTAAAACAGAGGGTGTGGAGAGAAAGC AGGTATAAAGATTAACAGCAGTGGGTCTGTTGAGATTTCA TCTAGCAGTATGAAAATATGCTTCCAAGAGTCCGTACGT TTGTCGGCTTCAGGCCTCGTTTGGTTAACTCTGGCGACGA TTTAAACGAGGCAAGTGATATTCACCGAAAATGCACACCT CAGGCCAATACTGCTGGTAAACAAGCACATAGAAGGTCT GAAGGATACAAGGTGAAAAAGATCGATGTTATTAACGG CGAACTGCACCGATAAGAGAAGCCGAAGCTGTTTGTGGA GTAATGCTAGAAGATGGTTCTTCTTGTGGAGGATCCAA TGGAAGGAAGGAAGAGGTGTGAGTTGCACAAAGGTAGAA</p>

	<p>GAGTCAGAGTGGCATAACAGTCGCAAAGTATCCTCTTCTAG CTCCACTTGCCAAGTTGCTATTCCAACCTGTTGAATCCATAC CTCAACAAACTGCTAATCCAAGCAAACGAGATCAAGCCT GGCAAACCAGTGCAGACCAATCCAAAAATCTGTCCACAA ATGCAAAGGAGCCATCTTGGCAAAGGAACAGCTTCAAAG CAAATGAGATGAAAATCGGAGAAGCTCCTACAGAAGATG AAGCATATGGAACCTCCCATGCAGAATCTCAGTTCCACGA AGATGAGCCTTGTGGAAGGAAGTG⁴TTTGAGCGGCTCAA AGCACAGAAATCAGCCAACGCACCATCGTCGAGAGGCCA AGGATGTCAGCCAAGAGAAGCAAACAACGACGCATCAGC CTTATGTGGAGTAGTGACAGATAATGGATACTGCAAACCTG GAACCGGTGATAGGAAGGGAAAGATGCGAGGAGCACAG AGGAATTGAGGTCACTGGTGCATCGGCACCATGTTCC GGAAGGTCGGTATTGCCATCTGTCTGTGGAGCTCGGGCAT CCGATGGTTCACCTTGCAAGAATCAGCCAATCGCAAGGA GGAAGAGATGTGCGTTGCACAAAGGTCAAAGAGCGTGCT GCGCCTCCGCGCCATCAGTCAAATAA</p>
<p>SEQ ID NO:4 Последовательность мутантного HvHRT мутанта HENZ-2 ячменя.</p>	<p>MPAVAAARLKREDCPRTKHDSLFPWKVLVGPSDWEDHSA GKEGVQRYHTRNLPDNFPGLYELGVARPSYDGVRRARRNS VVVVVVYLGQADNVRARLQQYGR TGSHLDTGNPLAAVCK AEMNALTAGPGLFREVF SRGYSMMFRCALMGSKKAAEKTE GQLLG VFDYAWNKLQNGACRREEILLKLEQGSNRLSLLSRV RHLKQRFVGEKAGIKINSSGSVEISSSSMKNMLPRVRTFVGF RPRLVNSGDDLNEASDIHRKCTPQANTAGKQAHRRSEGYKV KKIDVIKRR TAPIREAEAVCGVMLEDGSSCLEDPMEGRKRCE LHKGRRVRVAYS RKVSSSSSTCQVAIPTVESIPQQTANPSKR DQAWQTSADQSKNLSTNAKEPSWQRNSFKANEMKIGEAPT EDEAYGTSHAESQFHEDEPCGRK*</p>
<p>SEQ ID NO:5 Кодирующая последовательность гена HvHBL12 ID# AK376953 (cv. Haruna Nijo)</p>	<p>ATGGAGCAGGGGGAGGAGGACGGGGACTGGATGATGGA GCCGGCGTCGGGGAAGAAGGGCGGGGTGATGATCGACAG GAAGAAGCGCTTCAGCGAGGAGCAGATCAAGTCGCTCGA GTCCATGTTCCGACGCAGACCAAGCTGGAGCCCCGCCAG AAGCTGCAGCTGGCCCCGGGAGCTCGGCCTGCAGCCGCGC CAGGTCGCCATCTGGTTCCAGAACAAGCGCGCGCGCTGG</p>

	<p>AAGTCCAAGCAGCTCGAGCGCCAGTACGCCGCGCTCCGG GACGACTACGACGCCCTCCTCTCCAGCTACGACCAGCTCA AGAAGGACAAGCAAGCGCTCGTCAACCAGCTGGAGAAGC TAGCAGAGATGCTGCGGGAGCCGGGGCGGGGCCAAGTGCG GAGATAATGCCGGCGCTGCTGACAGGGACAACATGCGCC TGGCCGTGGCCGGCATGAGCATGAAGGACGAGTTCGCGG ACGCTGCCGGGGCCAGCAAGCTCTACTCGGCGTCTGCCGA GGGCTGCGGGCGGCAGCGGCAAGCTCTCCCTCTTCGGCGAG GAGGATGACGACGCGGGCCTTTCCTCCGGCCCTCGCTGC AGCTGCCAACCGCGCACGACGGCGGCTTCACGGCGTCGG GGCCGGCCGAGTACCAGCAGCAGTCGCCGTCGTCGTTCCC GTTCCACTCGAGCTGGCCGTCGTCGCGACGGAGCAGACC TGCAGCAGCTCCCAATGGTGGGAATTCGAGTCCCCGAGCG AGTAA</p>
<p>SEQ ID NO:6 Белковая последовательность HvHBL12 ID# AK362734 (cv. Haruna Nijo)</p>	<p>MEQGEEDGDWMMEPASGKKGGVMIDRKKRFSEEQIKSLES MFATQTKLEPRQKLQLARELGLQPRQVAIWFQNKRRWKS KQLERQYAALRDDYDALLSSYDQLKKDKQALVNQLEKLAE MLREPGGAKCGDNAGAADRDNMRLAVAGMSMKDEFADA AGASKLYSASAEGCGGSGKLSLFGCEEDDDAGLFLRPSLQLPT AHDGGFTASGPAEYQQQSPSSFPFHSSWPSSATEQTCSSSQW WEFESPSE*</p>
<p>SEQ ID NO:7 Последовательность геномной ДНК ID# morex_contig_56855 (экзоны обозначены курсивным и жирным шрифтом)</p>	<p>GAGACGGGAGACCCGGCTACGCATGCACGCCACCGCGCT CCATTGGCCGCCCCGTTGCCATCACCGCGCCATCGCTCC ATCCCCGATTAAACTACTCCATATCGCTAGTAAGCAGAA GCAGAATCGATCCATCACACCAAGCTAGCTAGCCTCCTAG CTCGCTCGCTCGCCCGCACACCCGCGATCCATTCTGCTTCT TCCCCTTCTTCCCCTCCGATCAGGTGCATGACCACCG GCGAGACCTAGCTAGGTAGGTAGGGAGGGAGGGAGGGAT GGAGCAGGGGGAGGAGGACGGGGACTGGATGATGGAGCC GGCGTCGGGGAAGAAGGGCGGGGTGATGATCGACAGGAA GAAGCGCTTCAGCGAGGAGCAGATCAAGTCGCTAGAGTCC ATGTTCCGCACGCAGACCAAGCTGGAGCCCCGCCAGAAGC TGCAGCTGGCCCCGGGAGCTCGGCCTGCAGCCGCGCCAGGT CGCCATCTGGTTCCAGAACAAGCGCGCGCGCTGGAAGTCC AAGCAGCTCGAGCGCCAGTACGCCGCGCTTCGGGACGACT</p>

	<p><i>ACGACGCCCTCTCTCCAGCTACGACCAGCTCAAGAAGGA CAAGCAAGCGCTCGTCAACCAGGTATATACTCCTATGTCTG TCTGTCTGTGCTACGTACCGTGTGTTTCTCCGTGCTCTCCG CTCGGTGGCGTGGAGCTCGTGGTGCCTCTGGCTAATGCAT GGTCGACGGGTTTCTTGCTTGCCTTGCCTGTCCGTGCAGCTGGA GAAGCTAGCAGAGATGCTGCGGGAGCCGGGCGGGGCCAA GTGCGGAGATAATGCCGGCGCTGCTGACAGGGACGACGTG CGCCTGGCCGTGGCCGGCATGAGCATGAAGGACGAGTTCG CGGACGCTGCCGGGGCCAGCAAGCTCTACTCGGCGTCTGC CGAGGGCTGCGGGCGGCAGCGGCAAGCTCTCCCTCTTCGGC GAGGACGATGACGACGCGGGCCTCTTCTCCGGCCCTCGC TGCAGCTGCCAACCGCGCACGACGGCGGCTTCACGGCGTC GGGGCCGGCCGAGTACCAGCAGCAGTCGCCGTCGTCGTTT CCGTTCCACTCGAGCTGGCCGTCGTCCGCGACGGAGCAGA CCTGCAGCAGCTCCCAATGGTGGGAATTCGAGTCCCCGAG CGAGTAAGTAGAGCCATCGGTCAAGCACCATGCAAGGAA TCGCCGACGTGATCGACCATGCAACAGATCAGTGTTCTTA ACACAGAGCACTATACTGCCGATCGAATCCGTGGAGAAG ACGACGGCGCGATCGATCATATGCAACCGAAGATGGTGG TGTCAAGTGTGTACATAGCTCGAAACCCAGGTCTGTCCAG TCCAGTACGTCCAGGCAGCCTCTTCTTCTCAATCAGCAG TCAGCACGCCATTTTTCTTACCCTCTTCTTCTTAAGAAT CACTTGCTCTTGTCAATTACCTGCCACACCGTGTAATCCAC AGGGAAACTAGTCACAAAACCAAATTATAGAGACCGATC TTCAGATGCAAGTGCATGCAACTATTTAGC</i></p>
<p>SEQ ID NO:8 Кодирующая последовательность мутантного гена HvHBL12 мутанта HENZ-10 ячменя. В последовательности показана замена G на A, таким образом, она кодирует мутантный</p>	<p><i>ATGGAGCAGGGGGAGGAGGACGGGGACTGGATGATGGA GCCGGCGTCGGGGAAGAAGGGCGGGGTGATGATCGACAG GAAGAAGCGCTTCAGCGAGGAGCAGATCAAGTCGCTCGA GTCCATGTTCCACGCAGACCAAGCTGGAGCCCCGCCAG AAGCTGCAGCTGGCCCCGGGAGCTCGGCCTGCAGCCGCGC CAGGTCCCATCTGGTTCCAGAACAAGCGCGCGCGCTGG AAGTCCAAGCAGCTCGAGCGCCAGTACGCCGCGCTCCGG GACGACTACGACGCCCTCCTCTCCAGCTACGACCAGCTCA AGAAGGACAAGCAAGCGCTCGTCAACCAGCTGGAGAAGC TAGCAGAGATGCTGCGGGAGCCGGGCGGGGCCAAGTGCG</i></p>

<p>белок (W228Stop). На основе ID# AK376953 (cv. Haruna Nijo)</p>	<p>GAGATAATGCCGGCGCTGCTGACAGGGACAACATGCGCC TGGCCGTGGCCGGCATGAGCATGAAGGACGAGTTCGCGG ACGCTGCCGGGGCCAGCAAGCTCTACTCGGCGTCTGCCGA GGGCTGCGGGCGGCAGCGGCAAGCTCTCCCTCTTCGGCGAG GAGGATGACGACGCGGGCCTCTTCCTCCGGCCCTCGCTGC AGCTGCCAACC GCGCACGACGGCGGCTTCACGGCGTCGG GGCCGGCCGAGTACCAGCAGCAGTCGCCGTCGTCGTTCCC GTTCCACTCGAGCTG<u>A</u>CCGTCGTCGCGACGGAGCAGACC TGCAGCAGCTCCCAATGGTGGGAATTCGAGTCCCCGAGCG AGTAA</p>
<p>SEQ ID NO:9 Белковая последовательность мутантного HvHBL12 из мутанта HENZ-10 ячменя.</p>	<p>MEQGEEDGDWMMEPASGKKGGVMIDRKKRFSEEQIKSLES MFATQTKLEPRQKLQLARELGLQPRQVAIWFQNKRRARWKS KQLERQYAALRDDYDALLSSYDQLKKDKQALVNQLEKLAE MLREPGGAKCGDNAGAADRDNMRLAVAGMSMKDEFADA AGASKLYSASAEGCGSGKLSLFGIEDDDAGLFLRPSLQLPT AHDGGFTASGPAEYQQQSPSSFPFHSS*</p>
<p>SEQ ID NO:10 Кодирующая последовательность гена WRKY38 Номер доступа AJ536667.1 Ячмень cv. Ingrid</p>	<p>ATGGATCCATGGATGGGCAGCCAGCCATCCCTGAGCCTCG ACCTGCACGTCGGCCTACCGCCGATGGGGCACCCGCACCA CCACCAGAGCCAATAACAGGCGCCGCCGATGATCGCGCT GGCCAAGCCCAAGATCCTCGTGGAGGAGAACTTCATGCC ACTCAAGAAGGACCCTGAGGTTGCGGTTCTTGAGTCGGAG CTACAGCGGGTGAGCGAGGAGAACCGGCGGCTGGGCGAG ATGCTCAGGGAGGTGGCCTCCAAGTACGAGGCCCTGCAG GGCCAGTTCACCGACGTGGTCACGGCCGGCGGCAACAAC AACCACTACCACAACCAGCCGTCCTCCGCGTCGGAGGGC GGGTCGGTGTGCGCGTCGAGGAAGCGCAAGAGCGAGGAG AGCCTCGGCACGCCGCCACCGTCGCATACTCAGCAGCAGC ACTATGCCGCGGCCTCGCGTACGCGGTGGCGCCGGACCA GGCGGAGTGCACGTCCGGCGAGCCGTGCAAGCGCATCCG GGAGGAGTGCAAGCCCGTCATCTCCAAGCGCTACGTCCAC GCCGACCCCTCCGACCTCAGCCTGGTGGTGAAGGACGGGT ACCAATGGCGCAAGTACGGGCAGAAGGTGACCAAGGACA ACCCATGCCCCAGAGCCTACTTCCGGTGCTCCTTCGCCCC CGGCTGCCCCGTCAAGAAGAAGGTGCAGAGGAGCGCCGA GGACAAGACCATACTCGTGGCGACGTACGAGGGCGAGCA</p>

	<p>CAACCACACCCAGCCCCCGCCGTCGCAGCCGCAGCAGCA GAACGACGGCTCCGGCGCCGGCAAGAACGCCGGGAACGG GAAGCCGCCCCAGGCGCCGGCCACGCCTCACCACCCGCA GCAGCAGCACAAAGCAGGAAGCGGCAGCGGTCTGTCGTCAG CGGCGAATCGGCCGCGGGCGGCGTCCGAGCTGATCCGGCG CAACCTGGCGGAGCAGATGGCCATGACGCTGACGAGGGA CCCCAGCTTCAAGGCGGCGCTGGTCACCGCGCTCTCCGGC CGGATCCTCGAGCTCTCGCCGACCAGGGACATCAATTA</p>
<p>SEQ ID NO:11 Белковая последовательность WRKY38</p>	<p>MDPWMGSQPSLSLDLHVGLPPMGHPHHHQSQYQAPPMIAL AKPKILVEENFMPLKKDPEVAVLESELQRVSEENRRLGEML REVASKYEALQGQFTD<u>V</u>VTAGGNNNHYHNQPSSASEGGSV SPSRKRKSEESLGTPPPSHTQQQHYAAGLAYAVAPDQAECTS GEPCKRIREECKPVISKRYVHADPSDLSLVVKDGYQ<u>W</u>WRKYG QKVTKDNPCPRA YFRCSFAPGCPVKKKVQRSAEDKTILVAT YEGEHNHTQPPPSQPQQQNDGSGAGKNAGNGKPPQAPATP HHPQQQHKQEAAAVVVSSESAAAASELIRRNLAEQMAMTL TRDPSFKAALVTALSGRILELSPTRDIN*</p>
<p>SEQ ID NO:12 Белковая последовательность WRKY38</p>	<p>MDPWMGSQPSLSLDLHVGLPPMGHPHHHQSQYQAPPMIAL AKPKILVEENFMPLKKDPEVAVLESELQRVSEENRRLGEML REVASKYEALQGQFTD<u>M</u>VTAGGNNNHYHNQPSSASEGGSV SPSRKRKSEESLGTPPPSHTQQQHYAAGLAYAVAPDQAECTS GEPCKRIREECKPVISKRYVHADPSDLSLVVKDGYQ<u>W</u>WRKYG QKVTKDNPCPRA YFRCSFAPGCPVKKKVQRSAEDKTILVAT YEGEHNHTQPPPSQPQQQNDGSGAGKNAGNGKPPQAPATP HHPQQQHKQEAAAVVVSSESAAAASELIRRNLAEQMAMTL TRDPSFKAALVTALSGRILELSPTRDIN</p>
<p>SEQ ID NO:13 Кодирующая последовательность мутантного гена WRKY38 HENZ-50 На основе последовательности с номером доступа AJ536667.1</p>	<p>ATGGATCCATGGATGGGCAGCCAGCCATCCCTGAGCCTCG ACCTGCACGTCGGCCTACCGCCGATGGGGCACCCGCACCA CCACCAGAGCCAATACCAGGCGCCGCGATGATCGCGCT GGCCAAGCCCAAGATCCTCGTGGAGGAGA ACTTCATGCC ACTCAAGAAGGACCCTGAGGTTGCGGTTCTTGAGTCGGAG CTACAGCGGGTGAGCGAGGAGAACCGGCGGCTGGGCGAG ATGCTCAGGGAGGTGGCCTCCAAGTACGAGGCCCTGCAG GGCCAGTTCACCGACGTGGTCACGGCCGGCGGCAACAAC AACC ACTACCACAACCAGCCGTCCTCCGCGTCGGAGGGC</p>

<p>Ячмень cv. Ingrid. В последовательности показана замена G на A, таким образом, она кодирует мутантный белок (W200Stop).</p>	<p>GGGTCGGTGTGCGCCGTCGAGGAAGCGCAAGAGCGAGGAG AGCCTCGGCACGCCGCCACCGTCGCATACTCAGCAGCAGC ACTATGCCGCGGCCCTCGCGTACGCGGTGGCGCCGGACCA GGCGGAGTGCACGTCCGGCGAGCCGTGCAAGCGCATCCG GGAGGAGTGCAAGCCCGTCATCTCCAAGCGCTACGTCCAC GCCGACCCCTCCGACCTCAGCCTGGTGGTGAAGGACGGGT ACCAATG<u>A</u>CGCAAGTACGGGCAGAAGGTGACCAAGGACA ACCCATGCCCCAGAGCCTACTTCCGGTGCTCCTTCGCCCC CGGCTGCCCCGTCAAGAAGAAGGTGCAGAGGAGCGCCGA GGACAAGACCATACTCGTGGCGACGTACGAGGGCGAGCA CAACCACACCCAGCCCCCGCCGTCGCAGCCGCAGCAGCA GAACGACGGCTCCGGCGCCGGCAAGAACGCCGGGAACGG GAAGCCGCCCCAGGCGCCGGCCACGCCTACCACCCGCA GCAGCAGCACAAGCAGGAAGCGGCAGCGGTTCGTCGTCAG CGGCGAATCGGCCGCGGGCGGCGTCCGAGCTGATCCGGCG CAACCTGGCGGAGCAGATGGCCATGACGCTGACGAGGGA CCCCAGCTTCAAGGCGGCGCTGGTCACCGCGCTCTCCGGC CGGATCCTCGAGCTCTCGCCGACCAGGGACATCAATTA</p>
<p>SEQ ID NO:14 Белковая последовательность мутантного WRKY38 из мутанта HENZ-50 ячменя.</p>	<p>MDPWMGSQPSLSLDLHVGLPPMGHPHHHQSQYQAPPMIAL AKPKILVEENFMPLKKDPEVAVLESELQRVSEENRRLGEML REVASKYEALQGQFTDVVTAGGNNNHYNQPSASSEGGSV SPSRKRKSEESLGTPPPSHTQQQHAYAAGLAYAVAPDQAECTS GEPCKRIREECKPVISKRYVHADPSDLSLVVKDGYQ*</p>

Признаки

Настоящее изобретение, например, может быть определено в нижеследующих пунктах:

1. Растение ячменя или его часть с высокой активностью α -амилазы, где указанное растение ячменя:

- несет мутацию в гене *HvHRT*, обуславливающую потерю функции HvHRT; и/или
- несет по меньшей мере один ген α -амилазы, содержащий мутантный промотор гена α -амилазы, предусматривающий мутацию в GARE-боксе; и/или

- несет по меньшей мере четыре гена α -амилазы, содержащих GARE-боксы с последовательностью ТААСААА; и/или
- несет по меньшей мере один ген α -амилазы в кластере *amy2*, содержащий мутантный промотор гена α -амилазы, предусматривающий мутацию в GARE-боксе, или который имеет последовательность ТААСААА; и/или
- несет мутацию в гене *HvHBL12*, обуславливающую потерю функции HvHBL12; и/или
- несет по меньшей мере четыре гена α -амилазы, содержащих промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-боксы, причем указанный нестандартный тандемно повторяющийся W-боксы содержит последовательность (TGAC(C)_n(X)_mTTGACC), причем один или несколько из конкретных нуклеотидов были заменены или удалены, и причем X может представлять собой любой нуклеотид, n равняется 0 или 1 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20; и/или
- несет по меньшей мере один ген α -амилазы в кластере *amy2*, содержащий промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-боксы;
- несет мутацию в гене *WRKY38*, обуславливающую потерю функции *WRKY38*.

2. Растение ячменя или его часть, где указанное растение ячменя:

- a. несет мутацию в гене *HvHRT*, приводящую в результате к образованию мутантного гена *HvHRT*, кодирующего мутантный белок HvHRT, в котором отсутствуют одна или несколько из аминокислот SEQ ID NO:2, или мутацию, приводящую в результате к делеции по меньшей мере кодирующей области гена *HvHRT*, причем кодирующая область гена *HvHRT* кодирует полипептид SEQ ID NO:2; и/или
- b. несет по меньшей мере один ген α -амилазы, содержащий мутантный промотор гена α -амилазы, предусматривающий мутацию в GARE-боксе; и/или
- c. несет по меньшей мере четыре гена α -амилазы, содержащих GARE-боксы с последовательностью ТААСААА; и/или
- d. несет по меньшей мере один ген α -амилазы в кластере *amy2*, содержащий мутантный промотор гена α -амилазы, предусматривающий мутацию в GARE-боксе, или который имеет последовательность ТААСААА; и/или
- e. несет мутацию в гене *HvHBL12*, приводящую в результате к образованию мутантного гена *HvHBL12*, кодирующего мутантный белок HvHBL12, в котором отсутствуют одна или несколько из аминокислот SEQ ID NO:6, или мутацию, приводящую в результате к делеции по меньшей мере кодирующей области гена *HvHBL12*, причем кодирующая область гена *HvHBL12* кодирует полипептид SEQ ID NO:6; и/или

f. несет по меньшей мере четыре гена α -амилазы, содержащих промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, причем указанный нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс содержит последовательность $(TGAC(C)_n(X)_mTTGACC)$, причем один или несколько из конкретных нуклеотидов были заменены или удалены, и причем X может представлять собой любой нуклеотид, n равняется 0 или 1 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20; и/или

g. несет по меньшей мере один ген α -амилазы в кластере *amy2*, содержащий промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс; и/или

h. несет мутацию в гене *WRKY38*, приводящую в результате к образованию мутантного гена *WRKY38*, кодирующего мутантный белок *WRKY38*, в котором отсутствуют одна или несколько из аминокислот, присутствующих как в SEQ ID NO:11, так и в SEQ ID NO:12, или мутацию, приводящую в результате к делеции по меньшей мере кодирующей области гена *WRKY38*, причем кодирующая область гена *WRKY38* кодирует полипептид SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12.

3. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где указанное растение ячменя несет мутацию в гене *HvHRT*.

4. Растение ячменя в соответствии с пунктом 3, где мутация представляет собой:

- мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *HvHRT*, кодирующего мутантный белок *HvHRT*, в котором отсутствуют по меньшей мере аминокислоты, соответствующие аминокислотам 527-530 SEQ ID NO:2
- мутацию, приводящую в результате к делеции гена *HvHRT*.

5. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-4, где мутация опосредует введение преждевременного стоп-кодона в ген *HvHRT*.

6. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-5, где мутация представляет собой мутацию в сайте сплайсинга гена *HvHRT*.

7. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-6, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок *HvHRT*, в котором отсутствуют по меньшей мере аминокислоты 463-491 SEQ ID NO:2.

8. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-7, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок *HvHRT*, в котором отсутствуют по меньшей мере аминокислоты 509-539 SEQ ID NO:2.

9. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-8, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок *HvHRT*, в котором отсутствует по меньшей мере 21 наиболее близкая к С-концу аминокислота, например, по меньшей мере 39 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 85 наиболее близких к С-концу аминокислот, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO:2.

10. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-9, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок *HvHRT*, в котором отсутствуют по меньшей мере 118 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO:2.

11. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-10, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, кодирующий усеченный белок *HvHRT*, содержащий N-концевой фрагмент *HvHRT*, содержащий не более 526 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:2, например, не более 508 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:2, как, например, не более 462 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:2, предпочтительно не более 431 N-концевой аминокислоты SEQ ID NO:2.

12. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-11, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, несущий преждевременный стоп-кодон среди любых из кодонов 1-431.

13. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-12, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, несущий преждевременный стоп-кодон в 431 SEQ ID NO:1.

14. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-13, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок *HvHRT*, причем указанный мутантный белок *HvHRT* несет мутацию W431stop SEQ ID NO: 2.

15. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-14, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, предусматривающий мутацию G→A по нуклеотиду 1293 кодирующей последовательности *HvHRT* SEQ ID NO:1.
16. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-15, где растение ячменя представляет собой растение ячменя, депонированное в NCIMB под номером доступа NCIMB 43270, или его потомство.
17. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-12, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, несущий преждевременный стоп-кодон в 170 SEQ ID NO:1.
18. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-12, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок HvHRT, причем указанный мутантный белок HvHRT несет мутацию W170stop SEQ ID NO: 2.
19. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-12, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, предусматривающий мутацию G→A по нуклеотиду 510 кодирующей последовательности *HvHRT* SEQ ID NO:1.
20. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-12, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, несущий преждевременный стоп-кодон в 371 SEQ ID NO:1.
21. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-12, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок HvHRT, причем указанный мутантный белок HvHRT несет мутацию W371stop SEQ ID NO: 2.
22. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-12, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, предусматривающий мутацию G→A по нуклеотиду 1113 кодирующей последовательности *HvHRT* SEQ ID NO:1.
23. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-22, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, кодирующий полипептид SEQ ID NO:4.

24. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-23, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, содержащий кодирующую последовательность SEQ ID NO:3.

25. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-24, где растение ячменя содержит менее 10% мутантной мРНК *HvHRT* или мРНК *HvHRT* дикого типа по сравнению с таковой у растения ячменя, содержащего ген *HvHRT* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип, причем мРНК *HvHRT* представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:2 или его функциональный гомолог, а ген *HvHRT* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:2 или его функциональный гомолог, причем указанный функциональный гомолог характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:2.

26. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 2-25, где мутация в гене *HvHRT* представляет собой мутацию, являющуюся причиной полной потери функции *HvHRT*.

27. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит по меньшей мере один ген α -амилазы, содержащий мутантный промотор гена α -амилазы, предусматривающий мутацию в GARE-боксе, причем один из нуклеотидов TAACARA был либо заменен, либо удален.

28. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит по меньшей мере два гена α -амилазы, как, например, по меньшей мере три гена α -амилазы, например, по меньшей мере 4 гена α -амилазы, содержащих указанный мутантный промотор гена α -амилазы.

29. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где указанное растение ячменя содержит по меньшей мере пять генов α -амилазы, содержащих GARE-бокс с последовательностью TAACAAA.

30. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где указанное растение ячменя содержит по меньшей мере шесть, как, например, по меньшей мере семь генов α -амилазы, содержащих GARE-бокс с последовательностью TAACAAA.

31. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя представляет собой разновидность ярового ячменя с высокой урожайностью.

32. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где указанное растение ячменя содержит по меньшей мере один, как, например, по меньшей мере два, например, по меньшей мере три гена α -амилазы в кластере *amy2*, содержащих GARE-боксы с последовательностью TAACAAA.

33. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 27-32, где указанное растение ячменя дополнительно несет мутацию в гене *HvHRT*, причем указанная мутация представляет собой мутацию в соответствии с любым из пунктов 3-26.

34. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-33, где растение ячменя характеризуется активностью α -амилазы, составляющей по меньшей мере 16 Ед/г спустя 48 ч после инициации прорастания.

35. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-34, где растение ячменя характеризуется активностью α -амилазы, составляющей по меньшей мере 140 Ед/г, как, например, по меньшей мере 150 Ед/г, например, по меньшей мере 160 Ед/г, как, например, по меньшей мере 170 Ед/г спустя 48 ч после инициации прорастания, при условии, что указанное растение ячменя является либо голозерным, либо по меньшей мере часть пленки была удалена до инициации прорастания.

36. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 3-35, где растение ячменя характеризуется активностью предельной декстриназы, составляющей по меньшей мере 30 мЕд/г, как, например, по меньшей мере 35 мЕд/г, например, по меньшей мере 40 мЕд/г спустя 48 ч после инициации прорастания, при условии, что указанное растение ячменя является либо голозерным, либо по меньшей мере часть пленки была удалена.

37. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 1-2, где указанное растение ячменя несет мутацию в гене *HvHBL12*.

38. Растение ячменя в соответствии с пунктом 37, где мутация представляет собой:

a. мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *HvHBL12*, кодирующего мутантный белок *HvHBL12*, в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот SEQ ID NO:6, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей; или

b. мутацию, приводящую в результате к делеции гена *HvHBL12*.

39. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-38, где мутация опосредует введение преждевременного стоп-кодона в ген *HvHBL12*.

40. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-39, где мутация представляет собой мутацию в сайте сплайсинга гена *HvHBL12*.

41. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-40, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHBL12*, кодирующий мутантный белок *HvHBL12*, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO:6, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

42. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-41, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHBL12*, кодирующий мутантный белок *HvHBL12*, в котором отсутствуют по меньшей мере 22 наиболее близкие к С-концу аминокислоты SEQ ID NO:6, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

43. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-42, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHBL12*, кодирующий усеченный белок *HvHBL12*, содержащий N-концевой фрагмент *HvHBL12*, содержащий не более 228 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:6, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

44. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-43, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHBL12*, несущий преждевременный стоп-кодон среди любых из кодонов 1-228.

45. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-44, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHBL12*, несущий преждевременный стоп-кодон в 228 SEQ ID NO:5.

46. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-45, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHBL12*, кодирующий мутантный белок HvHBL12, причем указанный мутантный белок HvHBL12 несет мутацию W228stop SEQ ID NO: 6.

47. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-46, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHBL12*, предусматривающий мутацию G→A по нуклеотиду 684 кодирующей последовательности *HvHBL12* SEQ ID NO:5.

48. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-47, где растение ячменя представляет собой растение ячменя, депонированное в NCIMB под номером доступа NCIMB 43271, или его потомство.

49. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-48, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHBL12*, кодирующий полипептид SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:9, несущий один или несколько из полиморфизмов N141D, M142V или E184D.

50. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-49, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHBL12*, содержащий кодирующую последовательность SEQ ID NO:8.

51. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-50, где растение ячменя содержит менее 10% мРНК HvHBL12 по сравнению с таковой у растения ячменя, содержащего ген *HvHBL12* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип, причем мРНК HvHBL12 представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог, а ген HvHBL12 дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог, причем указанный функциональный гомолог характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:6.

52. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-51, где мутация в гене *HvHBL12* представляет собой мутацию, являющуюся причиной полной потери функции *HvHBL12*.

53. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-52, где указанное растение ячменя дополнительно несет мутацию в гене *HvHRT*, причем указанная мутация представляет собой мутацию в соответствии с любым из пунктов 3-26, и/или указанный ячмень дополнительно содержит по меньшей мере один ген α -амилазы в соответствии с любым из пунктов 27-32.

54. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 1-2, где указанное растение ячменя несет мутацию в гене *HvWRKY38*.

55. Растение ячменя в соответствии с пунктом 54, где мутация представляет собой:
а. мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *HvWRKY38*, кодирующего мутантный белок *HvWRKY38*, в котором отсутствует по меньшей мере одна из аминокислот 200-206, 220, 226, 250 и/или 252 SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12;

б. мутацию, приводящую в результате к делеции гена *HvWRKY38*.

56. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 54-55, где мутация опосредует введение преждевременного стоп-кодона в ген *HvWRKY38*.

57. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 54-56, где мутация представляет собой мутацию в сайте сплайсинга гена *HvWRKY38*.

58. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 54-57, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvWRKY38*, кодирующий мутантный белок *HvWRKY38*, в котором отсутствуют по меньшей мере аминокислоты 200-206 SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12.

59. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 54-58, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvWRKY38*, кодирующий мутантный белок *HvWRKY38*, в котором отсутствуют по меньшей мере 102 наиболее близкие к С-концу аминокислоты, например, по меньшей мере 104 наиболее близкие к С-концу аминокислоты, как, например,

по меньшей мере 128 наиболее близких к С-концу аминокислот, например, по меньшей мере 134 наиболее близкие к С-концу аминокислоты SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12.

60. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 54-59, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvWRKY38*, кодирующий мутантный белок *HvWRKY38*, в котором отсутствуют по меньшей мере 154 наиболее близкие к С-концу аминокислоты SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12.

61. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 54-60, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvWRKY38*, кодирующий усеченный белок *HvWRKY38*, содержащий N-концевой фрагмент *HvWRKY38*, содержащий не более 251 N-концевой аминокислоты SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12, например, не более 249 N-концевых аминокислот SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12, как, например, не более 225 N-концевых аминокислот SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12, например, не более 219 N-концевых аминокислот SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12, предпочтительно не более 199 N-концевых аминокислот SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12.

62. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 54-61, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvWRKY38*, несущий преждевременный стоп-кодон среди любых из кодонов 1-200.

63. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 54-62, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvWRKY38*, несущий преждевременный стоп-кодон среди любых из кодонов 1-200 SEQ ID NO:10.

64. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 54-63, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvWRKY38*, несущий преждевременный стоп-кодон в 200 SEQ ID NO:10.

65. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 54-64, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvWRKY38*, кодирующий мутантный белок *HvWRKY38*, причем указанный мутантный белок *HvWRKY38* несет мутацию W200stop SEQ ID NO: 11 или 12.

66. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 54-65, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvWRKY38*, предусматривающий мутацию G→A по нуклеотиду 600 кодирующей последовательности *HvWRKY38* SEQ ID NO:10.

67. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 54-66, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvWRKY38*, кодирующий полипептид SEQ ID NO:14 или полипептид SEQ ID NO:14, в котором аминокислота 98 представляет собой Met.

68. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 54-67, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvWRKY38*, содержащий кодирующую последовательность SEQ ID NO:13.

69. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 54-68, где растение ячменя содержит менее 10% мутантной мРНК *HvWRKY38* или мРНК *HvWRKY38* дикого типа по сравнению с таковой у растения ячменя, содержащего ген *HvWRKY38* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип, причем мРНК *HvWRKY38* представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:11 или 12 или его функциональный гомолог, а ген *HvWRKY38* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:11 или 12 или его функциональный гомолог, причем указанный функциональный гомолог характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:11 или 12.

70. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 54-69, где мутация в гене *HvWRKY38* представляет собой мутацию, являющуюся причиной полной потери функции *HvWRKY38*.

71. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 54-70, где указанное растение ячменя дополнительно несет мутацию в гене *HvHRT*, причем указанная мутация представляет собой мутацию в соответствии с любым из пунктов 3-26, и/или указанный ячмень дополнительно содержит по меньшей мере один ген α-амилазы в соответствии с любым из пунктов 27-32, и/или указанное растение ячменя дополнительно несет мутацию в гене *HvHBL12*, причем указанная мутация представляет собой мутацию в соответствии с любым из пунктов 37-52.

72. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит по меньшей мере пять генов α -амилазы, содержащих промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс.

73. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит по меньшей мере шесть, как, например, по меньшей мере семь генов α -амилазы, содержащих промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс.

74. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя представляет собой разновидность ярового ячменя с высокой урожайностью.

75. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где указанное растение ячменя содержит по меньшей мере один, как, например, по меньшей мере два, например, по меньшей мере три гена α -амилазы в кластере *amy2*, содержащих нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс.

76. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где нестандартные тандемно повторяющиеся W-боксы индивидуально выбраны из группы, состоящей из:

- (TGACR(X)_mYTGRCC);
- (TGACR(X)_mTTGACC);
- (TGACR(X)_mTTGAC);
- (TGAC(C)_n(X)_mYTGRCC);
- (TGAC(C)_n(X)_mCTGRCC);
- (TGAC(C)_n(X)_mYTGGCC);
- (TGAC(C)_n(X)_mCTGACC);
- (TGAC(C)_n(X)_mTTGGCC); и
- (TGAC(C)_n(X)_mTTGATC),

причем R представляет собой либо G, либо A, Y представляет собой либо C, либо T, n равняется 0 или 1 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20.

77. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где m представляет собой целое число в диапазоне 0-10.

78. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, причем m представляет собой целое число в диапазоне 0-6.

79. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где один или несколько генов α -амилазы содержат нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, индивидуально выбранный из следующих последовательностей:

- TGACGGTCGTATTGACC;
- TGACAGTGGTATTGGCC;
- TGACAGTGGTACTGGCC;
- GTGACAGTGGTATTGGCC;
- TGACGGTCGTATTGATC;
- TGACCGTCGTATTGATC; и
- TTGACTTGATC.

80. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит кластер *amy1_1*, причем по меньшей мере один из промоторов генов α -амилазы содержит нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, содержащий последовательность TTGATC.

81. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит кластер *amy1_1*, причем по меньшей мере один из промоторов генов α -амилазы содержит нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, содержащий последовательность CTGACGGTCGTATTGATC (SEQ ID NO:72).

82. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит кластер *amy1_1*, содержащий последовательность, показанную как «HENZ-43 amy1_1» на фиг. 11A.

83. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-82, где растение ячменя характеризуется активностью α -амилазы, составляющей по меньшей мере 100 Ед/г, как, например, по меньшей мере 110 Ед/г спустя 48 ч после инициации прорастания, при условии, что указанное растение ячменя является либо голозерным, либо по меньшей мере часть пленки была удалена до инициации прорастания.

84. Растение ячменя в соответствии с любым из пунктов 37-83, где растение ячменя характеризуется активностью предельной декстриназы, составляющей по меньшей

мере 20 мЕд/г спустя 48 ч после инициации прорастания, при условии, что указанное растение ячменя является либо голозерным, либо по меньшей мере часть пленки была удалена до инициации указанного прорастания.

85. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя характеризуется активностью α -амилазы спустя 48 ч после инициации прорастания, которая составляет по меньшей мере 105%, как, например, по меньшей мере 110%, например, по меньшей мере 120%, как, например, по меньшей мере 150%, например, по меньшей мере 170% активности α -амилазы у растения ячменя, которое не несет указанной мутации, но в остальном имеет тот же генотип.

86. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя характеризуется урожайностью, которая составляет по меньшей мере 90% от урожайности растения ячменя, не предусматривающего указанную мутацию, но в остальном имеющего тот же генотип.

87. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя характеризуется ТКВ по меньшей мере 38 г, как, например, по меньшей мере 40 г.

88. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя характеризуется содержанием крахмала по меньшей мере 55% вес/вес, как, например, по меньшей мере 60% вес/вес.

89. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя характеризуется содержанием белка по меньшей мере 9,5% вес/вес.

90. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя характеризуется высотой, которая составляет по меньшей мере 90% от высоты растения ячменя, не предусматривающего указанную мутацию, но в остальном имеющего тот же генотип.

91. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя характеризуется числом колосьев/м², которое составляет по меньшей мере

90% от числа колосьев/м² растения ячменя, не предусматривающего указанную мутацию, но в остальном имеющего тот же генотип.

92. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя не подвергается предуборочному прорастанию.

93. Растения ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где ядра зерен указанного растения ячменя в случае сбора с растений ячменя, подвергавшихся регулярному опрыскиванию водой в течение 20 дней, характеризуются процентом всхожести, который является таким же или превышает процент всхожести ядер зерен указанного растения ячменя, не подвергавшегося указанному опрыскиванию и собранного в состоянии спелости.

94. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где указанной частью растения ячменя являются ядра зерен.

95. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов или его потомство, где растение ячменя не было получено исключительно посредством по существу биологического способа.

96. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя было получено с помощью способа, предусматривающего нижеследующие стадии, или является потомством растения, полученного с помощью способа, предусматривающего нижеследующие стадии:

- мутагенез растений ячменя или его частей, например, с использованием химического мутагена, такого как NaN₃
- отбор растений ячменя, несущих любую из описанных в настоящем документе мутаций.

97. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя предусматривает по меньшей мере две, как, например, по меньшей мере три из следующих мутаций или свойств:

- a. несет мутацию в гене *HvHRT*, обуславливающую потерю функции HvHRT; и/или

- b. несет по меньшей мере один ген α -амилазы, содержащий мутантный промотор гена α -амилазы, предусматривающий мутацию в GARE-боксе; и/или
- c. несет по меньшей мере четыре гена α -амилазы, содержащих GARE-бокс с последовательностью ТААСААА; и/или
- d. несет по меньшей мере один ген α -амилазы в кластере *amy2*, содержащий мутантный промотор гена α -амилазы, предусматривающий мутацию в GARE-боксе, или который имеет последовательность ТААСААА; и/или
- e. несет мутацию в гене *HvHBL12*, обуславливающую потерю функции HvHBL12; и/или
- f. несет по меньшей мере четыре гена α -амилазы, содержащих промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, причем указанный нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс содержит последовательность (TGAC(C)_n(X)_mTTGACC), причем один или несколько из конкретных нуклеотидов были заменены или удалены, и причем X может представлять собой любой нуклеотид, n равняется 0 или 1 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20; и/или
- g. несет по меньшей мере один ген α -амилазы в кластере *amy2*, содержащий промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс;
- h. несет мутацию в гене *WRKY38*, обуславливающую потерю функции *WRKY38*.

98. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя предусматривает по меньшей мере две, как, например, по меньшей мере три из следующих мутаций:

- a. мутация в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы, например, любая из мутаций, описанных в настоящем документе выше в разделе «А-амилаза и растения ячменя, несущие мутацию в промоторе гена α -амилазы»,
- b. мутация в гене *HvHRT*, например, любая из мутаций, описанных в настоящем документе выше в разделе «Растение ячменя, несущее мутацию в гене *HRT*»
- c. мутация в гене *HvHBL12*, например, любая из мутаций, описанных в настоящем документе выше в разделе «Растение ячменя, несущее мутацию в гене *HvHBL12*»
- d. мутация в гене *HvWRKY38*, например, любая из мутаций, описанных в настоящем документе выше в разделе «Растение ячменя, несущее мутацию в гене *WRKY38*»

99. Растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где растение ячменя предусматривает мутацию в одном или нескольких дополнительных генах, например, одну или несколько из следующих мутаций:

- a. мутация в кодирующем LOX-1 гене, приводящая в результате к полной потере функционального LOX-1
- b. мутация в кодирующем LOX-2 гене, приводящая в результате к полной потере функционального LOX-2
- c. мутация в кодирующем MMT гене, приводящая в результате к полной потере функционального MMT
- d. мутация в кодирующем CslF6 гене, причем указанный мутантный ген кодирует мутантный белок CslF6 со сниженной активностью CslF6.

100. Продукт растительного происхождения, предусматривающий растение ячменя в соответствии с любым из предыдущих пунктов или его часть, или полученный из них.

101. Продукт растительного происхождения в соответствии с пунктом 100, где продукт растительного происхождения выбран из группы, состоящей из ячменной муки, зеленого солода и высушенного в печи солода.

102. Продукт растительного происхождения в соответствии с любым из пунктов 100-101, где продукт растительного происхождения представляет собой зеленый солод или высушенный в печи солод, предусматривающий обработанное(-ые) ядро(-ра) зерна(-ен) указанного растения ячменя.

103. Продукт растительного происхождения в соответствии с пунктами 100-102, где продукт растительного происхождения представляет собой молотый зеленый солод или молотый высушенный в печи солод.

104. Продукт растительного происхождения в соответствии с пунктами 100-101, где продукт растительного происхождения представляет собой ячменную муку.

105. Продукт растительного происхождения в соответствии с пунктом 100, где продукт растительного происхождения представляет собой сусло, полученное из ядер зерен указанного растения ячменя и/или из зеленого солода или высушенного в печи солода, предусматривающего обработанное(-ые) ядро(-ра) зерна(-ен) указанного растения ячменя.

106. Продукт растительного происхождения в соответствии с пунктом 100, где продукт растительного происхождения представляет собой напиток, полученный из указанного растения ячменя или его частей.

107. Напиток в соответствии с пунктом 106, где указанный напиток получен из ядер зерен указанного растения ячменя и/или из зеленого солода или высушенного в печи солода, предусматривающего обработанное(-ые) ядро(-ра) зерна(-ен) указанного растения ячменя.

108. Напиток в соответствии с любым из пунктов 106-107, где напиток представляет собой пиво.

109. Способ получения зеленого солода, причем указанный способ предусматривает стадии:

- (i) обеспечения ядер зерен растения ячменя в соответствии с любым из пунктов 1-99;
- (ii) замачивания указанных ядер зерен;
- (iii) проращивания замоченных ядер зерен в заданных условиях.

110. Способ получения высушенного в печи солода, причем указанный способ предусматривает стадии:

- (i) обеспечения ядер зерен растения ячменя в соответствии с любым из пунктов 1-99;
- (ii) замачивания указанных ядер зерен;
- (iii) проращивания замоченных ядер зерен в заданных условиях;
- (iv) сушки указанных пророщенных ядер зерен.

111. Способ получения напитка, причем указанный способ предусматривает стадии:

- (i) обеспечения ядер зерен растения ячменя в соответствии с любым из пунктов 1-99 и/или зеленого солода или высушенного в печи солода в соответствии с пунктами 102-103

- (ii) получения водного экстракта указанных ядер зерен и/или указанного солода
- (iii) переработки указанного водного экстракта в напиток.

112. Способ получения водного экстракта, причем указанный способ предусматривает стадии:

- a. обеспечения зерен растения ячменя в соответствии с любым из пунктов 1-99;
- b. подвержения зерен ячменя стадии проращивания, с получением тем самым пророщенных зерен, причем указанная стадия проращивания предусматривает выдерживание указанных зерен в водном растворе до тех пор, пока зерна не будут характеризоваться содержанием воды по меньшей мере 30%, причем через указанный водный раствор пропускают по меньшей мере 2 л O₂ на кг сухого веса зерен ячменя в ч;
- c. тонкого измельчения указанных пророщенных зерен, при этом указанные пророщенные зерна характеризуются содержанием воды по меньшей мере 20%, с условием, что указанные зерна ячменя не характеризуются содержанием воды ниже 20 ни в один из моментов времени между стадиями b) и c);
- d. получения водного экстракта указанных тонкоизмельченных пророщенных зерен, с получением тем самым водного экстракта ячменя.

113. Способ в соответствии с пунктом 112, в котором зерна ячменя погружены в водный раствор в ходе всей стадии проращивания.

114. Способ в соответствии с любым из пунктов 112-113, в котором стадия проращивания предусматривает:

- i. a. по меньшей мере одну стадию выдерживания указанных зерен в водном растворе, причем через указанный водный раствор пропускают по меньшей мере 2 л O₂ на кг сухого веса зерен ячменя в ч; и
- ii. b. по меньшей мере одну стадию выдерживания указанных зерен ячменя на воздухе.

115. Способ в соответствии с любым из пунктов 112-114, в котором через указанный водный раствор пропускают по меньшей мере 3 л, более предпочтительно по меньшей мере 4 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 5 л, даже более предпочтительно по меньшей мере 6 л O₂ на кг сухого веса зерен ячменя в ч.

116. Способ в соответствии с любым из пунктов 112-115, в котором указанный O_2 содержится в смеси газов, причем смесь газов представляет собой атмосферный воздух.

117. Способ в соответствии с любым из пунктов 112-116, в котором вся стадия проращивания не превышает 72 ч, более предпочтительно не превышает 60 ч, даже более предпочтительно не превышает 54 ч.

118. Способ в соответствии с любым из пунктов 112-117, в котором ячмень представляет собой пленчатый ячмень, и способ предусматривает стадию удаления по меньшей мере части указанной пленки до выдерживания указанных зерен в водном растворе.

119. Способ получения напитка, причем указанный способ предусматривает стадии:

- (i) получения водного экстракта с помощью способа в соответствии с любым из пунктов 112-118;
- (ii) переработки указанного экстракта в напиток.

120. Способ в соответствии с пунктом 119, в котором стадия (iii) предусматривает стадии:

- a. нагревания указанного водного экстракта, необязательно в присутствии хмеля или экстракта хмеля;
- b. охлаждения водного экстракта;
- c. сбраживания указанного водного экстракта с использованием дрожжей с получением тем самым получаемого при брожении напитка.

121. Способ в соответствии с любым из пунктов 119-120, в котором напиток представляет собой пиво.

122. Способ получения растения ячменя с высокой активностью α -амилазы, причем способ предусматривает стадии:

- a) обеспечения ядер зерен ячменя; и

b) осуществления неспецифического мутагенеза указанных ядер зерен ячменя, с индукцией тем самым по меньшей мере одной из следующих мутаций по меньшей мере в одном ядре зерна ячменя:

- мутация в гене *HvHRT*;
- мутация в одном или нескольких промоторах генов α -амилазы
- мутация в гене *HvHBL12*
- мутация в гене *WRKY38*

с) отбора ядер зерен ячменя или их потомства, несущих по меньшей мере одну из указанных мутаций.

123. Способ в соответствии с пунктом 122, в котором мутация является таковой, как определено в одном из пунктов 3-26, 27-32, 37-52, 54-70 и 72-82.

Примеры

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые, однако, не должны толковаться как ограничивающие настоящее изобретение.

Пример 1.

Ген *HvHRT* ячменя представлен в версии генома ячменя 2012 года как CDS под ID# MLOC_51005 (cv. Morex) или ID# AK362734 (cv. Naruna Nijo) и в виде геномной ДНК в morex_contig_368180 (cv. Morex) (IBSC, 2012). Согласно версии генома ячменя 2017 года (Mascher et al., 2017) *HvHRT* представлен как CDS и белковая последовательность под ID# HORVU2Hr1G035630. Согласно версии генома ячменя 2017 года *HvHRT* расположен на хромосоме 2H в положении с 150902998 п. о. по 150911087 п. о. Согласно версии генома ячменя 2017 года *HvHRT* аннотирован как *эффектор транскрипции 2*. Согласно версии генома ячменя 2012 года *HvHRT* состоит из трех экзонов. Исходная последовательность была внесена в NCBI под ID# AJ001317.1.

Мутант ячменя под названием HENZ-2 идентифицировали и выделяли, как описано в примерах 2 ниже. HENZ-2 несет нуклеотидную замену в гене *HvHRT* ячменя, приводящую в результате к появлению преждевременного стоп-кодона в кодирующей последовательности. Кодирующая последовательность гена HRT мутанта HENZ-2 в настоящем документе представлена как SEQ ID NO:3, тогда как последовательность мутантного белка, кодируемого мутантным геном *HRT*, представлена как SEQ ID NO:4.

Мутация приводит в результате к аминокислотной замене с замещением триптофана 431 на стоп-кодон (W431Stop). Растение, на основе которого был создан мутант, представляет собой cv. Paustian. Исходный выделенный мутант был гетерозиготным по полиморфизму, однако позднее он был размножен с получением гомозиготных мутантов.

Пример 2А

DdPCR-скрининг в отношении мутантов ячменя с конкретными мутациями в гене репрессора транскрипции *Hordeum vulgare*, *HRT*.

Растение ячменя, несущее конкретную мутацию в гене HvHRT, идентифицировали с применением способов, описанных в международной заявке на патент PCT/EP2017/065516.

DdPCR-анализ

Уникальный ddPCR-анализ был разработан специально для различения мутантного аллеля и аллеля дикого типа HvHRT по нуклеотидному положению 1293 в кодирующей последовательности SEQ ID NO:1 дикого типа. Как указано выше, доступно несколько генетических последовательностей HvHRT ячменя, и применяемый в этом примере ddPCR-анализ основывался на геномной последовательности cv. Himalaya из GenBank NCBI с номером: AJ001317.1. Зонд для обнаружения мутанта был комплементарным кодирующей последовательности, содержащей основание А в нуклеотидном положении 1293. Зонд для обнаружения эталона был комплементарным кодирующей последовательности, содержащей основание G в нуклеотидном положении 1293. Для амплификации геномной последовательности, окружающей нуклеотид 1293 в кодирующей последовательности, были сконструированы два фланкирующих праймера.

Специально для локуса HvHRT были сконструированы следующие праймеры и зонды:

– мишень-специфический прямой праймер (SEQ ID NO:15):
5'-CACGAAGATGAGCCTTG-3';

– мишень-специфический обратный праймер (SEQ ID NO:16):
5'-TTGGCTGATTTCTGTGC-3';

– мутант-специфический детекторный зонд (SEQ ID NO:17):
5'-AAGTGATTTGAGCGGCT-3' – меченный 6-карбоксифлуоресцеином (FAM);

– эталон-специфический детекторный зонд (SEQ ID NO:18):
5'-AGGAAGTGGTTTGAGCG-3' – меченный гексахлорфлуоресцеином (HEX).

Получали пул подвергнутых неспецифическому мутагенезу зерен ячменя, с последующим получением упорядоченной библиотеки, как описано в международной заявке на патент PCT/EP2017/065516 в WS1, WS2 и WS3 на стр. 66-69, а также в примерах 1-7. Применяемый для получения указанной библиотеки подвергнутых неспецифическому мутагенезу последовательностей сорт ячменя представлял собой ячмень cv. Paustian.

Определение того, содержит ли выборка из библиотеки мутированные зерна

Следующая стадия заключалась в определении того, содержала ли библиотека требуемые мутированные зерна. Скрининг осуществляли, главным образом как описано в международной заявке на патент PCT/EP2017/065516 в WS3 и в примерах 3-7, со следующими деталями:

– Скрининг осуществляли в отношении в общей сложности 376 подпулов (обозначенных от GLP#1 до GLP#376), вместе составляющих примерно 120000 мутированных растений ячменя.

Готовили один образец гДНК объемом 5 мкл, полученный из каждого подпула (обозначенного GT#1-GT#376). В отдельные лунки микротитрационного планшета добавляли образцы гДНК GT#1-GT#94, при этом каждая лунка также содержала 17 мкл реакционной смеси для ПЦР, и тщательно перемешивали путем пипетирования.

Микротитрационный планшет для ПЦР загружали в ридер капель QX200 (Bio-Rad) для капельного анализа. Полученные данные анализировали с применением программного обеспечения QuantaSoft (версия v1.7, Bio-Rad). Пороговое значение определяли с применением 2-мерного графика, установленное на 3700 и 2500 для амплификации для амплитуды в случае канала 1 и канала 2 соответственно. В результате сравнения отдельных значений для относительной распространенности было показано, что в отношении обнаружения мутантов, гДНК (GT#64) давала более высокий уровень сигналов в сравнении с любым другим образцом. Относительная распространенность гДНК (GT#64) составляла 0,062% против 0,012%, причем последнее значение соответствует средней относительной распространенности для всех из 94 тестируемых образцов гДНК.

Поиск отдельного(-ых) зерна(-ен), характеризующегося(-ихся) мутацией, представляющей интерес

Отдельные зерна ячменя, несущие мутацию гена, идентифицировали, главным образом как описано в международной заявке на патент PCT/EP2017/065516 в WS4 (стр. 69-72) и в примерах 8-15, включая следующие детали в последовательном порядке:

1. На основе результатов анализа полученной из GT#1-GT#94 гДНК с помощью H_vHRT-специфического ddPCR-исследования с высокой степенью вероятности было предположено, что 4500 зерен GLP#64 [соответствующего положительному образцу гДНК (GT#64)] будут включать одно или несколько зерен с представляющей интерес мутацией гена.

2. FGLP#64 был получен путем последовательного отбора 96 × 12 образцов зерен из GLP#64. Каждую аликвоту из 12 зерен помещали на листок бумаги для взвешивания, а затем в последовательном порядке фиксировали пинцетом, одновременно с применением фрезера (Marathon-3, Saeyang Microtech), оснащенного 1,6-мм сверлом для просверливания в эндосперме небольшого отверстия глубиной 2-3 мм. Вращательное движение приводило к перемещению муки из эндосперма на верхушку зерна и окружающую бумагу для взвешивания. Образцы с 12 просверленными зернами помещали в отдельные 2-мл лунки микротитрационного планшета с получением вторичного подпула просверленных зерен ячменя PDGLP#64. 96 образцов муки, мука каждого из которых получена из 12 просверленных зерен ячменя, переносили в отдельные лунки на 1,5 мл микротитрационного планшета (PFGLP#64) с сохранением системы нумерации образцов, совпадающей с просверленными зернами.

3. Затем PFGLP#64 подвергали экстракции гДНК с применением полуавтоматической процедуры экстракции ДНК, как подробно описано в инструкциях к набору NucleoSpin 96 Plant II (Macherey-Nagel). Следовательно, каждая лунка микротитрационного планшета содержала гДНК из муки 12 зерен.

4. Полученную из PFGLP#64 гДНК анализировали, как описано выше. Данные анализировали с применением программного обеспечения QuantaSoft (версия v1.7, Bio-Rad). Пороговое значение определяли с применением 2-мерного графика и устанавливали на 3700 для амплитуды в случае канала 1 и 2500 для амплитуды в случае канала 2. В результате сравнения отдельных значений для относительной распространенности было показано, что одна лунка PFGLP#64 содержала мутантное зерно. Для лунки C04 была показана относительная распространенность 3,92%, что указывает на наличие гетерозиготного мутантного PDGLP#64.

5. Все 12 зерен из лунки C04 PDGLP#64 были подвергнуты проращиванию. Собирали материал в виде листьев от 12 сеянцев и подвергали его экстракции ДНК с применением REDExtract (Sigma Aldrich). Полученную из образцов листьев гДНК анализировали, как описано выше. Данные анализировали с применением программного обеспечения QuantaSoft (версия v1.7, Bio-Rad). Пороговое значение определяли с применением 2-мерного графика и устанавливали на 3700 для амплитуды в случае канала

1 и 2500 для амплитуды в случае канала 2. Для одного сеянца, полученного из лунки C04 PDGLP#64, была показана относительная распространенность 45%, что подтверждает наличие гетерозиготного мутанта. Семена от указанного растения размножали и потомство скрещивали для получения гомозиготных растений. Гомозиготные растения размножали с целью увеличения количества материала. Гомозиготные по мутации растения были обозначены как HENZ-2.

Следовательно, растения ячменя HENZ-2 предусматривают мутацию G→A по нуклеотиду 1293 кодирующей последовательности *HvHRT* SEQ ID NO:1. Таким образом, HENZ-2 несет мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок *HvHRT*, предусматривающий мутацию W431stop SEQ ID NO:2.

Пример 2В

Мутант HENZ-2а ячменя получали, главным образом как описано в примере 2А, за исключением того, что применяемый для получения библиотеки подвергнутых неспецифическому мутагенезу последовательностей сорт ячменя представлял собой ячмень cv. Planet. Применяли те же праймеры и зонды.

HENZ-2а также предусматривает мутацию G→A по нуклеотиду 1293 кодирующей последовательности *HvHRT* SEQ ID NO:1. Таким образом, HENZ-2а также несет мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок *HvHRT*, предусматривающий мутацию W431stop SEQ ID NO:2.

Таким образом, в то время как HENZ-2 может считаться имеющим генетическое окружение cv. Paustian, HENZ-2а может считаться имеющим генетическое окружение cv. Planet.

Пример 3А

Мутантные растения ячменя HENZ-2, а также контрольные гомозиготные растения ячменя, размножали на поле. Контрольные гомозиготные растения получали в результате скрещиваний описанного в примере 2А гетерозиготного мутанта, и контрольные гомозиготные растения содержат ген *HvHRT* дикого типа, кодирующий *HvHRT* SEQ ID NO:2. Следовательно, контрольные гомозиготные растения, как предположено, идентичны HENZ-2, за исключением того, что они не несут мутации гена *HvHRT*.

Мутантные растения ячменя HENZ-2, а также контрольные гомозиготные растения ячменя, размножали на поле в Новой Зеландии (1 земельный участок) и на острове Фюн (5 отдельных земельных участков). Высевали 3,6-кратный избыток ТКВ в соответствии со стандартной процедурой на 10 м². Земельные участки обрабатывали 150 кг азота на гектар

и процедуры обработки фунгицидами выполняли в соответствии со стандартными в области сельского хозяйства процедурами. В Новой Зеландии каждый земельный участок составлял примерно 2 м², тогда как на острове Фюн каждый земельный участок составлял примерно 7,5 м². Земельные участки обрабатывали в повторах и HENZ-2 и контроль культивировали близко друг к другу. Для возможности сравнения HENZ-2 и контроль выращивали на земельных участках одинакового размера. Урожайность определяли путем сбора растений ячменя в состоянии зрелости и определения веса ядер зерен на земельный участок. Вес ядра зерна для 1000 ядер зерен (TKW) определяли путем взвешивания заданного числа ядер зерен и расчета веса для 1000 ядер зерен. Содержание крахмала (крахмал) и содержание белка (белок) ядер зерен ячменя определяли с помощью анализа в ближней инфракрасной области с применением анализатора зерна Foss Tecator Infratec 1241 в соответствии с инструкциями производителя (Foss, Дания). Содержание крахмала и содержание белка представлено как % вес сухого крахмала или белка от общего сухого веса ядер зерен. Среднюю высоту растений определяли путем измерения высоты растения для выбранных растений от низа (начало первого междоузлия, сразу выше корней) к вершине колоса (колос ячменя удерживали в вертикальном положении). Число колосьев на м² определяли путем подсчета числа колосьев на растениях из заданной области и расчета числа колосьев на м².

Результаты показаны в таблице 1 ниже.

Таблица 1.

	Урожайность Кг/земельный участок	TKW г	Крахмал % вес/вес	Белок % вес/вес	Высота растения см	Колосьев/м²
HENZ-2 Новая Зеландия	1,7	40,7	62,3	11,6	ND	ND
Контроль Новая Зеландия	1,6	42,6	62,3	11,6	ND	ND
HENZ-2 Остров Фюн	5,6	53,8	62,6	11,5	61,8	1033,6
Контроль Остров Фюн	5,4	53,5	62,3	11,7	61,3	1068,8

Как видно из данных таблицы 1, между мутантом HENZ-2 и контрольными растениями на удивление не наблюдается значимой разницы в урожайности, ТКВ, содержании крахмала, содержании белка, высоте растения и числе колосьев/м².

Пример 3В

Предуборочное прорастание является крайне нежелательным, поскольку оно приводит к немедленной потере жизнеспособности семян. Эксперимент по предуборочному прорастанию проводили для оценки степени предуборочного прорастания для мутанта HENZ-2 ячменя. В качестве контролей, определяли предуборочное прорастание ячменя дикого типа cv. Paustian и cv. Flagship. Ячмень cv. Flagship, как известно, характеризуется высоким уровнем предуборочного прорастания. Эксперимент осуществляли следующим образом. HENZ-2, Paustian и Flagship выращивали на поле на отдельных земельных участках близко друг к другу. При зрелости зерна с части каждого участка собирали урожай (сбор урожая 1). Остальные области земельного участка орошали путем опрыскивания водой растений в течение 10 мин в час на протяжении 12 часов в сутки в течение 10 дней, затем с части каждой области земельного участка собирали урожай (сбор урожая 2). Оставшуюся область земельного участка подвергали аналогичной схеме орошения в течение еще 10 дней, а затем собирали урожай (сбор урожая 3). На следующий день после сбора урожая начинали проводить тесты на прорастание для всех трех сборов урожая. Тесты на прорастание осуществляли путем помещения 100 ядер зерен на фильтровальную бумагу в чашку Петри диаметром 9,5 см и добавления либо 3 мл, либо 5 мл воды. Процент всхожести ядер зерен подсчитывали спустя 3 дня после выдержки, и он представлен как % проросших ядер зерен. Разновидности ячменя со сниженным процентом всхожести от сбора урожая 1 до сборов урожая 2 и 3 считаются такими, которые подвергаются предуборочному прорастанию, тогда как разновидности ячменя с таким же или повышенным процентом всхожести от сбора урожая 1 до сборов урожая 2 и 3 не подвергаются предуборочному прорастанию. Результат показан в таблице 2.

Таблица 2.

	1. сбор урожая		2. сбор урожая		3. сбор урожая		Разн.* 3 мл	Разн.* 5 мл
	G.R. (%) 3 мл	G.R. (%) 5 мл	G.R. (%) 3 мл	G.R. (%) 5 мл	G.R. (%) 3 мл	G.R. (%) 5 мл		
HENZ-2	72	79	98	98	98	98	21	16

REP1								
HENZ-2 REP2	79	83	78	95	95	95		
Paustian REP1	67	80	60	97	97	98	24	17
Paustian REP2	73	77	94	90	90	92		
Flagship REP1	95	96	74	91	81	81	-18	-18
Flagship REP2	99	99	64	85	78	79		

G.R. обозначает процент всхожести в %

Разн.* обозначает разницу между средним процентом всхожести для первого и третьего сборов урожая в виде процентов.

Как HENZ-2, так и cv. Paustian характеризовались повышением процента всхожести от первого до третьего сбора урожая, и, таким образом, ни одно из этих растений ячменя не подвергалось предуборочному прорастанию. Также для HENZ-2 и cv. Paustian не наблюдали значимой разницы в повышении процента всхожести от первого до третьего сбора урожая. В отличие от этого, cv. Flagship характеризовался значимым снижением процента всхожести, и, таким образом, как и ожидалось, в его случае имело место предуборочное прорастание.

Пример 3С

Материал в виде зерна от мутантных растений ячменя HENZ-2 и от растений ячменя cv. Paustian, выращенных на поле в одинаковых условиях, проращивали в рамках стандартного теста на прорастание:

- зерна сортировали по размеру с применением сортировщика зерен Pfeuffer > применяли зерна размером 2,5 и 2,8 мм
 - 100 целых зерен помещали на 2 куска бумаги Whatman (класс 1, 85 мм, номер по каталогу 1001-085) в чашки Петри диаметром 90 мм и добавляли 4 мл дистиллированной воды
 - Еще 100 целых зерен помещали на 2 куска бумаги Whatman (класс 1, 85 мм, номер по каталогу 1001-085) в чашки Петри диаметром 90 мм и добавляли 8 мл дистиллированной воды (условия с высоким содержанием воды)
- Чашки Петри закрывали и хранили в темной камере, накрытой влажной тканью, при 20°C

- Чашки Петри диаметром 4 мл проверяли спустя 24 ч, 48 ч и 72 ч, прорастающие зерна (появление первичного корешка) собирали с чашки Петри и отмечали число пророщенных зерен
- Чашки Петри диаметром 8 мл проверяли спустя 72 ч, прорастающее зерно (появление первичного корешка) собирали с чашки Петри и отмечали число пророщенных зерен

Результаты спустя 72 ч показаны на фиг. 1. Всхожесть зерна от ячменя дикого типа и HENZ-2 в 4 мл воды составляла 99,5%. Это указывает на то, что материал не находился в состоянии покоя. В случае тестирования в отношении чувствительности к высокому содержанию воды (8 мл воды), HENZ-2 характеризовался значимо более высокими показателями процента всхожести (80% в сравнении с 40% у ячменя дикого типа). Это указывает на то, что HENZ-2 демонстрирует значимо лучшие результаты при водном и кислородном стрессе, как наблюдали в слое солода или в чане с потоком воздуха, как описано в примере 4.

Пример 4.

Материал в виде зерна от мутантов HENZ-2 ячменя и от растений ячменя св. Paustian, выращенных на поле в одинаковых условиях, проращивали в чане с водой, главным образом как описано в примере 1 международной заявки на патент РСТ/EP2017/065498, со следующими деталями: 200 г зерен ячменя (сухой вес) выдерживали в течение 48 ч в чане и покрывали водой, содержащей 1 мМ GA, при этом зерна подвергали действию потока воздуха в режиме 90 л/ч на кг сухого веса зерен ячменя. Содержание воды в зерне измеряли в ходе прорастания спустя 24 ч и 48 ч, и результаты показаны на фиг. 2. HENZ-2 в обоих случаях характеризовался более высоким содержанием воды в зерне по сравнению с таковым у ячменя дикого типа, демонстрируя улучшенные свойства прорастания.

Уровень экспрессии генов α -амилаз (*amy1_1* и *amy1_2*) и β -глюкоаназ 2A и 2B (BGL2A) измеряли в этом же материале спустя 48 ч с применением ddPCR (Biorad) со специфическими в отношении указанных генов праймерами и зондами. Использовали общий протокол по ddPCR в отношении экспрессии генов, описанный в примере 20. Праймеры и зонд, применяемые для определения уровня экспрессии BGL2A, также опосредуют амплификацию и обнаружение BGL2B, и, таким образом, определяли объединенную экспрессию BGL2A и BGL2B (обозначено как «BGL2A» на фиг. 3). Результаты показаны на фиг. 3. В случае материала HENZ-2 был показан значимо более высокий уровень экспрессии всех тестируемых генов, что указывает на улучшенные

свойства прорастания. Последовательность BGL2A доступна под номером доступа HORVU7Hr1G120450.1.

Активность α -амилаз, β -амилазы и предельной декстриназы измеряли в этом же материале спустя 24 ч и спустя 48 ч с применением стандартных анализов Megazyme следующим образом.

Приготовление образцов

Перед проведением анализа ферментативной активности образцы пророщенных зерен мололи с применением стандартной мельницы Foss Cyclotech (Foss, Дания), оснащенной размольным кольцом из карбида вольфрама (Foss 10004463), покрытым слоем никеля лопастным колесом (Foss 1000 2666) и выходным ситом на 1 мм (Foss 10001989). Все измерения ферментативной активности в пророщенных зернах ячменя выполняли в пределах 48 ч после помола образца.

Активность α -амилазы

Активность α -амилазы пророщенных зерен определяли с использованием муки, полученной, как описано выше в разделе «Приготовление образцов». Для анализов по определению активности α -амилазы использовали набор Ceralpha от Megazyme с применением стандартного лабораторного оборудования. Анализы выполняли в соответствии с протоколом производителя (K-CERA 01/12), включая расчет активности α -амилазы.

Активность β -амилазы

В случае измерения активности бета-амилазы пророщенных зерен, муку получали, как описано выше в разделе «Приготовление образцов». Для выполнения анализов активности β -амилазы следовали рекомендациям, предоставленным с набором Betamy1 от Megazyme (K-BETA3).

Активность предельной декстриназы

Для измерения активности предельной декстриназы в пророщенных зернах муку получали, как описано выше в разделе «Приготовление образцов». Активность предельной декстриназы определяли с применением набора Limit Dextrizyme T-LDZ1000 от Megazyme. Анализы, включая измерения активности, выполняли в соответствии с протоколом производителя (T-LDZ1000 07/9).

Результаты показаны на фиг. 4. В случае материала HENZ-2 была показана значимо более высокая активность всех тестируемых ферментов, что указывает на улучшенные свойства прорастания (исключение: образец для измерения α -амилазы спустя 24 ч, который в любом случае в общем характеризовался низкими результатами).

Пример 5.

Материал в виде зерна от мутантов HENZ-2 ячменя и от растений ячменя св. Paustian, выращенных на поле в одинаковых условиях, проращивали в чане с водой, главным образом как описано в примере 9 международной заявки на патент PCT/EP2017/065498, со следующими деталями: 200 г зерен ячменя подвергали лушению в течение 1 мин, как описано в примере 8 международной заявки на патент PCT/EP2017/065498. Затем лушенные зерна ячменя переносили в чан и покрывали 500 мл воды, содержащей 0,01% H_2O_2 , пеногаситель-204, 1 mM GA_3 , и выдерживали в течение 24 ч с аэрацией при потоке воздуха 90 л/ч. Это соответствует 18 л воздуха в ч на 100 мл воды. Избыток воды сливали и зерна выдерживали в течение 24 ч с аэрацией при потоке воздуха 90 л/ч). Активность α -амилаз, β -амилазы и предельной декстриназы измеряли спустя 24 ч и спустя 48 ч после прорастания с применением стандартных анализов Megazyme, как описано в примере 4. Кроме того, определяли активность этих ферментов в солоде, полученном в соответствии со стандартом EBC 19 (полученном у Institute Francais De La Brasserie Et De La Malterie (IFBM), Франция).

Результаты показаны на фиг. 5. В случае материала HENZ-2 была показана значимо более высокая активность всех тестируемых ферментов, что указывает на улучшенные свойства прорастания. Показатели активности, измеренные для HENZ-2, даже превышали стандарт EBC 19.

Пример 6.

Мутант ячменя под названием HENZ-10 идентифицировали и выделяли, как описано ниже. HENZ-10 несет нуклеотидную замену в гене *HvHBL12* ячменя, приводящую в результате к появлению преждевременного стоп-кодона при трансляции белка HBL12. Аминокислотная замена представляет собой замещение триптофана 228 на стоп-кодон (W228Stop). Растение, на основе которого был создан мутант, представляет собой разновидность голозерного ячменя (в настоящем документе также называемого «голозерный ячмень 1»). Растения голозерного ячменя обычно характеризуются более высокой активностью α -амилазы в ходе прорастания по сравнению с таковой у разновидностей пленчатого ячменя. Кодированная последовательность мутантного гена

HvHBL12 в настоящем документе представлена как SEQ ID NO:8, тогда как последовательность мутантного белка, кодируемого мутантным геном *HvHBL12*, представлена как SEQ ID NO:9.

Исходное выделенное мутантное растение ячменя было гомозиготным по мутации.

Пример 7А

DdPCR-скрининг в отношении мутантов ячменя с конкретными мутациями в гене *HvHBL12*.

Растение ячменя, несущее конкретную мутацию, идентифицировали с применением способов, описанных в международной заявке на патент PCT/EP2017/065516.

DdPCR-анализ

Уникальный ddPCR-анализ был разработан специально для различения мутантного аллеля и аллеля дикого типа *HvHBL12* по нуклеотидному положению 684 в кодирующей последовательности дикого типа (номер в GenBank NCBI: JX878491.1). Имеются несколько отличающиеся последовательности *HvHBL12*, и ddPCR-анализ был разработан на основе последовательности с номером в GenBank NCBI: JX878491.1. Зонд для обнаружения мутанта был комплементарным кодирующей последовательности, содержащей основание А в нуклеотидном положении 684 (соответствующем нуклеотиду 684 SEQ ID NO:5). Зонд для обнаружения эталона был комплементарным кодирующей последовательности, содержащей основание G в нуклеотидном положении 684. Для амплификации геномной последовательности, окружающей нуклеотид 684 в кодирующей последовательности, были сконструированы два фланкирующих праймера.

Специально для локуса *HvHBL12* были сконструированы следующие праймеры и зонды:

- мишень-специфический прямой праймер (SEQ ID NO:19):
5'-GTCGTCGTTCCCGTT-3';
- мишень-специфический обратный праймер (SEQ ID NO:20):
5'-CTGCAGGTCTGCTCC-3';
- мутант-специфический детекторный зонд (SEQ ID NO:21):
5'-ACTCGAGCTGACCGT-3' – меченный 6-карбоксихлорофлуоресцеином (FAM);
- эталон-специфический детекторный зонд (SEQ ID NO:22):
5'-CTCGAGCTGGCCGT-3' – меченный гексахлорофлуоресцеином (HEX).

Получали пул подвергнутых неспецифическому мутагенезу зерен ячменя, с последующим получением упорядоченной библиотеки, как описано в международной заявке на патент PCT/EP2017/065516 в WS1 и WS2 на стр. 66-67, а также в примерах 1-2. Применяемый для получения указанной библиотеки подвергнутых неспецифическому мутагенезу последовательностей сорт ячменя представлял собой ячмень голозерного типа 1.

Определение того, содержит ли выборка из библиотеки мутированные зерна

Следующая стадия заключалась в определении того, содержала ли библиотека требуемые мутированные зерна. Скрининг осуществляли, главным образом как описано в международной заявке на патент PCT/EP2017/065516 в WS3 (стр. 67-69) и в примерах 3-7, со следующими деталями:

– Скрининг осуществляли в отношении в общей сложности 376 подпулов (обозначенных от GLP#1 до GLP#376), составляющих примерно 120000 мутированных растений ячменя.

– Готовили один образец гДНК объемом 5 мкл, полученный из каждого подпула (обозначенного GT#1-GT#376). В отдельные лунки микротитрационного планшета добавляли образцы гДНК GT#283-GT#376, при этом каждая лунка также содержала 17 мкл реакционной смеси для ПЦР, и тщательно перемешивали путем пипетирования.

Микротитрационный планшет для ПЦР загружали в ридер капель QX200 (Bio-Rad) для капельного анализа. Полученные данные анализировали с применением программного обеспечения QuantaSoft (версия v1.7, Bio-Rad). Пороговое значение определяли с применением 2-мерного графика, установленное на 3500 и 1500 для амплификации для амплитуды в случае канала 1 и канала 2 соответственно. В результате сравнения отдельных значений для относительной распространенности было показано, что в отношении обнаружения мутантов, гДНК (GT#291) давала более высокий уровень сигналов в сравнении с любым другим образцом. Относительная распространенность гДНК (GT#291) составляла 0,105% против 0,0094%, причем последнее значение соответствует средней относительной распространенности для всех из 94 тестируемых образцов гДНК.

Поиск отдельного(-ых) зерна(-ен), характеризующегося(-ихся) мутацией, представляющей интерес

Отдельные зерна ячменя, несущие мутацию гена, идентифицировали, главным образом как описано в международной заявке на патент PCT/EP2017/065516 в WS4 (стр. 69-72) и в примерах 8-15, включая следующие детали в последовательном порядке:

6. На основе результатов анализа полученной из GT#283-GT#376 гДНК с помощью H_vHBL12-специфического ddPCR-исследования с высокой степенью вероятности было предположено, что 4500 зерен GLP#291 [соответствующего положительному образцу гДНК (GT#291)] будут включать одно или несколько зерен с представляющей интерес мутацией гена.

7. FGLP#291 был получен путем последовательного отбора 96 × 12 образцов зерен из GLP#291. Каждую аликвоту из 12 зерен помещали на листок бумаги для взвешивания, а затем в последовательном порядке фиксировали пинцетом, одновременно с применением фрезера (Marathon-3, Saeyang Microtech), оснащенного 1,6-мм сверлом для просверливания в эндосперме небольшого отверстия глубиной 2-3 мм. Вращательное движение приводило к перемещению муки из эндосперма на верхушку зерна и окружающую бумагу для взвешивания. Образцы с 12 просверленными зернами помещали в отдельные 2-мл лунки микротитрационного планшета с получением вторичного подпула просверленных зерен ячменя PDGLP#291. 96 образцов муки, мука каждого из которых получена из 12 просверленных зерен ячменя, переносили в отдельные лунки на 1,5 мл микротитрационного планшета (PFGLP#291) с сохранением системы нумерации образцов, совпадающей с просверленными зернами.

8. Затем PFGLP#291 подвергали экстракции гДНК с применением полуавтоматической процедуры экстракции ДНК, как подробно описано в инструкциях к набору NucleoSpin 96 Plant II (Macherey-Nagel). Следовательно, каждая лунка микротитрационного планшета содержала гДНК из муки 12 зерен.

9. Полученную из PFGLP#291 гДНК анализировали, как описано выше. Данные анализировали с применением программного обеспечения QuantaSoft (версия v1.7, Bio-Rad). Пороговое значение определяли с применением 2-мерного графика и устанавливали на 4000 для амплитуды в случае канала 1 и 1500 для амплитуды в случае канала 2. В микротитрационном планшете были идентифицированы три отдельные лунки (E03, E11, G01), для которых была показана относительная распространенность 12,5%, 4,42% и 7,3%, что во всех случаях указывает на наличие трех отдельных мутантов в 3 независимых лунках PDGLP#291.

10. Все 12 зерен из лунки G01 PDGLP#291 были подвергнуты проращиванию. Собирали материал в виде листьев от 12 сеянцев и подвергали его экстракции ДНК с применением REDExtract (Sigma Aldrich). Полученную из образцов листьев гДНК анализировали, как описано выше. Данные анализировали с применением программного обеспечения QuantaSoft (версия v1.7, Bio-Rad). Пороговое значение определяли с применением 2-мерного графика и устанавливали на 6000 для амплитуды в случае канала

1 и 2000 для амплитуды в случае канала 2. Для одного сеянца, полученного из лунки H01 PDGLP#291, была показана относительная распространенность 96,9%, что подтверждает наличие гомозиготного мутанта. Указанное растение размножали с целью увеличения количества материала. Гомозиготные по мутации растения были обозначены как HENZ-10.

Следовательно, растения ячменя HENZ-10 предусматривают мутацию G→A по нуклеотиду 684 кодирующей последовательности *HvHBL12* (SEQ ID NO:5). Таким образом, HENZ-10 содержит ген *HvHBL12*, содержащий кодирующую последовательность SEQ ID NO:8. Таким образом, HENZ-10 несет мутантный ген *HvHBL12*, кодирующий мутантный белок HvHBL12, предусматривающий мутацию W228stop.

Пример 7B

Мутант HENZ-61 ячменя получали, главным образом как описано в примере 7A, за исключением того, что применяемый для получения библиотеки подвергнутых неспецифическому мутагенезу последовательностей сорт ячменя представлял собой ячмень cv. Planet. Применяли те же праймеры и зонды.

HENZ-61 также содержит ген *HvHBL12*, содержащий кодирующую последовательность SEQ ID NO:8. Таким образом, HENZ-61 также несет мутантный ген *HvHBL12*, кодирующий мутантный белок HvHBL12, предусматривающий мутацию W228stop.

Таким образом, в то время как HENZ-10 может считаться таким, который был создан на основе голозерного ячменя 1, HENZ-61 может считаться таким, который был создан на основе cv. Planet.

Пример 8A

Мутантные растения ячменя HENZ-10 и растения голозерного ячменя 1 культивировали на земельных участках на поле в одинаковых условиях. Определяли различные агрономические признаки, включая среднюю высоту растений. Мутантные растения ячменя HENZ-10 по результатам визуальной проверки выглядели здоровыми. Среднюю высоту растений определяли путем измерения высоты растения для выбранных растений на земельный участок для пяти отдельных полевых участков от низа (начало первого междоузлия, сразу выше корней) к вершине колоса (колос ячменя удерживали в вертикальном положении). Результаты показаны на фиг. 10. Интересно, что различия в высоте растения между мутантными растениями ячменя HENZ и родительскими растениями голозерного ячменя 1 не наблюдали.

Мутантные растения ячменя HENZ-10, а также растения голозерного ячменя 1 размножали на поле в Новой Зеландии (1 земельный участок) и на острове Фюн (5 отдельных земельных участков). Размножение, размеры земельных участков и т. п. были главным образом такими, как описано выше в примере 3А. Урожайность, вес ядра зерна для 1000 ядер зерен (ТКВ), содержание крахмала (крахмал) (в виде % сухого крахмала от общего сухого веса ядер зерен), содержание белка (белок) (в виде % сухого белка от общего сухого веса ядер зерен), высоту растения и число колосьев на м² определяли, как описано в примере 3А выше.

Таблица 3.

	Урожайность Кг/земельный участок	ТКВ г	Крахмал % вес/вес	Белок % вес/вес	Высота растения см	Колосьев/м²
HENZ-10 Новая Зеландия	1,9	42,2	65,1	12,1	ND	ND
Голозерный ячень 1 Новая Зеландия	1,8	43,3	65,8	11,4	ND	ND
HENZ-10 Остров Фюн	4,8	46,3	62,8	12,9	70,6	995,2
Голозерный ячень 1 Остров Фюн	5,2	48,2	63,9	12,1	70,2	1030,4

Как видно из данных таблицы 1, между мутантом HENZ-10 и контрольными растениями на удивление не наблюдается значимой разницы в урожайности, ТКВ, содержании крахмала, белка и высоте растения.

Пример 8В

Мутантные растения ячменя HENZ-61, а также растения ячменя дикого типа cv. Planet, размножали на поле на отдельных, но близлежащих земельных участках. Урожайность, вес ядра зерна для 1000 ядер зерен (ТКВ), содержание крахмала (крахмал), содержание белка (белок), высоту растения и число колосьев на м² определяли, как описано в примере 3А выше.

Ожидалось, что мутантные растения ячменя HENZ-61 будут характеризоваться урожайностью, весом ядра зерна для 1000 ядер зерен (ТКВ), содержанием крахмала

(крахмал), содержанием белка (белок), высотой растения и/или числом колосьев на м², подобными таковым у cv. Planet.

Пример 9.

Материал в виде зерна от мутантных растений ячменя HENZ-10 и от растений голозерного ячменя 1, выращенных на поле в одинаковых условиях, проращивали в рамках стандартного теста на прорастание в чашках Петри следующим образом:

- зерна сортировали по размеру с применением сортировщика зерен Pfeuffer > применяли зерна размером 2,5 и 2,8 мм
- 100 целых зерен помещали на 2 куса бумаги Whatman (класс 1, 85 мм, номер по каталогу 1001-085) в чашки Петри диаметром 90 мм и добавляли 4 мл дистиллированной воды
- Еще 100 целых зерен помещали на 2 куса бумаги Whatman (класс 1, 85 мм, номер по каталогу 1001-085) в чашки Петри диаметром 90 мм и добавляли 8 мл дистиллированной воды
- Чашки Петри закрывали и хранили в темной камере, накрытой влажной тканью, при 20°C
- Чашки Петри диаметром 4 мл проверяли спустя 24 ч, 48 ч и 72 ч, прорастающие зерна (появление первичного корешка) собирали с чашки Петри и отмечали число пророщенных зерен
- Чашки Петри диаметром 8 мл проверяли спустя 72 ч, прорастающее зерно (появление первичного корешка) собирали с чашки Петри и отмечали число пророщенных зерен.

Результаты спустя 72 ч показаны на фиг. 6. Процент всхожести зерна от голозерного ячменя 1 дикого типа и HENZ-10 в 4 мл воды составлял 98 и 97,5% соответственно. Это указывает на то, что материал не находился в состоянии покоя. В случае тестирования в отношении чувствительности к высокому содержанию воды (8 мл воды), HENZ-10 характеризовался значимо более высокими показателями процента всхожести (100% в сравнении с 89% у ячменя дикого типа). Это указывает на то, что HENZ-10 демонстрирует лучшие результаты при водном и кислородном стрессе, условиях, которые могут иметь место в слое солода или в чане с потоком воздуха, как описано в примере 4.

Пример 10.

Материал в виде зерна от мутантов HENZ-10 ячменя и от растений голозерного ячменя 1, выращенных на поле в одинаковых условиях, проращивали в наполненной водой

колбе Эрленмейера на шейкере в течение 48 ч при комнатной температуре. Уровни экспрессии генов α -амилаз (*amy1_1* и *amy1_2*), предельной декстриназы (LD), α -глюкозидазы 97 (AGL97) и β -глюканазы 2A и 2B (BGL2A и BGL2B) измеряли спустя 48 ч с применением ddPCR со специфическими в отношении указанных генов праймерами и зондами. Результаты показаны на фиг. 7. Последовательность BGL2B доступна под номером HORVU1Hr1G057680.1. В случае материала HENZ-10 был показан повышенный уровень экспрессии всех тестируемых генов, что указывает на улучшенные свойства прорастания по сравнению с таковыми у его родительского растения голозерного ячменя 1 дикого типа. Следует отметить, что у голозерного ячменя 1 изменения в эндосперме начинаются раньше, по сравнению с таковыми у множества разновидностей пленчатого ячменя дикого типа, о чем свидетельствует, например, ранняя высокая активность α -амилазы. Следовательно, примечательно, что для HENZ-10 показан повышенный уровень экспрессии всех тестируемых генов по сравнению с таковым у голозерного ячменя 1. Таким образом, несмотря на то, что голозерный ячмень 1 уже характеризуется ранней высокой активностью α -амилазы, HENZ-10 при этом характеризуется еще более высокой активностью α -амилазы.

Пример 11.

Материал в виде зерна от мутантов HENZ-10 ячменя и от растений голозерного ячменя 1, выращенных на поле в одинаковых условиях, проращивали в чане с водой, главным образом как описано в примере 1 международной заявки на патент PCT/EP2017/065498, со следующими деталями: 200 г зерен ячменя (сухой вес) выдерживали в течение 48 ч в чане и покрывали водой, содержащей 1 мМ GA, при этом зерна подвергали действию потока воздуха в режиме 90 л/ч. Уровень экспрессии генов α -амилаз (*amy1_1* и *amy1_2*), предельной декстриназы (LD) и β -глюканазы 2A (BGL2A) измеряли спустя 48 ч с помощью ddPCR с применением специфических в отношении указанных генов праймеров и зондов. Использовали общий протокол по ddPCR в отношении экспрессии генов, описанный в примере 20. Результаты показаны на фиг. 8. В случае материала HENZ-10 был показан значимо более высокий уровень экспрессии всех тестируемых генов, что указывает на улучшенные свойства прорастания по сравнению с таковыми у голозерного ячменя 1 дикого типа.

Показатели активности α -амилаз, β -амилазы и предельной декстриназы измеряли в этом же материале спустя 24 ч и спустя 48 ч с применением стандартных анализов Megazyme, как описано в примере 4. Результаты показаны на фиг. 9. В случае материала

HENZ-10 была показана более высокая активность всех тестируемых ферментов, что указывает на улучшенные свойства прорастания.

Пример 12А

Растение ячменя под названием HENZ-50 идентифицировали и выделяли, главным образом как описано в примере 2А выше. HENZ-50 несет нуклеотидную замену в гене *WKRY38* ячменя, приводящую в результате к образованию гена, содержащего преждевременный стоп-кодон в кодирующей последовательности. Таким образом, HENZ-50 несет мутацию G→A по нуклеотиду 600 кодирующей последовательности *HvWRKY38* (SEQ ID NO:10). Кодирующая последовательность *WRKY38* ячменя *cv. Ingrid* в настоящем документе представлена как SEQ ID NO:10. Две разные полипептидные последовательности *WRKY38* дикого типа представлены как SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12. Растение ячменя HENZ-50 несет точечную мутацию, являющуюся причиной появления преждевременного стоп-кодона (W200Stop) в гене *HvWRKY38* ячменя. Мутация расположена в начале сигнатурной последовательности *WRKYGQK* (aa 200-206 SEQ ID NO:11 или 12) *WKRY*-мотива. Мутантный ген *HvWRKY38* HENZ-50 кодирует мутантный белок *HvWRKY38* с последовательностью SEQ ID NO:14.

Мутантное растение ячменя HENZ-50 идентифицировали в мутантной популяции M2 ячменя *cv. Planet*, полученной в результате неспецифического мутагенеза, главным образом как описано в примере 2А. HENZ-50 идентифицировали и выделяли, главным образом как описано в настоящем документе в примере 2А выше, за исключением того, что для ddPCR-анализа применяли следующие праймеры и зонды:

Мишень-специфический прямой праймер (SEQ ID NO:23)

5'-CTCAGCCTGGTGGTG-3'

Мишень-специфический обратный праймер (SEQ ID NO:24)

5'-TGTCCTTGGTCACCTTC-3'

Мутант-специфический детекторный зонд (SEQ ID NO:25)

5'-ССААТГАСГСААГТАСГ-3' – меченный FAM

Эталон-специфический детекторный зонд (SEQ ID NO:26)

5'-ТАССААТГГСГСААГТА-3' – меченный HEX.

Пример 12В

Мутант HENZ-50 ячменя и ячмень *cv. Planet* дикого типа выращивали в теплице в Дании в одинаковых условиях. 100 зерен каждого проращивали в колбах Эрленмейера на 250 мл, наполненных 100 мл деионизированной воды, накрытых парафильмом и

помещенных на шейкер на 250 об/мин. В ходе прорастания зерна постоянно погружены в H₂O. Воздух, кроме воздуха в колбе, не подавался.

Активность α -амилазы измеряли спустя 72 ч после начала проращивания (т. е. с момента погружения зерен в воду) с применением стандартного анализа Megazyme, как описано в примере 4.

Ожидалось, что HENZ-50 будет характеризоваться значимо более высокой активностью α -амилазы по сравнению с таковой у cv. Planet.

Пример 13А

Растение ячменя под названием HENZ-43 идентифицировали и выделяли, главным образом как описано в примере 2А выше. HENZ-43 несет нуклеотидную замену в промоторе гена α -амилазы ячменя кластера *amy1_1*. Мутация приводит в результате к мутации тандемно повторяющегося W-бокса, приводящей в результате к образованию нестандартного тандемно повторяющегося W-бокса следующей последовательности: TGACGGTCGTATTGATC (SEQ ID NO:35). Другими словами, у HENZ-43 последовательность TTGACC дикого типа гена *amy1_1* была модифицирована с изменением на TTGATC. На фиг. 11А показаны результаты выравнивания частичных последовательностей различных промоторов генов α -амилазы дикого типа и частичной последовательности промотора гена α -амилазы ячменя кластера *amy1_1* мутанта HENZ-43.

Мутантное растение ячменя HENZ-43 идентифицировали и выделяли, главным образом как описано в примере 2А, за исключением того, что применяемый для получения библиотеки подвергнутых неспецифическому мутагенезу последовательностей сорт ячменя представлял собой ячмень cv. Planet, и за исключением того, что для ddPCR-анализа применяли следующие праймеры и зонды:

Мишень-специфический прямой праймер (SEQ ID NO:27)

5'-AAACAGAGGTTGAGGATAAC-3'

Мишень-специфический обратный праймер (SEQ ID NO:28)

5'-GCCTTCGCCTTCCAT-3'

Мутант-специфический детекторный зонд (SEQ ID NO:29)

5'-AGGCACCGATCAATACG-3' – меченный FAM

Эталон-специфический детекторный зонд (SEQ ID NO:30)

5'-AAGGCACCGGTCAATAC-3' – меченный HEX.

Пример 13В

Мутантные растения ячменя HENZ-43, а также растения ячменя дикого типа cv. Planet, размножали на поле на отдельных, но близлежащих земельных участках. Урожайность, вес ядра зерна для 1000 ядер зерен (TKW), содержание крахмала (крахмал), содержание белка (белок), высоту растения и число колосьев на м² определяли, как описано в примере 3А выше.

Ожидалось, что мутантные растения ячменя HENZ-43 будут характеризоваться урожайностью, весом ядра зерна для 1000 ядер зерен (TKW), содержанием крахмала (крахмал), содержанием белка (белок), высотой растения и/или числом колосьев на м², подобными таковым у cv. Planet.

Пример 14.

Два растения ячменя под названием HENZ-53 и HENZ-54 идентифицировали и выделяли, главным образом как описано в примере 2А выше.

HENZ-53 несет мутацию G→A по нуклеотиду 510 кодирующей последовательности HvHRT (SEQ ID NO:1). Таким образом, HENZ-53 несет мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок HvHRT, предусматривающий мутацию W170Stop.

Мутантное растение ячменя HENZ-53 идентифицировали и выделяли, главным образом как описано в настоящем документе в примере 2А выше, за исключением того, что применяемый для получения указанной библиотеки подвергнутых неспецифическому мутагенезу последовательностей сорт ячменя представлял собой ячмень типа Planet, и за исключением того, что для ddPCR-анализа применяли следующие праймеры и зонды:

Мишень-специфический прямой праймер (SEQ ID NO:73):

5'-GTCAGCTACTGGGAGTATT-3'

Мишень-специфический обратный праймер (SEQ ID NO:74)

5'-TCTTCGCGACGACAC-3'

Мутант-специфический детекторный зонд (SEQ ID NO:75)

5'-TGCATGAAATAAACTGCAGA-3' – меченный FAMTM

Эталон-специфический детекторный зонд (SEQ ID NO:76)

5'-TGCATGGAATAAACTGCAG-3' – меченный HEXTM.

HENZ-54 несет мутацию G→A по нуклеотиду 1113 кодирующей последовательности HvHRT (SEQ ID NO:1). Таким образом, HENZ-54 несет мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок HvHRT, предусматривающий мутацию W371Stop.

Мутантное растение ячменя HENZ-54 идентифицировали и выделяли, главным образом как описано в настоящем документе в примере 2А выше, за исключением того, что применяемый для получения указанной библиотеки подвергнутых неспецифическому мутагенезу последовательностей сорт ячменя представлял собой ячмень типа Planet, и за исключением того, что для ddPCR-анализа применяли следующие праймеры и зонды:

Мишень-специфический прямой праймер (SEQ ID NO:77):

5'-TGCTAATCCAAGCAAACG-3'

Мишень-специфический обратный праймер (SEQ ID NO:78)

5'-TTTGTGGACAGATTTTGGGA-3'

Мутант-специфический детекторный зонд (SEQ ID NO:79)

5'-AGCCTGACAAACCAGTG-3' – меченный FAM™

Эталон-специфический детекторный зонд (SEQ ID NO:80)

5'-AAGCCTGGCAAACCAG-3' – меченный HEX™

Пример 15.

Мутант HENZ-2 ячменя, ячмень дикого типа cv. Paustian, мутант HENZ-10 ячменя и голозерный ячмень 1 дикого типа выращивали на поле в Новой Зеландии в одинаковых условиях. 100 зерен от каждого ячменя проращивали в колбах Эрленмейера на 250 мл, наполненных 100 мл деионизированной воды, накрытых парафильмом, помещенных на шейкер на 250 об/мин. В ходе прорастания зерна постоянно погружены в H₂O. Через воду пропускали воздух, с потоком воздуха 9 л/ч на 100 мл воды. Зерна выдерживали в воде с аэрацией в течение 48 ч или 72 ч.

Активность α -амилазы измеряли спустя 48 ч и 72 ч после начала проращивания (т. е. с момента погружения зерен в воду) с применением стандартного анализа Megazyme, как описано в примере 4.

Результаты показаны на фигурах 13А и 13В. На фиг. 13А показана активность α -амилазы HENZ-2 и cv. Paustian (wt). На фиг. 13В показана активность α -амилазы HENZ-10 и голозерного ячменя 1 (wt). Как HENZ-2, так и HENZ-10 характеризовались повышенной активностью α -амилазы по сравнению с таковой в случае соответствующих контролей дикого типа.

Пример 16.

Мутант HENZ-10 ячменя и голозерный ячмень 1 дикого типа выращивали на поле в Новой Зеландии в одинаковых условиях. 100 зерен каждого ячменя проращивали в колбах

Эрленмейера на 250 мл, наполненных 100 мл деионизированной воды, накрытых парафильмом, помещенных на шейкер на 250 об/мин. В ходе прорастания зерна постоянно погружены в H₂O. Воздух, кроме воздуха в колбе, не подавался.

Активность α -амилазы измеряли спустя 24 ч, 48 ч и 72 ч после начала проращивания (т. е. с момента погружения зерен в воду) с применением стандартного анализа Megazyme, как описано в примере 4.

Результаты показаны на фиг. 14. На фиг. 14 показана активность α -амилазы HENZ-10 и голозерного ячменя 1 (wt). HENZ-10 характеризуется значимо повышенной активностью α -амилазы, в частности, спустя 72 ч.

Пример 17.

Мутант HENZ-2а ячменя, мутант HENZ-54 ячменя, мутант HENZ-43 ячменя и ячмень дикого типа cv. Planet выращивали в теплице в Дании в одинаковых условиях. 100 зерен каждого ячменя проращивали в колбах Эрленмейера на 250 мл, наполненных 100 мл деионизированной воды, накрытых парафильмом, помещенных на шейкер на 250 об/мин. В ходе прорастания зерна постоянно погружены в H₂O. Воздух, кроме воздуха в колбе, не подавался.

Активность α -амилазы измеряли спустя 72 ч после начала проращивания (т. е. с момента погружения зерен в воду) с применением стандартного анализа Megazyme, как описано в примере 4.

Результаты показаны на фиг. 15, на которой показана активность α -амилазы HENZ-2а на верхней панели, HENZ-54 на средней панели и HENZ-43 на нижней панели. Все из HENZ-2а, HENZ-54 и HENZ-43 характеризуются значимо повышенной активностью α -амилазы.

Пример 18.

Зерна получали от мутантного ячменя HENZ-2 и от контрольных гомозиготных растений ячменя, описанных в примере 3А, выращенных в одинаковых условиях.

50 зерен на линию набухали в течение 24 часов в конической колбе при 20°C (с достижением содержания воды ~40%). Набухшие зерна переносили в чашку Петри (2 мл H₂O) и оставляли прорасти. Образцы собирали спустя 0, 12, 24 и 48 часов после завершения набухания, т. е. с момента перенесения зерен в чашку Петри. В отдельных чашках Петри готовили три биологических повтора на один момент времени. кДНК синтезировали из 300 нг общей РНК, а затем разбавляли в 10 раз. Готовили три технических повтора кДНК на образец (то есть всего 9 повторов на линию на обработку).

Уровень экспрессии мРНК генов *amy1_1*, *amy1_2* и *amy2* определяли с помощью ddPCR с применением следующих праймеров и зондов. Использовали общий протокол по ddPCR в отношении экспрессии генов, описанный в примере 20. Все анализы проводили в отношении 3'-конца рассматриваемой кДНК-последовательности.

Мишень	Прямой праймер 5'-3'	Обратный праймер 5'-3'	Зонд 5'-3'
<i>amy1-1</i>	GACTGGGGCCTGAAG (SEQ ID NO:81)	GTGCCGGGTCCTGAC (SEQ ID NO:82)	AGATCGATCGCCTGGTGT C (SEQ ID NO:83)
<i>amy1-2</i>	AGATCGATCGTCTGGT G (SEQ ID NO:84)	TCCATGATCTGCAGC TTG (SEQ ID NO:85)	TCAATCAGGACCCGACA GG (SEQ ID NO:86)
<i>amy2</i>	CGAGCTCAAGGAGTGG (SEQ ID NO:87)	CGTCGATGTACACCT TG (SEQ ID NO:88)	AAGAGCGACCTCGGCTT C (SEQ ID NO:89)

Результаты показаны на фиг. 16. На фигуре контроль обозначен как «WT». HENZ-2 характеризовался повышенными, по сравнению с контролем, уровнями транскриптов для всех анализируемых генов *amy*. Экспрессия *Amy1*, по-видимому, запускалась раньше, чем экспрессия *amy2*.

Пример 19.

Применяли материал в виде зерна от мутанта HENZ-2а ячменя, мутанта HENZ-54 ячменя, мутанта HENZ-43 ячменя и ячменя дикого типа cv. Planet, выращенных в теплице в Дании в одинаковых условиях. 100 зерен проращивали в колбах Эрленмейера на 250 мл, наполненных 100 мл H₂O, накрытых парафильмом, помещенных на шейкер на 250 об/мин. В ходе прорастания зерна постоянно погружены в H₂O. Воздух, кроме воздуха в колбе, не подавался.

Уровень экспрессии генов α -амилаз (*amy1_1*, *amy1_2* и *amy2*), предельной декстриназы (LD) и уровень экспрессии обеих β -глюканаз 2A и 2B (вместе называемых «*bgl2*») измеряли спустя 72 ч с помощью ddPCR с применением указанных ниже праймеров и зондов. Обе β -глюканазы 2A и 2B могут быть амплифицированы и обнаружены с применением одинаковых праймеров и зондов.

Мишень	Прямой праймер 5'-3'	Обратный праймер 5'-3'	Зонд 5'-3'
<i>amy1-1</i>	GACTGGGGCCTGAAG (SEQ ID NO:81)	GTGCCGGGTCCTGAC (SEQ ID NO:82)	AGATCGATCGCCTGGTGT C (SEQ ID NO:83)

amy1-2	AGATCGATCGTCTGGT G (SEQ ID NO:84)	TCCATGATCTGCAGCT TG (SEQ ID NO:85)	TCAATCAGGACCCGACA GG (SEQ ID NO:86)
amy2	CGAGCTCAAGGAGTG G (SEQ ID NO:87)	CGTCGATGTACACCTT G (SEQ ID NO:88)	AAGAGCGACCTCGGCTT C (SEQ ID NO:89)
Bgl2	TACCAGAACCTGTTTCG AC (SEQ ID NO:90)	ACACCACCAGCTTCAC (SEQ ID NO:91)	ACCGTGGACGCCTTCTAC (SEQ ID NO:92)
LD	CTTCGATGGGGTTTGA AC (SEQ ID NO:93)	CCGATTCCTCACCAA AG (SEQ ID NO:94)	CCTGTGCAGGTGAATTCA TCA (SEQ ID NO:95)

Результаты показаны на фигурах 17-20. Все из HENZ-2а, HENZ-54 и HENZ-43 характеризовались повышенным уровнем экспрессии генов *amy1_1*, *amy1_2* и *amy2*, предельной декстриназы (LD) и *bgl2*.

Пример 20.

Уровень экспрессии генов определяли с помощью ddPCR с применением стандартных способов. Более конкретно, в общем случае РНК экстрагировали из лиофилизированной зерновой муки (~50 мг) с применением сперва протокола для набора Trizol (Qiagen #15596026), с последующей очисткой с использованием набора для выделения общей РНК Augum™ Total RNA Mini (Bio-Rad # 7326820). кДНК синтезировали с применением набора для синтеза кДНК iScript™ от Bio-Rad (#1708891).

В случае ddPCR-анализа каждый образец смешивали с праймерами, зондом(-ами) (меченными FAM или HEX), компонентом для ddPCR-реакции, ddPCR Supermix (без dUTP) и водой (BioRad). Перед формированием капли (автоматический генератор капель Bio-Rad QX200™ #1864101) образцы перемешивали. Планшет с каплями инкубировали в термоциклере.

Присутствие FAM- и/или HEX-положительных капель обнаруживали на ридере капель Bio-Rad QX200™ и анализировали их с применением программного обеспечения Quantasoft от Bio-Rad.

Список литературы

1. Fiona J. Woodger, Frank Gubler, Barry J. Pogson and John V. Jacobsen, A Mak-like kinase is a repressor of GAMYB in barley aleurone, *The Plant Journal* (2003) 33, 707–717
2. Laura S. Green, Ellen Mosleth Faergestad³, Andrew Poole, and Peter M. Chandler, Grain Development Mutants of Barley, *Plant Physiol.* (1997) 114: 203-212

3. Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J. K., & Jacobsen, J. V. (1995). Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. *The Plant Cell*, 7(11), 1879-1891.
4. International Barley Genome Sequencing Consortium (IBSC). (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, 491(7426), 711-716.
5. Jia, Q., Zhang, X. Q., Westcott, S., Broughton, S., Cakir, M., Yang, J., ... & Li, C. (2011). Expression level of a gibberellin 20-oxidase gene is associated with multiple agronomic and quality traits in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(8), 1451-1460.
6. Mascher, M., Gundlach, H., Himmelbach, A., Beier, S., Twardziok, S. O., Wicker, T., ... & Bayer, M. (2017). A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature*, 544(7651), 427-433. Nakata M, Fukamatsu Y, Miyashita T, Hakata M, Kimura R, Nakata Y, Kuroda M, Yamaguchi T and Yamakawa H (2017) High Temperature-Induced Expression of Rice α -Amylases in Developing Endosperm Produces Chalky Grains. *Front. Plant Sci.* 8:2089. doi: 10.3389/fpls.2017.02089
7. Raventós, D., Skriver, K., Schlein, M., Karnahl, K., Rogers, S. W., Rogers, J. C., & Mundy, J. (1998). HRT, a novel zinc finger, transcriptional repressor from barley. *Journal of Biological Chemistry*, 273(36), 23313-23320. Schwarz et al., 2004, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 62(4):147-154
8. Son, O., Hur, Y. S., Kim, Y. K., Lee, H. J., Kim, S., Kim, M. R., ... & Park, J. (2010). ATHB12, an ABA-inducible homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) protein of Arabidopsis, negatively regulates the growth of the inflorescence stem by decreasing the expression of a gibberellin 20-oxidase gene. *Plant and Cell Physiology*, 51(9), 1537-1547.
9. Valdés, A. E., Övernäs, E., Johansson, H., Rada-Iglesias, A., & Engström, P. (2012). The homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) class I transcription factors ATHB7 and ATHB12 modulate abscisic acid signalling by regulating protein phosphatase 2C and abscisic acid receptor gene activities. *Plant molecular biology*, 80(4-5), 405-418.
10. Zou et al. (2008) Interactions of Two Transcriptional Repressors and Two Transcriptional activators in Modulating Gibberellin Signaling in Aleurone Cells, *Plant Physiology*, , Vol. 148, pp. 176-186

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение ячменя или его часть, где указанное растение ячменя:

- несет мутацию в гене *HvHRT*, приводящую в результате к образованию мутантного гена *HvHRT*, кодирующего мутантный белок HvHRT, в котором отсутствуют одна или несколько из аминокислот SEQ ID NO:2, или мутацию, приводящую в результате к делеции по меньшей мере кодирующей области гена *HvHRT*, причем кодирующая область гена *HvHRT* кодирует полипептид SEQ ID NO:2; и/или
 - несет по меньшей мере один ген α -амилазы, содержащий мутантный промотор гена α -амилазы, предусматривающий мутацию в GARE-боксе; и/или
 - несет по меньшей мере четыре гена α -амилазы, содержащих GARE-бокс с последовательностью ТААСААА; и/или
 - несет по меньшей мере один ген α -амилазы в кластере *amy2*, содержащий мутантный промотор гена α -амилазы, предусматривающий мутацию в GARE-боксе, или который имеет последовательность ТААСААА; и/или
 - несет мутацию в гене *HvHBL12*, приводящую в результате к образованию мутантного гена *HvHBL12*, кодирующего мутантный белок HvHBL12, в котором отсутствуют одна или несколько из аминокислот SEQ ID NO:6, или мутацию, приводящую в результате к делеции по меньшей мере кодирующей области гена *HvHBL12*, причем кодирующая область гена *HvHBL12* кодирует полипептид SEQ ID NO:6; и/или
 - несет по меньшей мере четыре гена α -амилазы, содержащих промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, причем указанный нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс содержит последовательность (TGAC(C)_n(X)_mTTGACC), причем один или несколько из конкретных нуклеотидов были заменены или удалены, и причем X может представлять собой любой нуклеотид, n равняется 0 или 1 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20; и/или
 - несет по меньшей мере один ген α -амилазы в кластере *amy2*, содержащий промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс; и/или
 - несет мутацию в гене *WRKY38*, приводящую в результате к образованию мутантного гена *WRKY38*, кодирующего мутантный белок WRKY38, в котором отсутствуют одна или несколько из аминокислот, присутствующих как в SEQ ID NO:11, так и в SEQ ID NO:12, или мутацию, приводящую в результате к делеции по меньшей мере кодирующей области гена *WRKY38*, причем кодирующая область гена *WRKY38* кодирует полипептид SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12.

2. Растение ячменя по п. 1, где указанное растение ячменя несет мутацию в гене *HvHRT*, и причем мутация представляет собой:

- мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *HvHRT*, кодирующего мутантный белок *HvHRT*, в котором отсутствуют по меньшей мере аминокислоты, соответствующие аминокислотам 527-530 SEQ ID NO:2; или
- мутацию, приводящую в результате к делеции гена *HvHRT*.

3. Растение ячменя по любому из пп. 1-2, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, кодирующий мутантный белок *HvHRT*, в котором отсутствуют по меньшей мере 118 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO:2.

4. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит:

a. по меньшей мере один ген α -амилазы, содержащий мутантный промотор гена α -амилазы, предусматривающий мутацию в GARE-боксе, причем один из нуклеотидов TAACARA был либо заменен, либо удален, и/или

b. по меньшей мере пять генов α -амилазы, содержащих GARE-бокс с последовательностью TAACAAA.

5. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где указанное растение ячменя содержит по меньшей мере один, как, например, по меньшей мере два, например, по меньшей мере три гена α -амилазы в кластере *amy2*, содержащих GARE-бокс с последовательностью TAACAAA.

6. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где указанное растение ячменя несет мутацию в гене *HvHBL12*, причем мутация представляет собой:

a. мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *HvHBL12*, кодирующего мутантный белок *HvHBL12*, в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот SEQ ID NO:6, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей; или

b. мутацию, приводящую в результате к делеции гена *HvHBL12*.

7. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHBL12*, кодирующий мутантный белок *HvHBL12*, в котором

отсутствуют по меньшей мере 22 наиболее близкие к С-концу аминокислоты SEQ ID NO:6, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

8. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя несет мутацию в гене *HvWRKY38*, и причем мутация представляет собой:

a. мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *HvWRKY38*, кодирующего мутантный белок *HvWRKY38*, в котором отсутствует по меньшей мере одна из аминокислот 200-206, 220, 226, 250 и/или 252 SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12;

b. мутацию, приводящую в результате к делеции гена *HvWRKY38*.

9. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvWRKY38*, кодирующий мутантный белок *HvWRKY38*, в котором отсутствуют по меньшей мере 154 наиболее близкие к С-концу аминокислоты SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12.

10. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит по меньшей мере пять генов α -амилазы, содержащих промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-боксы, причем нестандартные тандемно повторяющиеся W-боксы индивидуально выбраны из группы, состоящей из:

- (TGACR(X)_mYTGRCC);
- (TGACR(X)_mTTGACC);
- (TGACR(X)_mTTGAC);
- (TGAC(C)_n(X)_mYTGRCC);
- (TGAC(C)_n(X)_mCTGRCC);
- (TGAC(C)_n(X)_mYTGGCC);
- (TGAC(C)_n(X)_mCTGACC);
- (TGAC(C)_n(X)_mTTGGCC); и
- (TGAC(C)_n(X)_mTTGATC),

причем R представляет собой либо G, либо A, Y представляет собой либо C, либо T, n равняется 0 или 1 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20.

11. Растение ячменя по п. 10, где растение ячменя содержит кластер *amy1_1*, причем по меньшей мере один из промоторов генов α -амилазы содержит нестандартный тандемно повторяющийся W-боксы, содержащий последовательность TTGATC.

12. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя характеризуется активностью α -амилазы, составляющей по меньшей мере 100 Ед/г, как, например, по меньшей мере 110 Ед/г спустя 48 ч после инициации прорастания, при условии, что указанное растение ячменя является либо голозерным, либо по меньшей мере часть пленки была удалена до инициации прорастания.

13. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя характеризуется активностью предельной декстриназы, составляющей по меньшей мере 20 мЕд/г спустя 48 ч после инициации прорастания, при условии, что указанное растение ячменя является либо голозерным, либо по меньшей мере часть пленки была удалена до инициации указанного прорастания.

14. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя предусматривает более чем одно из мутаций или свойств по п. 1.

15. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя предусматривает мутацию в одном или нескольких дополнительных генах, например, одну или несколько из следующих мутаций:

a. мутация в кодирующем LOX-1 гене, приводящая в результате к полной потере функционального LOX-1

b. мутация в кодирующем LOX-2 гене, приводящая в результате к полной потере функционального LOX-2

c. мутация в кодирующем ММТ гене, приводящая в результате к полной потере функционального ММТ

d. мутация в кодирующем CslF6 гене, причем указанный мутантный ген кодирует мутантный белок CslF6 со сниженной активностью CslF6.

16. Продукт растительного происхождения, предусматривающий растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, или полученный из него, причем указанный продукт растительного происхождения выбран из группы, состоящей из ячменной муки, зеленого солода, высушенного в печи солода, сусла и напитков.

17. Продукт растительного происхождения по п. 16, где продукт растительного происхождения представляет собой молотый зеленый солод или молотый высушенный в печи солод.

18. Способ получения водного экстракта, причем указанный способ предусматривает стадии:

a. обеспечения зерен растения ячменя по любому из пп. 1-15;

b. подвержения зерен ячменя стадии проращивания, с получением тем самым пророщенных зерен, причем указанная стадия проращивания предусматривает выдерживание указанных зерен в водном растворе до тех пор, пока зерна не будут характеризоваться содержанием воды по меньшей мере 30%, причем через указанный водный раствор пропускают по меньшей мере 2 л O_2 на кг сухого веса зерен ячменя в ч;

c. тонкого измельчения указанных пророщенных зерен, при этом указанные пророщенные зерна характеризуются содержанием воды по меньшей мере 20%, с условием, что указанные зерна ячменя не характеризуются содержанием воды ниже 20 ни в один из моментов времени между стадиями b) и c);

d. получения водного экстракта указанных тонкоизмельченных пророщенных зерен, с получением тем самым водного экстракта ячменя.

19. Способ получения напитка, причем указанный способ предусматривает стадии:

(i) получения водного экстракта с помощью способа по п. 18;

(ii) переработки указанного экстракта в напиток.

20. Способ получения напитка, причем указанный способ предусматривает стадии:

i. получения водного экстракта из ядер зерен и/или солода растения ячменя по любому из пп. 1-15,

ii. переработки указанного экстракта в напиток.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ, ИЗМЕНЕННАЯ ПО СТ.34(2)(b) РСТ

1. Растение ячменя или его часть, где указанное растение ячменя:

- несет мутацию в гене *HvHRT*, приводящую в результате к образованию мутантного гена *HvHRT*, кодирующего мутантный белок HvHRT, в котором отсутствуют по меньшей мере 118 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO:2, или мутацию, приводящую в результате к делеции по меньшей мере кодирующей области гена *HvHRT*, причем кодирующая область гена *HvHRT* кодирует полипептид SEQ ID NO:2; и/или
 - несет по меньшей мере один ген α -амилазы, содержащий мутантный промотор гена α -амилазы, предусматривающий мутацию в GARE-боксе; и/или
 - несет по меньшей мере четыре гена α -амилазы, содержащих GARE-бокс с последовательностью TAACAAA; и/или
 - несет по меньшей мере один ген α -амилазы в кластере *amy2*, содержащий мутантный промотор гена α -амилазы, предусматривающий мутацию в GARE-боксе, или который имеет последовательность TAACAAA; и/или
 - несет мутацию в гене *HvHBL12*, приводящую в результате к образованию мутантного гена *HvHBL12*, кодирующего мутантный белок HvHBL12, в котором отсутствуют одна или несколько из аминокислот SEQ ID NO:6, или мутацию, приводящую в результате к делеции по меньшей мере кодирующей области гена *HvHBL12*, причем кодирующая область гена *HvHBL12* кодирует полипептид SEQ ID NO:6; и/или
 - несет по меньшей мере четыре гена α -амилазы, содержащих промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, причем указанный нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс содержит последовательность (TGAC(C)_n(X)_mTTGACC), причем один или несколько из конкретных нуклеотидов были заменены или удалены, и причем X может представлять собой любой нуклеотид, n равняется 0 или 1 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20; и/или
 - несет по меньшей мере один ген α -амилазы в кластере *amy2*, содержащий промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс; и/или
 - несет мутацию в гене *WRKY38*, приводящую в результате к образованию мутантного гена *WRKY38*, кодирующего мутантный белок WRKY38, в котором отсутствуют одна или несколько из аминокислот, присутствующих как в SEQ ID NO:11, так и в SEQ ID NO:12, или мутацию, приводящую в результате к делеции по меньшей мере кодирующей

области гена *WRKY38*, причем кодирующая область гена *WRKY38* кодирует полипептид SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12.

2. Растение ячменя по п. 1, где указанное растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, несущий преждевременный стоп-кодон среди любых из кодонов 1-431.

3. Растение ячменя по любому из пп. 1-2, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHRT*, содержащий мутацию G→A по нуклеотиду 1293 кодирующей последовательности *HvHRT* SEQ ID NO:1.

4. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит:
а. по меньшей мере один ген α -амилазы, содержащий мутантный промотор гена α -амилазы, предусматривающий мутацию в GARE-боксе, причем один из нуклеотидов TAACARA был либо заменен, либо удален, и/или

б. по меньшей мере пять генов α -амилазы, содержащих GARE-бокс с последовательностью TAACAAA.

5. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где указанное растение ячменя содержит по меньшей мере один, как, например, по меньшей мере два, например, по меньшей мере три гена α -амилазы в кластере *amy2*, содержащих GARE-бокс с последовательностью TAACAAA.

6. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где указанное растение ячменя несет мутацию в гене *HvHBL12*, причем мутация представляет собой:

а. мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *HvHBL12*, кодирующего мутантный белок *HvHBL12*, в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот SEQ ID NO:6, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей; или

б. мутацию, приводящую в результате к делеции гена *HvHBL12*.

7. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvHBL12*, кодирующий мутантный белок *HvHBL12*, в котором отсутствуют по меньшей мере 22 наиболее близкие к С-концу аминокислоты SEQ ID NO:6, или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

8. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя несет мутацию в гене *HvWRKY38*, и причем мутация представляет собой:

а. мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *HvWRKY38*, кодирующего мутантный белок *HvWRKY38*, в котором отсутствует по меньшей мере одна из аминокислот 200-206, 220, 226, 250 и/или 252 SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12;

б. мутацию, приводящую в результате к делеции гена *HvWRKY38*.

9. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит мутантный ген *HvWRKY38*, кодирующий мутантный белок *HvWRKY38*, в котором отсутствуют по меньшей мере 154 наиболее близкие к С-концу аминокислоты SEQ ID NO: 11 ИЛИ SEQ ID NO:12.

10. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит по меньшей мере пять генов α -амилазы, содержащих промотор гена α -амилазы, содержащий нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, причем нестандартные тандемно повторяющиеся W-боксы индивидуально выбраны из группы, состоящей из:

- (TGACR(X)_mYTGRCC);
- (TGACR(X)_mTTGACC);
- (TGACR(X)_mTTGAC);
- (TGAC(C)_n(X)_mYTGRCC);
- (TGAC(C)_n(X)_mCTGRCC);
- (TGAC(C)_n(X)_mYTGGCC);
- (TGAC(C)_n(X)_mCTGACC);
- (TGAC(C)_n(X)_mTTGGCC); и
- (TGAC(C)_n(X)_mTTGATC),

причем R представляет собой либо G, либо A, Y представляет собой либо C, либо T, n равняется 0 или 1 и m представляет собой целое число в диапазоне 0-20.

11. Растение ячменя по п. 10, где растение ячменя содержит кластер *amy1_1*, причем по меньшей мере один из промоторов генов α -амилазы содержит нестандартный тандемно повторяющийся W-бокс, содержащий последовательность TTGATC.

12. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя характеризуется активностью α -амилазы, составляющей по меньшей мере 100 Ед/г, как,

например, по меньшей мере 110 Ед/г спустя 48 ч после инициации прорастания, при условии, что указанное растение ячменя является либо голозерным, либо по меньшей мере часть пленки была удалена до инициации прорастания.

13. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя характеризуется активностью предельной декстриназы, составляющей по меньшей мере 20 мЕд/г спустя 48 ч после инициации прорастания, при условии, что указанное растение ячменя является либо голозерным, либо по меньшей мере часть пленки была удалена до инициации указанного прорастания.

14. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя предусматривает более чем одно из мутаций или свойств по п. 1.

15. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя предусматривает мутацию в одном или нескольких дополнительных генах, например, одну или несколько из следующих мутаций:

a. мутация в кодирующем LOX-1 гене, приводящая в результате к полной потере функционального LOX-1

b. мутация в кодирующем LOX-2 гене, приводящая в результате к полной потере функционального LOX-2

c. мутация в кодирующем ММТ гене, приводящая в результате к полной потере функционального ММТ

d. мутация в кодирующем CslF6 гене, причем указанный мутантный ген кодирует мутантный белок CslF6 со сниженной активностью CslF6.

16. Продукт растительного происхождения, предусматривающий растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, или полученный из него, причем указанный продукт растительного происхождения выбран из группы, состоящей из ячменной муки, зеленого солода, высушенного в печи солода, сула и напитков.

17. Продукт растительного происхождения по п. 16, где продукт растительного происхождения представляет собой молотый зеленый солод или молотый высушенный в печи солод.

18. Способ получения водного экстракта, причем указанный способ предусматривает стадии:

a. обеспечения зерен растения ячменя по любому из пп. 1-15;

b. подвержения зерен ячменя стадии проращивания, с получением тем самым пророщенных зерен, причем указанная стадия проращивания предусматривает выдерживание указанных зерен в водном растворе до тех пор, пока зерна не будут характеризоваться содержанием воды по меньшей мере 30%, причем через указанный водный раствор пропускают по меньшей мере 2 л O₂ на кг сухого веса зерен ячменя в ч;

c. тонкого измельчения указанных пророщенных зерен, при этом указанные пророщенные зерна характеризуются содержанием воды по меньшей мере 20%, с условием, что указанные зерна ячменя не характеризуются содержанием воды ниже 20 ни в один из моментов времени между стадиями b) и c);

d. получения водного экстракта указанных тонкоизмельченных пророщенных зерен, с получением тем самым водного экстракта ячменя.

19. Способ получения напитка, причем указанный способ предусматривает стадии:

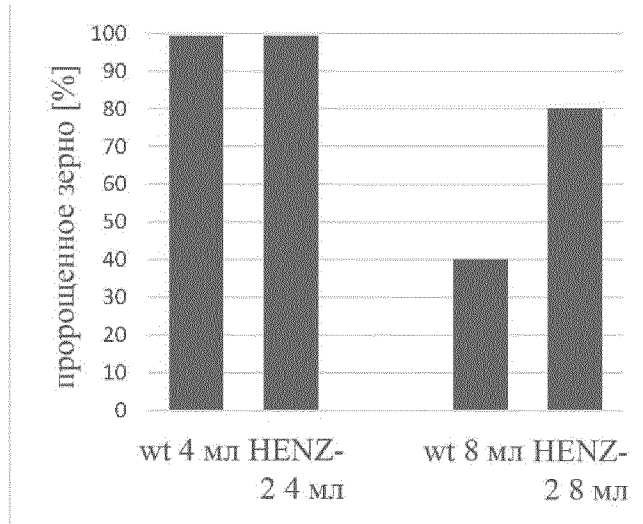
(i) получения водного экстракта с помощью способа по п. 18;

(ii) переработки указанного экстракта в напиток.

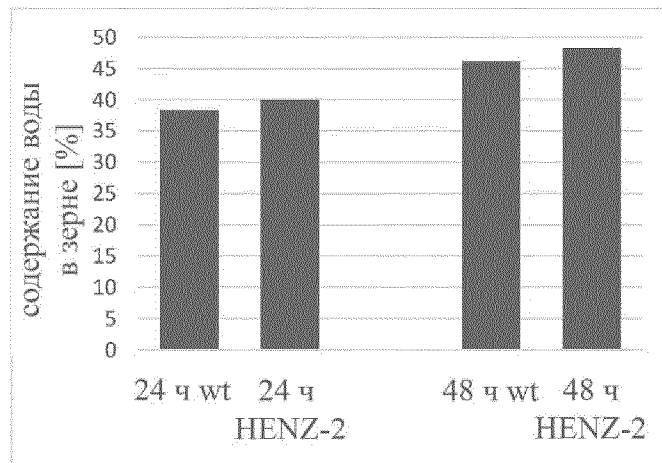
20. Способ получения напитка, причем указанный способ предусматривает стадии:

i. получения водного экстракта из ядер зерен и/или солода растения ячменя по любому из пп. 1-15,

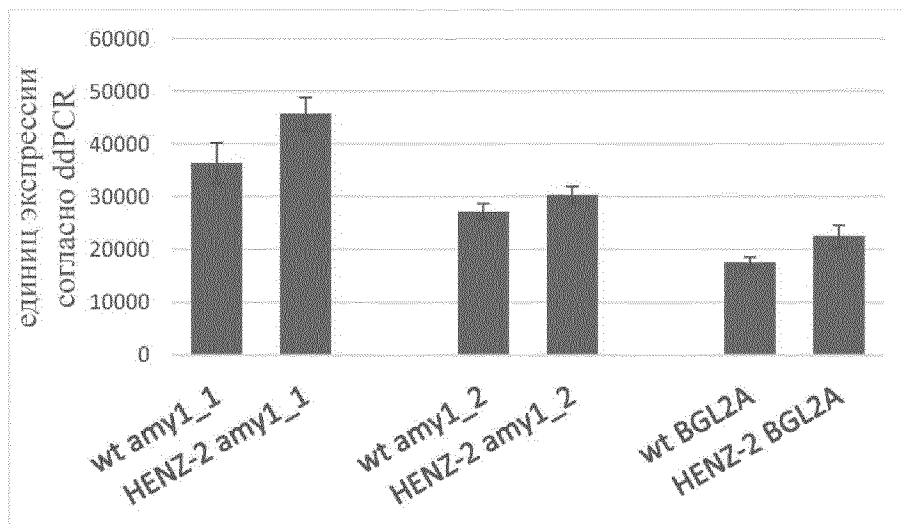
ii. переработки указанного экстракта в напиток.



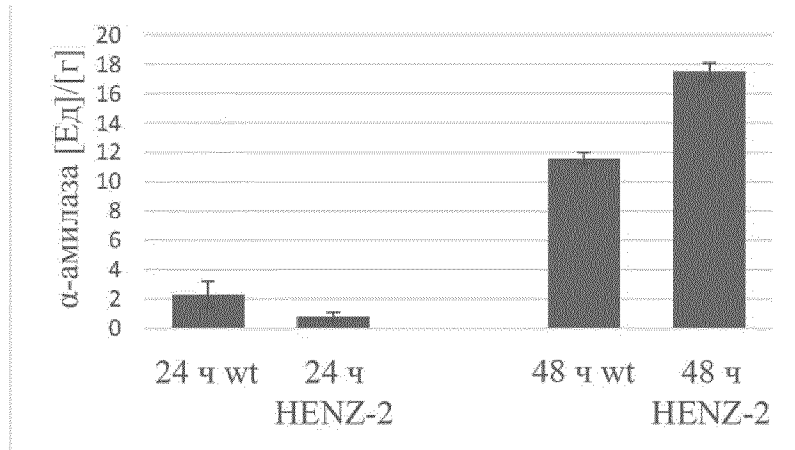
Фиг. 1



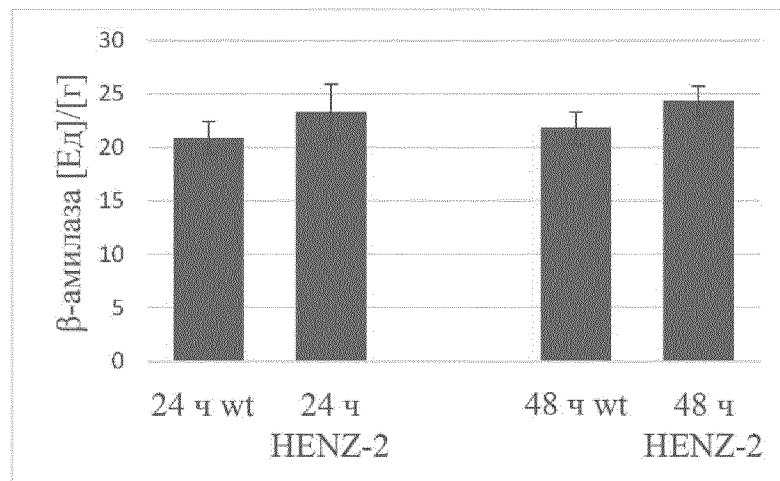
Фиг. 2



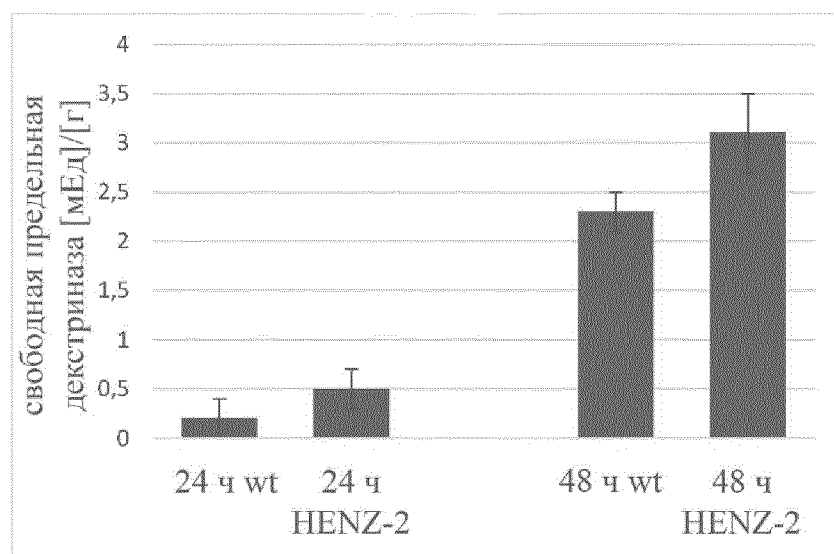
Фиг. 3



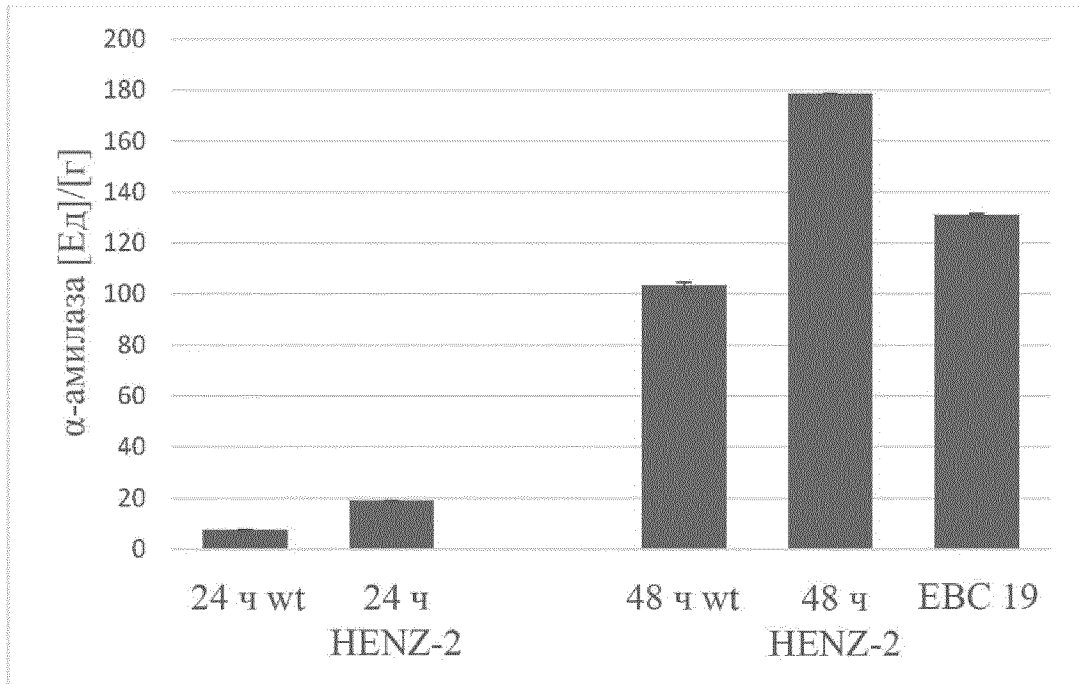
Фиг. 4А



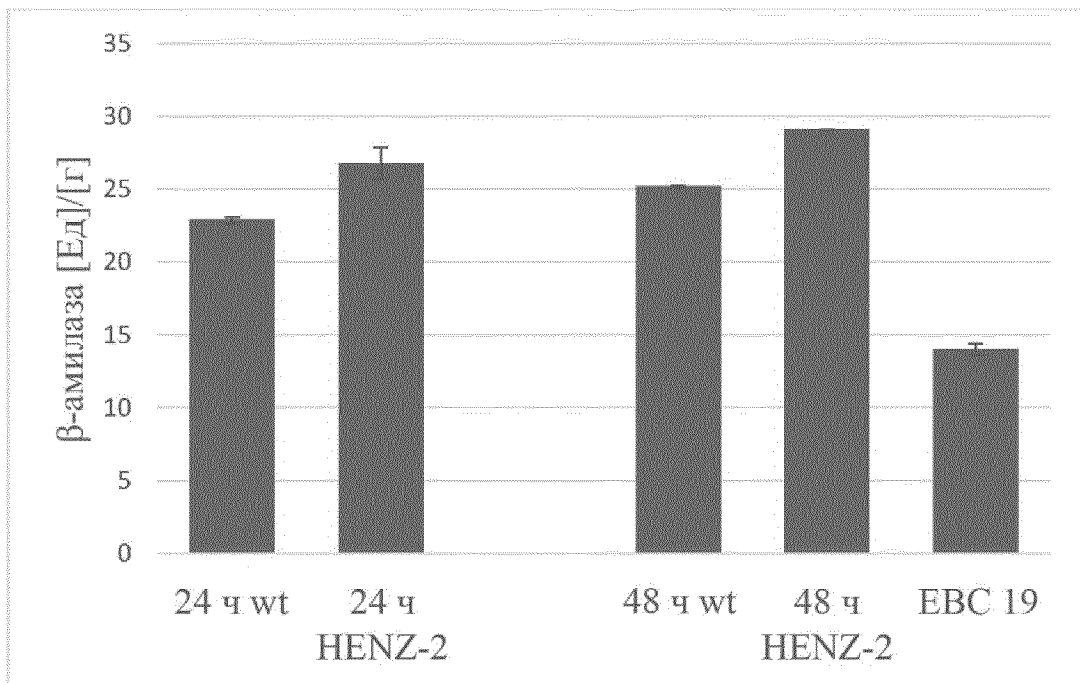
Фиг. 4В



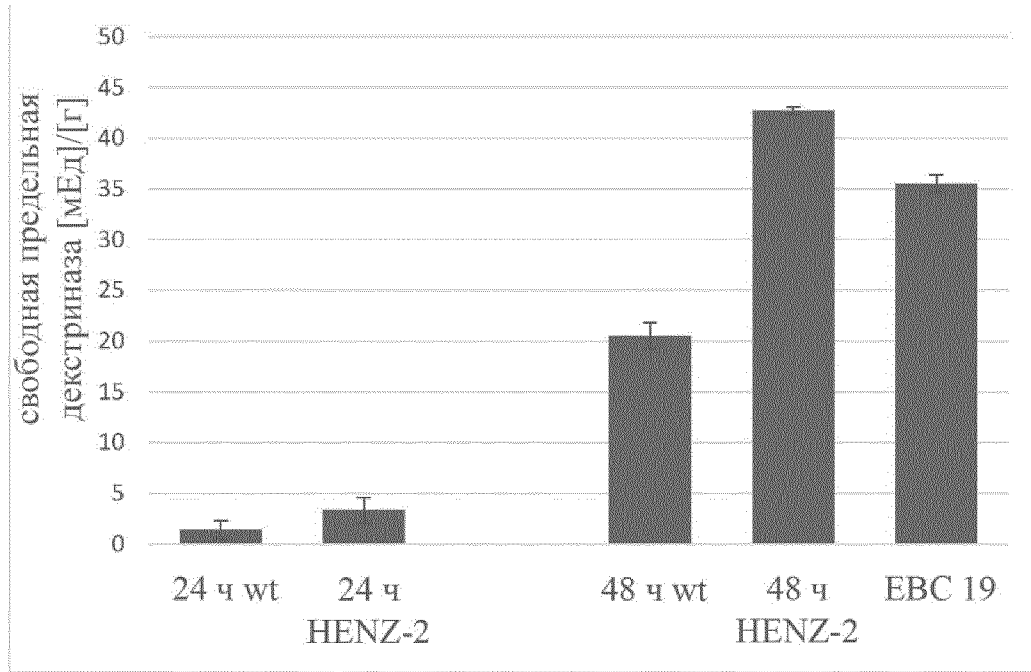
Фиг. 4С



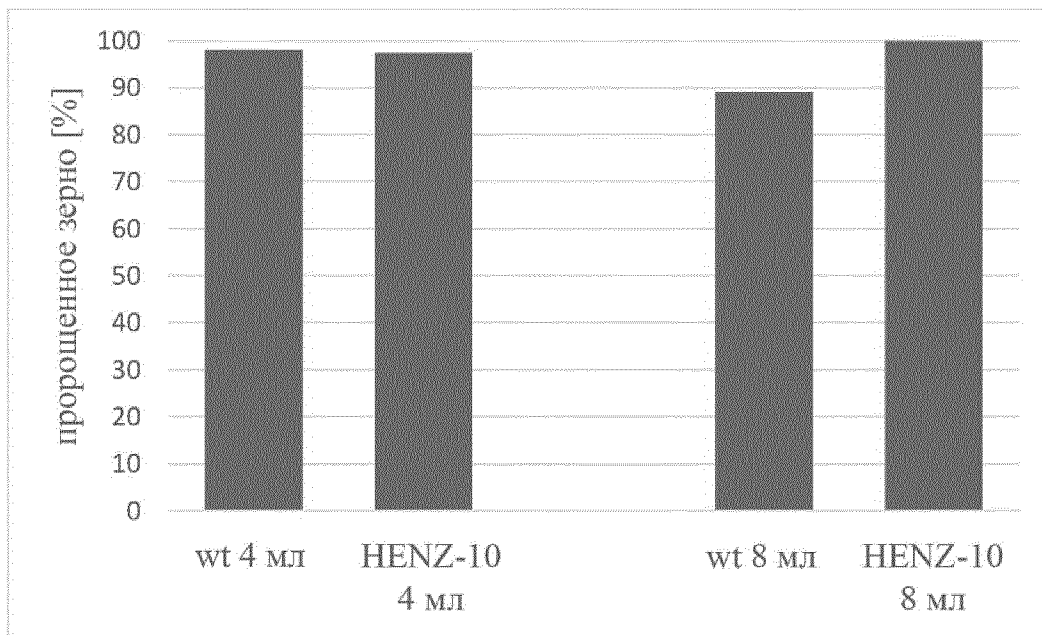
Фиг. 5А



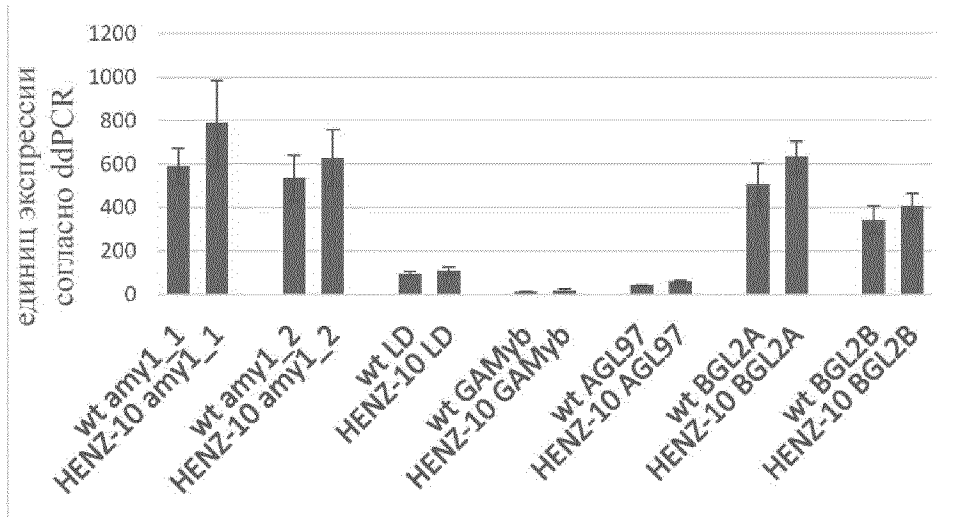
Фиг. 5В



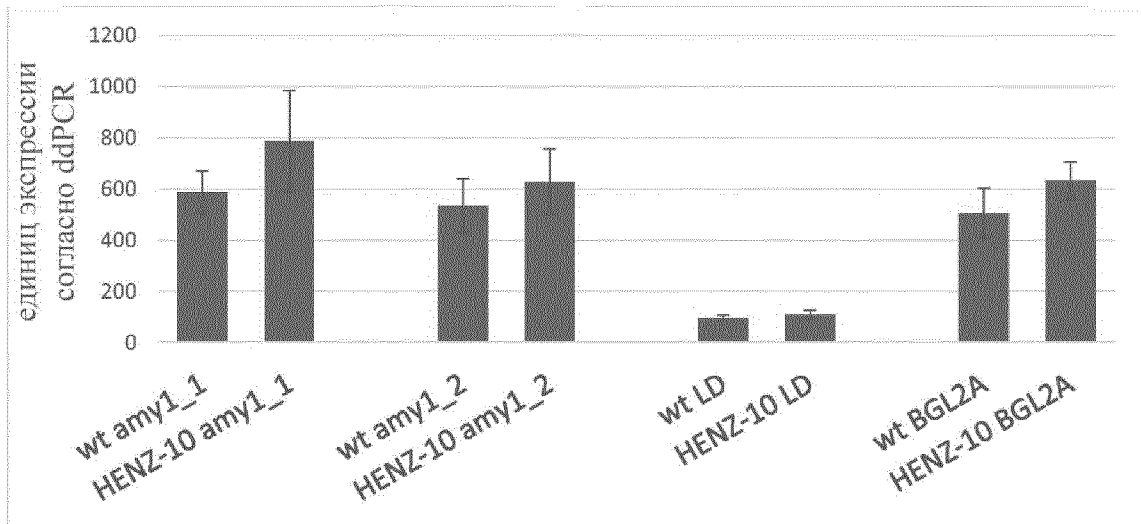
Фиг. 5С



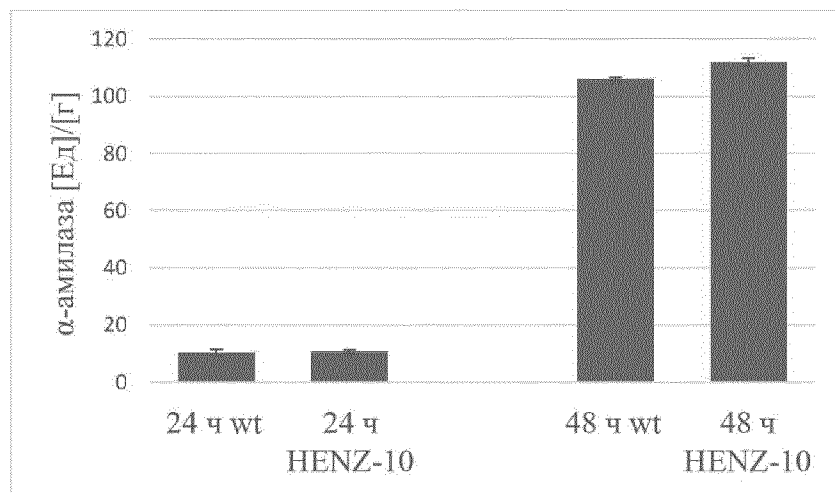
Фиг. 6



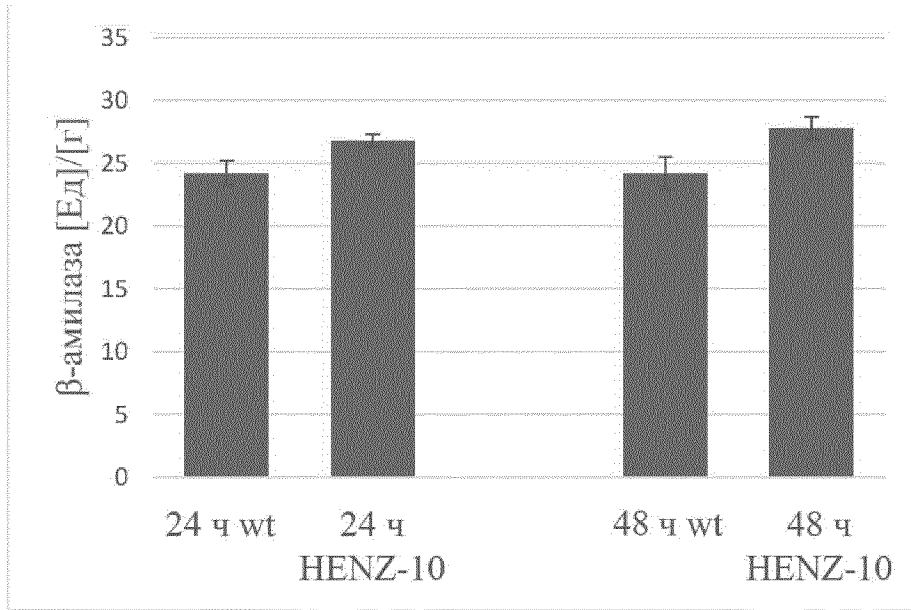
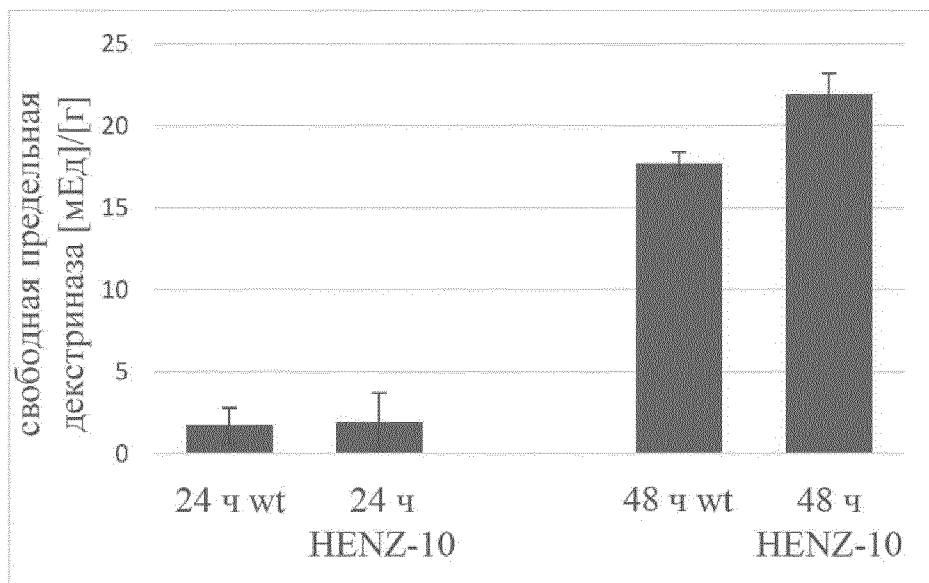
Фиг. 7

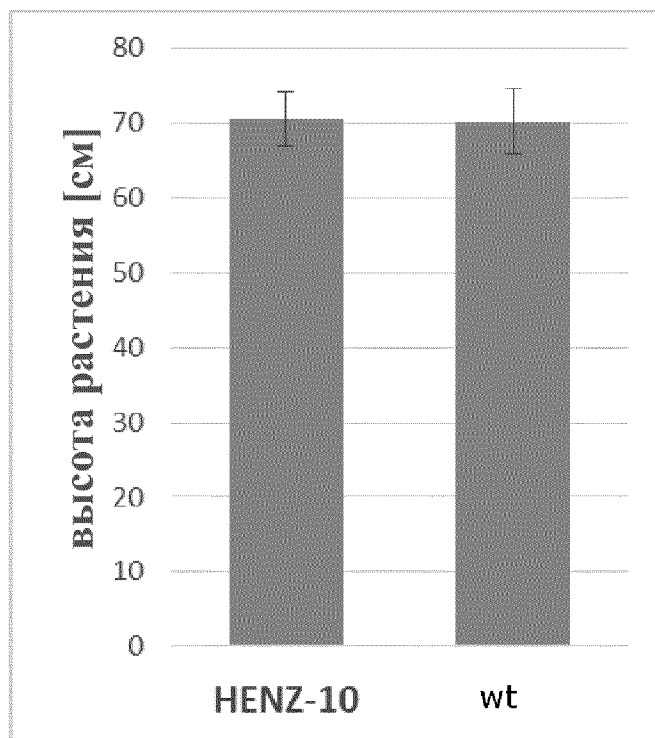


Фиг. 8



Фиг. 9А

**Фиг. 9В****Фиг. 9С**

**Фиг. 10**

Модифицированный тандемно повторяющийся W-бокс

```

Amy6-4      TAACTGACGGTCGTATTGACCGGTGCCTTCTTATGGAAGGCGAAGGCTGCCTC
amy1_1a     TAACTGACGGTCGTATTGACCGGTGCCTTCTTATGGAAGGCGAAGGCTGCCTC
amy1_1b     TAACTGACGGTCGTATTGACCGGTGCCTTCTTATGGAAGGCGAAGGCTGCCTC
amy1_1c     TAACTGACGGTCGTATTGACCAGTGCCTTCTTATGGAAGGCGAAGGCTGCCTC
Amy46       TAACTGACAGTCGTACTGGCCG-----GTGCCTT
amy1_2      TAAGTGACAGTGGTATTGGCCG-----GTGCCTT
HENZ-43 amy1_1 TAACTGACGGTCGTATTGATCGGTGCCTTCTTATGGAAGGCGAAGGCTGCCTC
***  *****  **  ***  **  #*  *****
    
```

PYR-бокс

```

Amy6-4      CATCTACATCACTTGGGCATTGAATCGCCTTTTGAGCTCACCGTACCGGCCGA
amy1_1a     CATCTACATCACTTGGGCATTGAATCGCCTTTTGAGCTCACCGTACCGGCCGA
amy1_1b     CATCTACATCACTTGGGCATTGAATCGCCTTTTGAGCTCACCGTACCGGCCGA
amy1_1c     CATCTCCATCACTTGGGCATTGAATCGCCTTTTGAGCTCACCGCACCGGCCGA
Amy46       CTTGTGCGAAGGCTGGATCCATCAGTCGCCTTTTGAGCTCACCGCACCGGCCGA
amy1_2      CTCATCGAAGCCGGTGCATCATTCGCCTTTTGAGCTCACCGCACCGGCCGA
HENZ-43 amy1_1 CATCTACATCACTTGGGCATTGAATCGCCTTTTGAGCTCACCGTACCGGCCGA
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
    
```

GARE-бокс

AMY-бокс

```

Amy6-4      ТААСАААCTCCGGCCGACATТАТССАТGG
amy1_1a     ТААСАААCTCCGGCCGACATТАТССАТGG
amy1_1b     ТААСАААCTCCGGCCGACATТАТССАТGG
amy1_1c     ТААСАААCTCCGGCCAACATТАТССАТGG
Amy46       ТААСАААCTCCGGCCGACATТАТССАТCGA
amy1_2      ТААСАААCTCCGGCCGACATТАТССАТCGA
HENZ-43 amy1_1 ТААСАААCTCCGGCCGACATТАТССАТGG
*****
    
```

Фиг. 11А

Тандемно повторяющийся W-бокс

```

amy2_1      GGAATTTGTGCCCGCCCGGATTTGACTTGACCATCATCT-----GTTG
amy2_2      GGAGGCTGTGCCAACCCAGCTTGACTTGACCATCACCAG-----TTAC
amy2_3      GGAACTTGTGCCACCCCGGATTTGACTTGACCGTTCATCGGCTCCGGATG
***  *****  ***  *  *****  ***  *
    
```

PYR-бокс

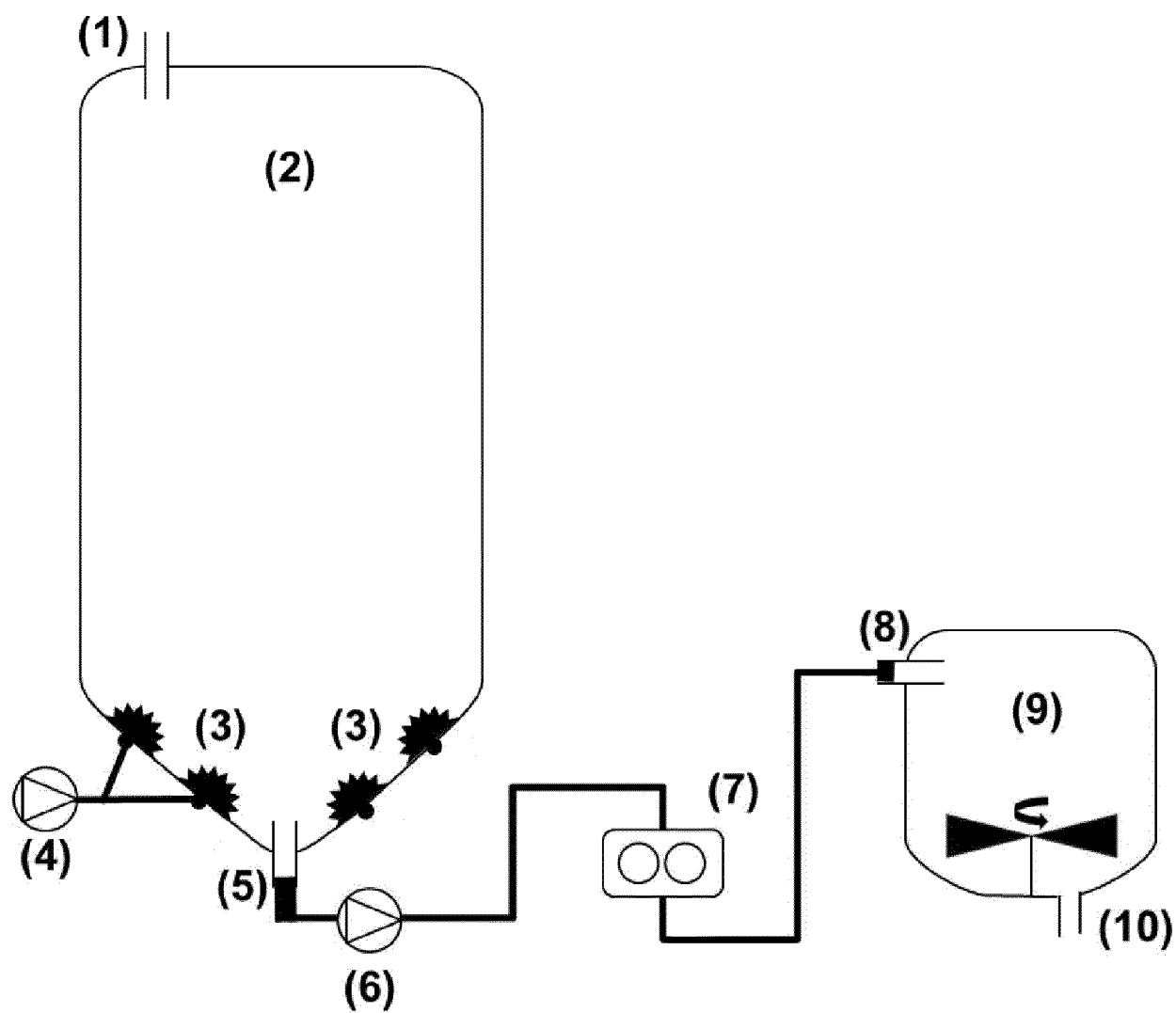
GARE-бокс

AMY-бокс

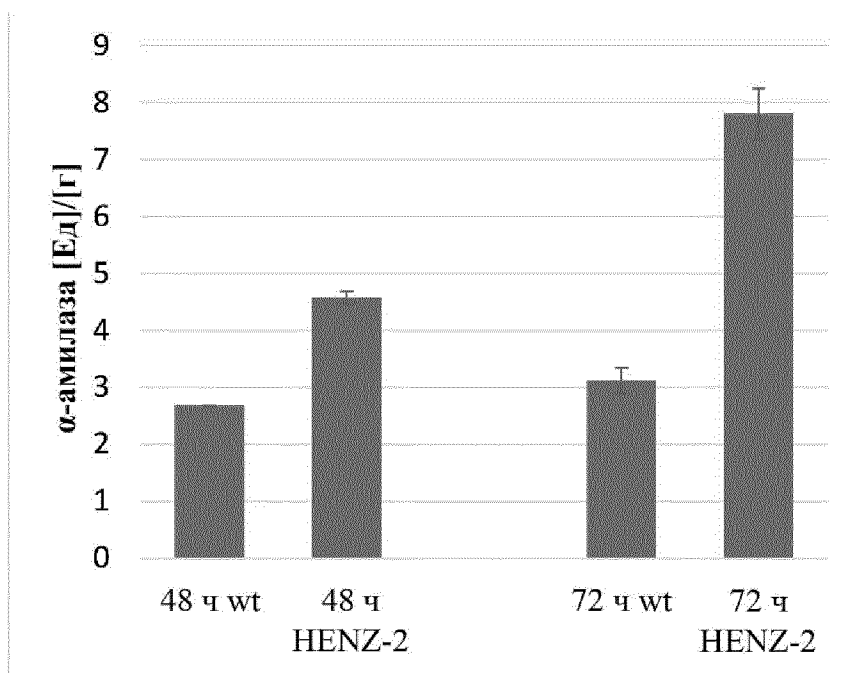
```

amy2_1      CАССТТТТCTCGТААСАГАGTCTGGТАТССАТGCAG
amy2_2      TССАТТТТTCCAТААСАГАGGCCGGТАССАТGCAT
amy2_3      CАССТТТТTATCGТААСАГАGTCCGGТАТССАТGCAG
*  ****  *  *****  *  ****  *****
    
```

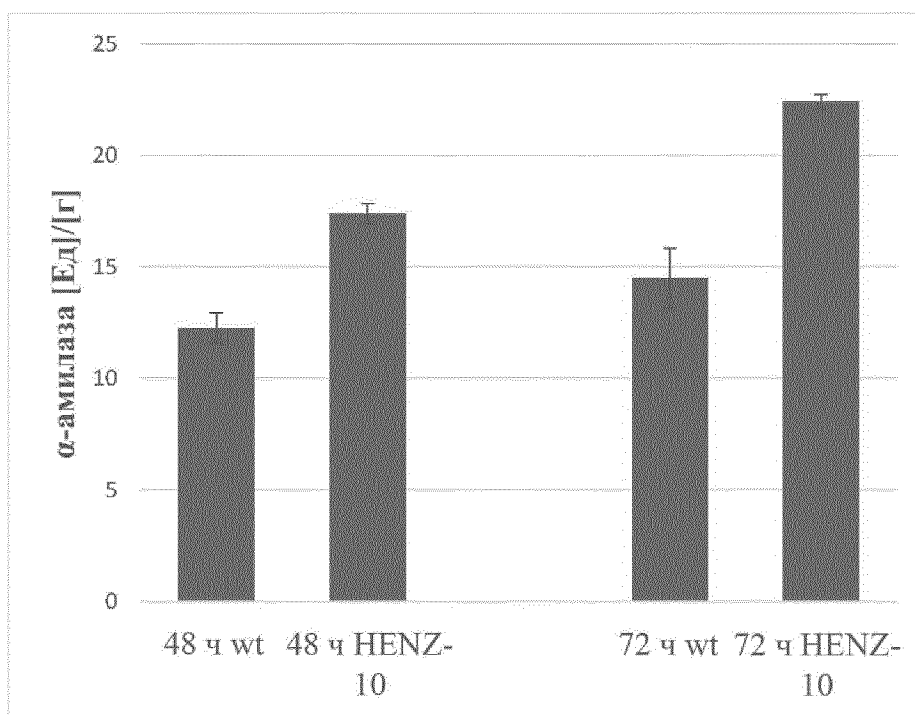
Фиг. 11В



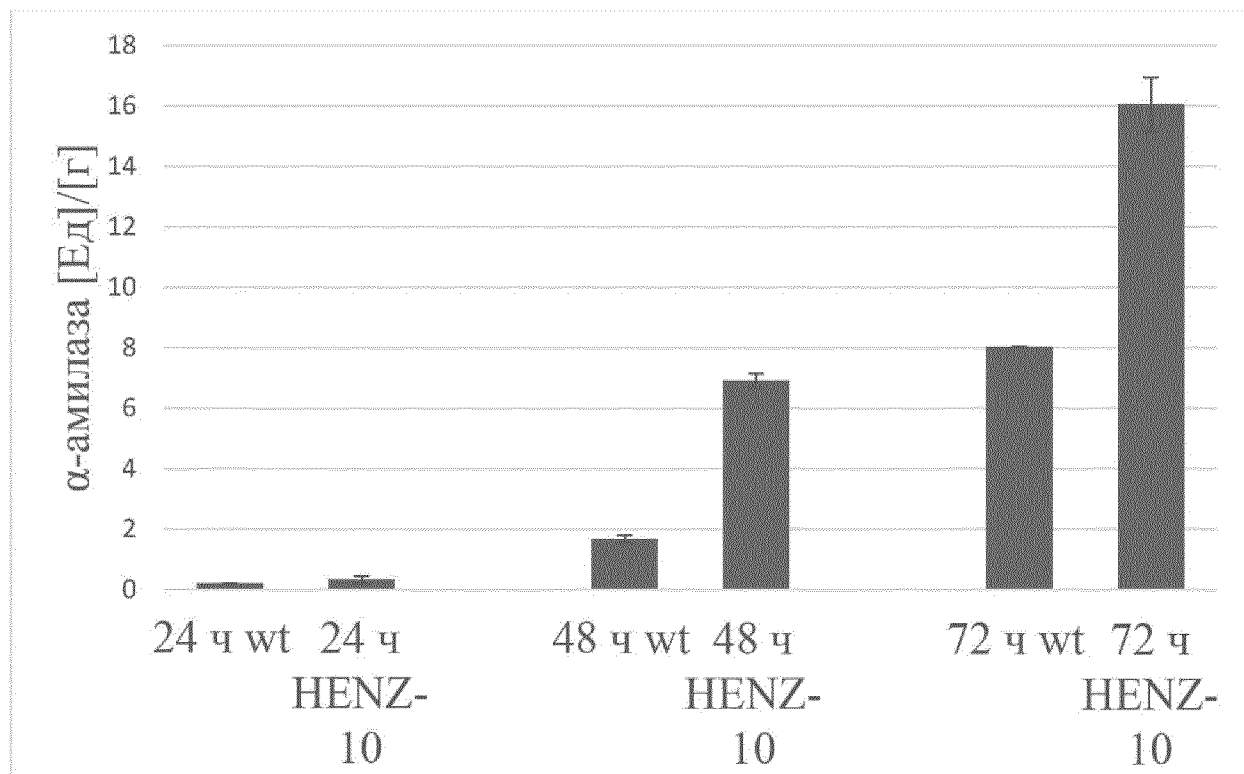
Фиг. 12

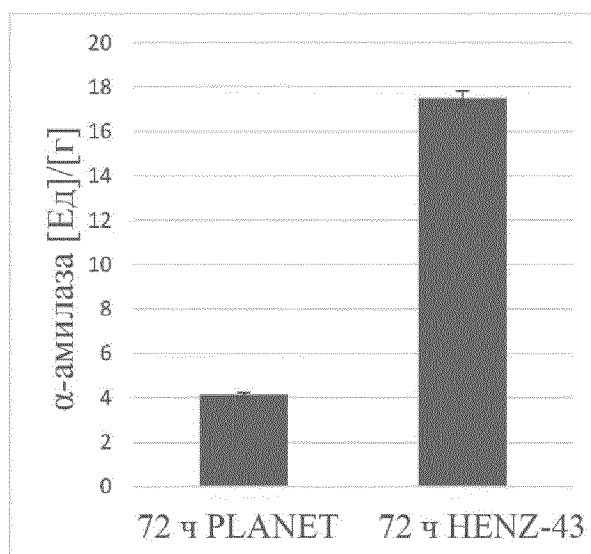
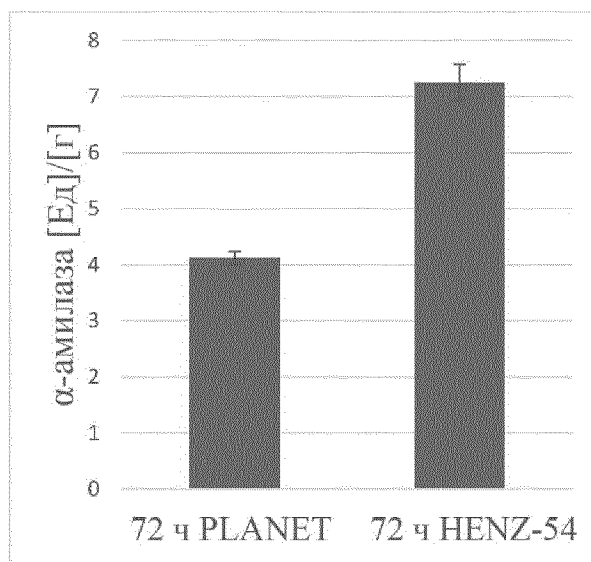
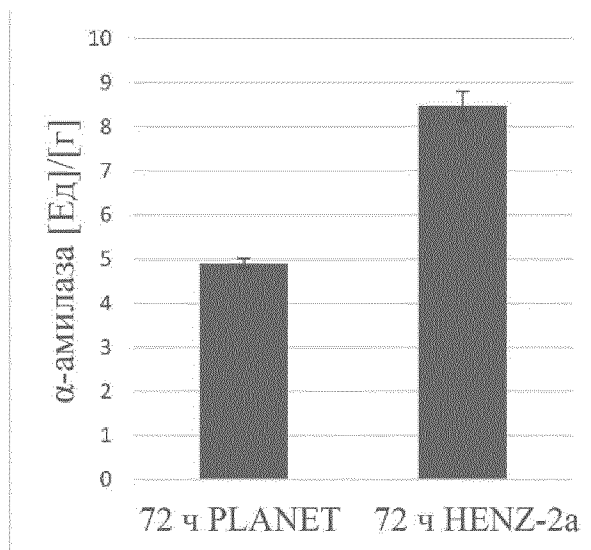


Фиг. 13А

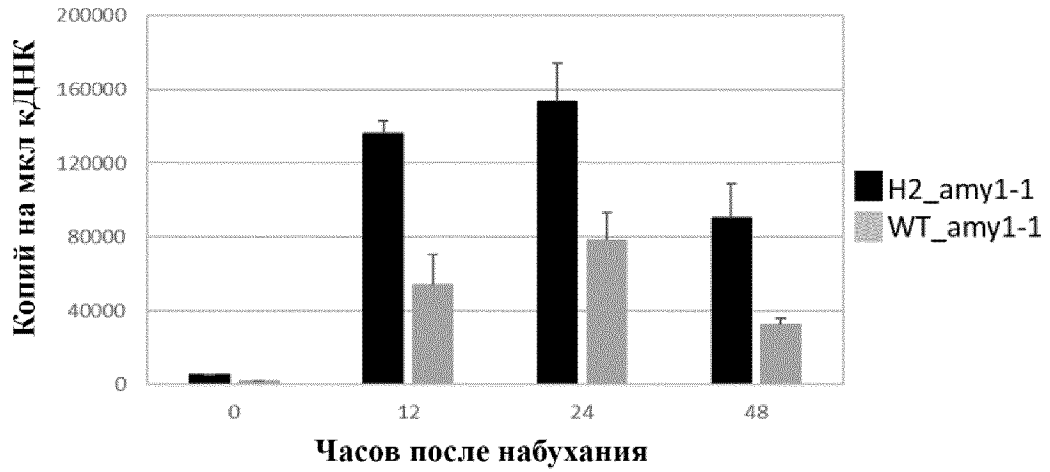


Фиг. 13В

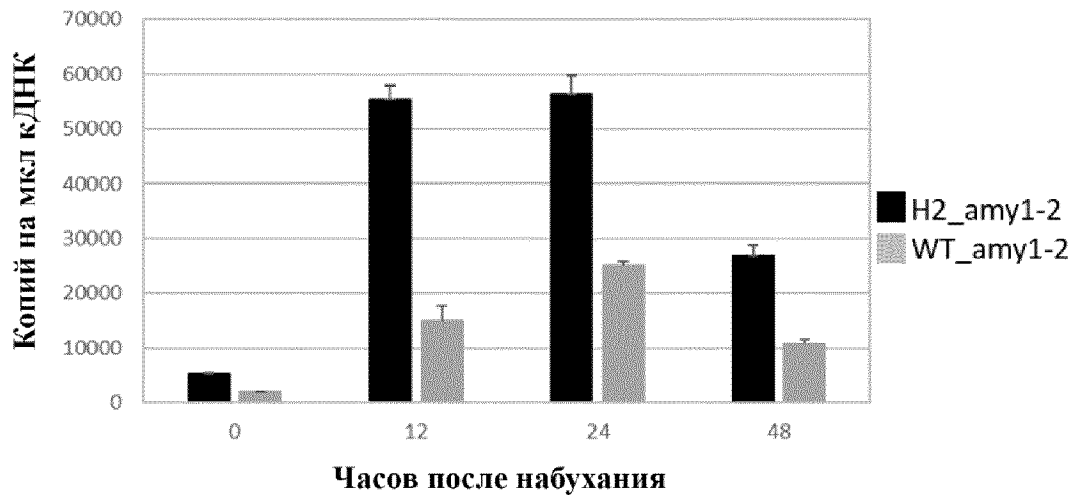
**Фиг. 14**



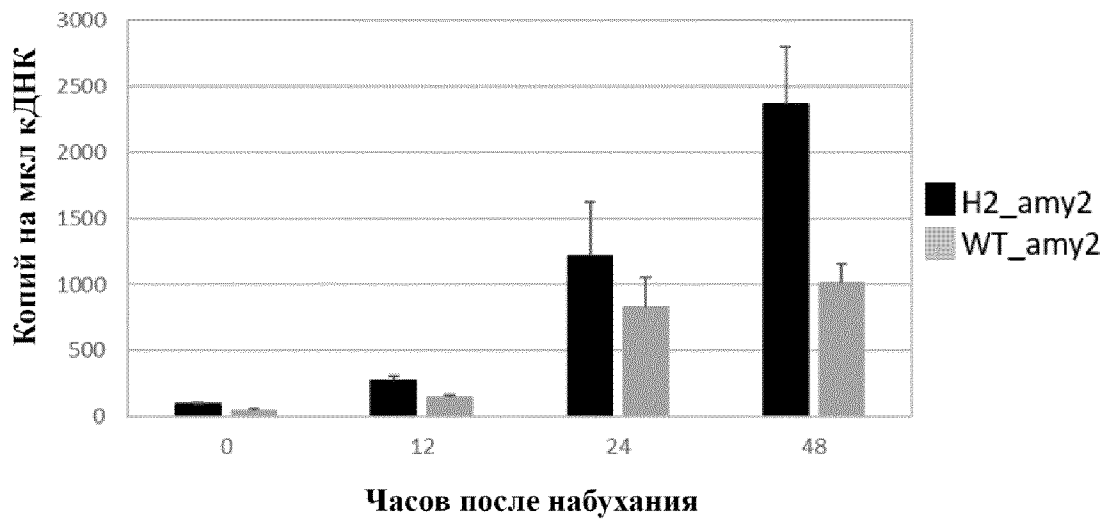
Фиг. 15



Фиг. 16А

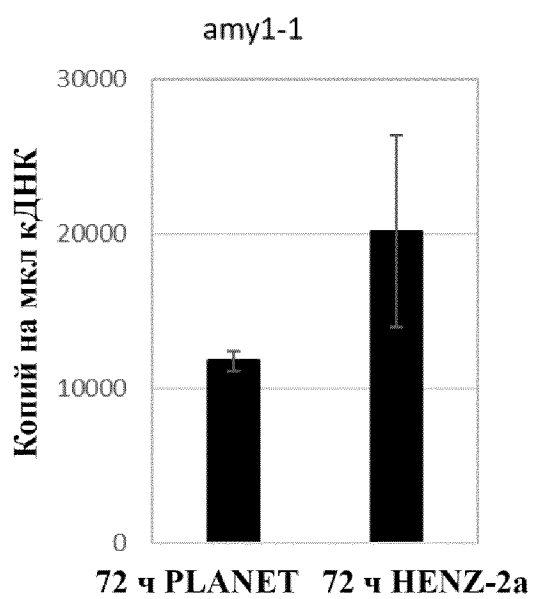


Фиг. 16В

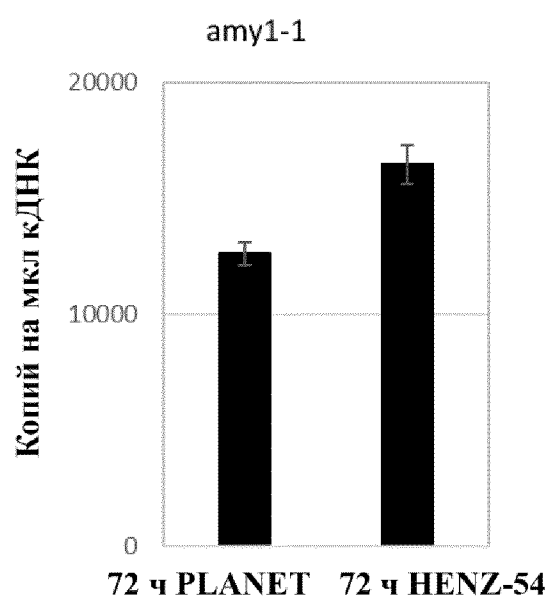


Фиг. 16С

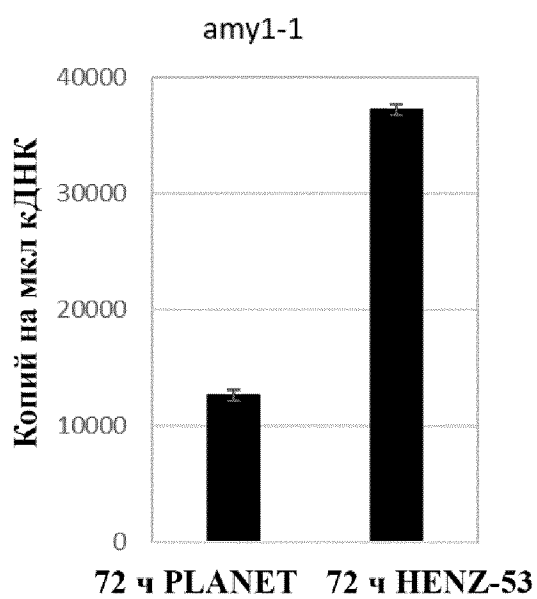
A)



B)

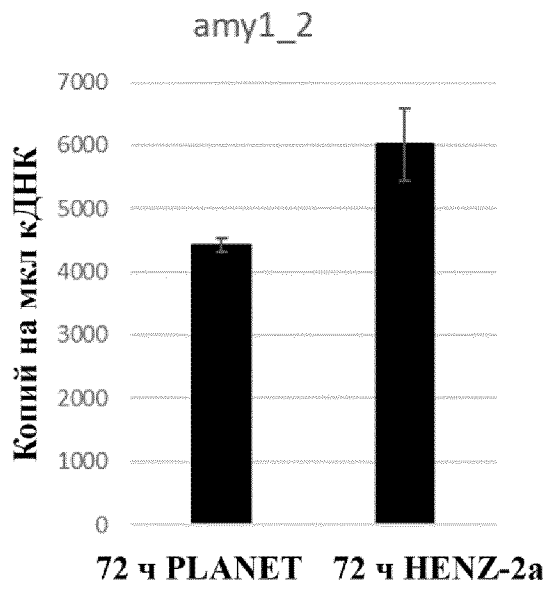


C)

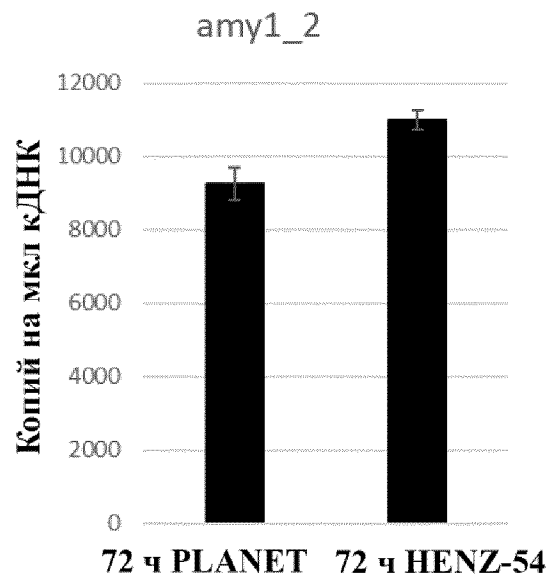


Фиг. 17

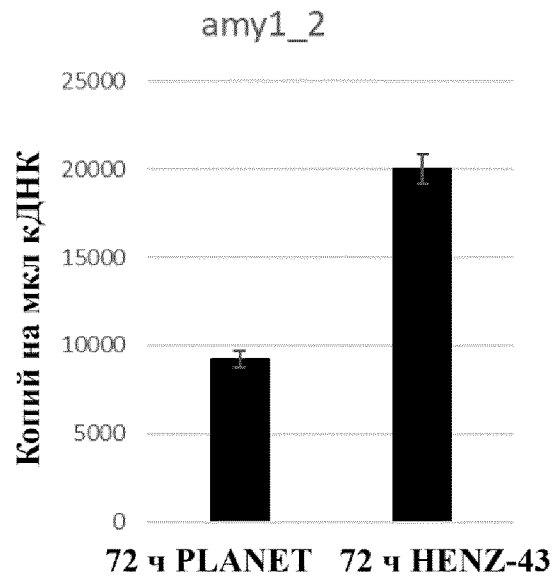
A)



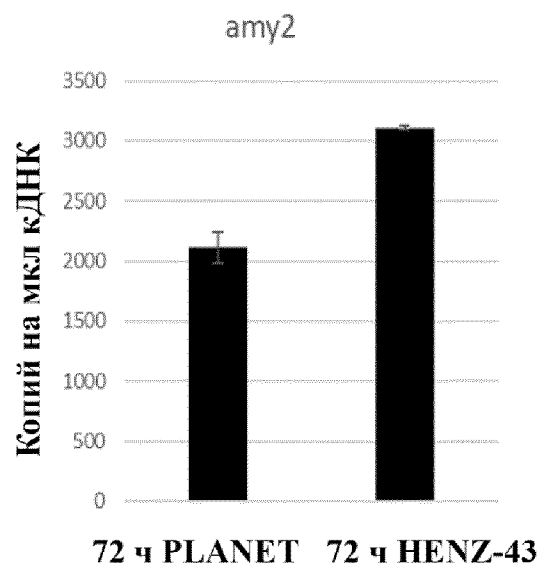
B)



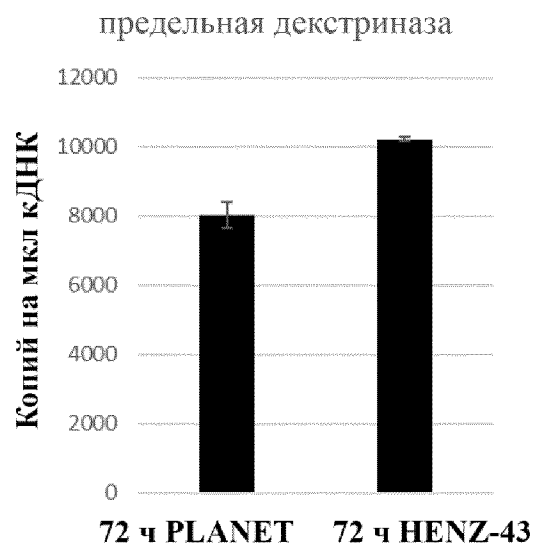
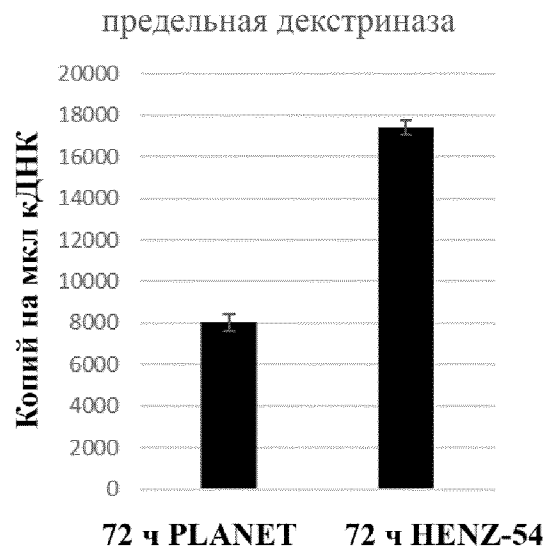
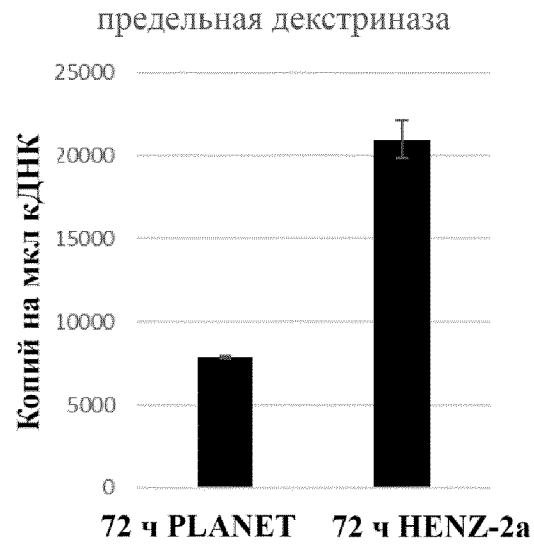
C)



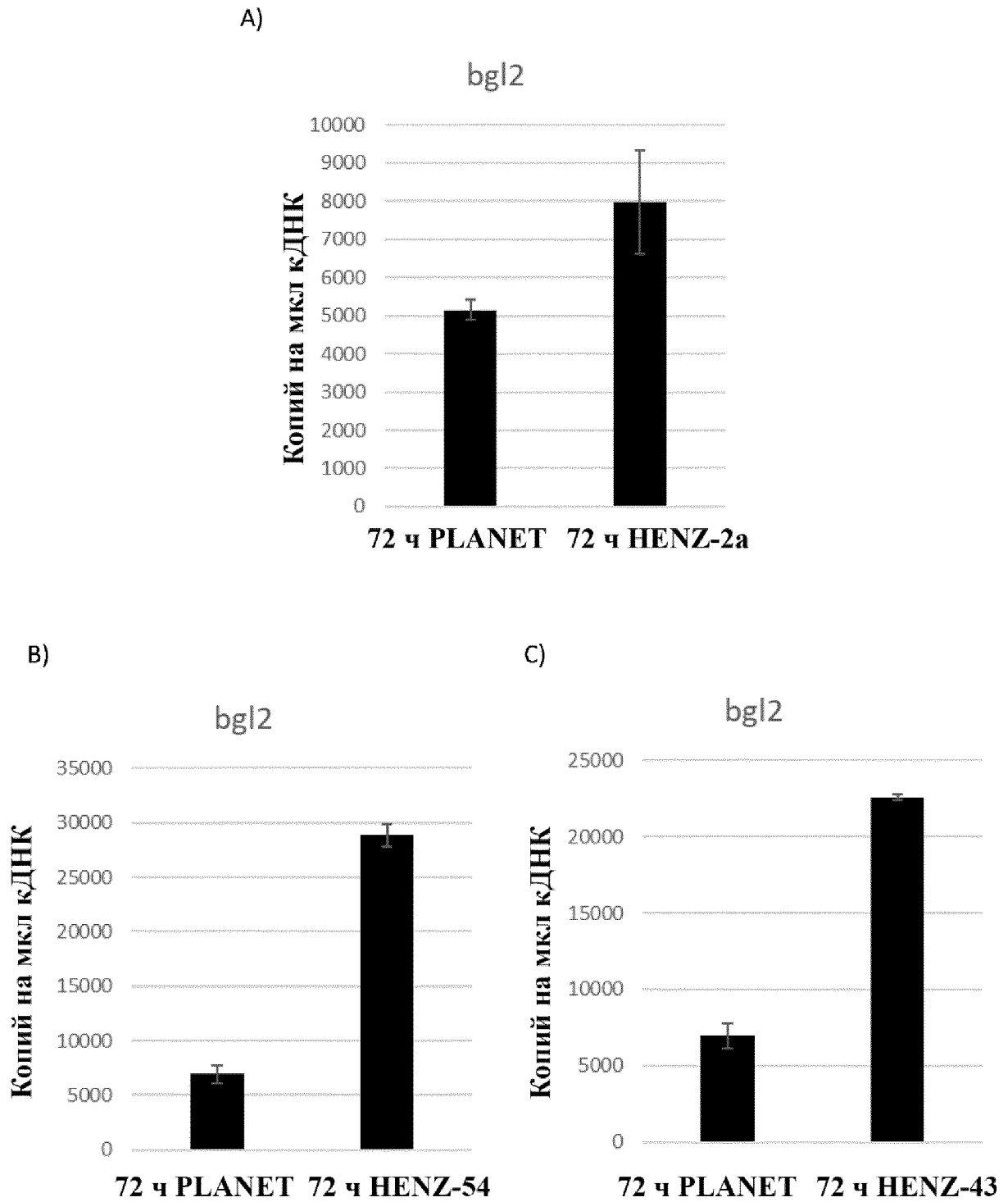
D)



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20