

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291585** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.09.08

(51) Int. Cl. **C07K 14/415** (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.11

(54) **СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЯ К ХОЛОДУ ИЛИ МОРОЗУ**

(31) **19215963.0**

(32) **2019.12.13**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2020/085835**

(87) **WO 2021/116448 2021.06.17**

(71) Заявитель:
**КВС ЗААТ СЕ & КО. КГАА;
СЮДЗУКЕР АГ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Людевиг Франк, Хармс Карстен, Кох
Вольфганг, Сонневальд Уве, Мюдсам
Кристина, Зирер Вольфганг, Мартинс-
Родригес Кристина, Келлер Изабель,
Поммерениг Бенджамин, Неухаус
Эккхард (DE)**

(74) Представитель:

Зуйков С.А. (RU)

(57) Изобретение относится к способам повышения холодостойкости растения или его части, и/или предотвращения, или ингибирования стрелкования растения, содержащим дерегулирование потока флоэмы, и к растениям или их частям, имеющим дерегулированный поток флоэмы. Настоящее изобретение также относится к использованию генов для дерегулирования потока флоэмы у растения или его части; и/или к повышению холодостойкости растения или его части; и/или к предотвращению, или ингибированию стрелкования у растения. Настоящее изобретение также предлагает способы выбора и/или продуцирования растения с дерегулированным потоком флоэмы, и/или с повышенной холодостойкостью, и/или с замедленным или ингибированным стрелкованием. Настоящее изобретение также относится к конструкциям, выделенным полинуклеотидам и полипептидам, которые могут быть использованы для дерегулирования потока флоэмы, растительным клеткам, трансформированным такими конструкциями, и к растениям или их частям, имеющим дерегулированный поток флоэмы.

A1

202291585

202291585

A1

СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЯ К ХОЛОДУ ИЛИ МОРОЗУ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к способам повышения холодостойкости растения или его части, и/или предотвращения, или ингибирования стрелкования растения, содержащим дерегулирование потока флоэмы в упомянутом растении или его части. Настоящее изобретение также относится к использованию генов для дерегулирования потока флоэмы у растения или его части; и/или к повышению холодостойкости растения или его части; и/или к предотвращению, или ингибированию стрелкования у растения. Настоящее изобретение также предлагает способы выбора и/или продуцирования растения с дерегулированным потоком флоэмы, и/или с повышенной холодостойкостью, и/или с замедленным или ингибированным стрелкованием. Настоящее изобретение также относится к конструкциям, выделенным полинуклеотидам и полипептидам, которые могут быть использованы для дерегулирования потока флоэмы, растительным клеткам, трансформированным такими конструкциями, и к растениям или их частям, имеющим дерегулированный поток флоэмы.

Настоящее изобретение также относится к использованию растений или их частей, имеющих дерегулированный поток флоэмы, и к собранным корням таких растений. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам повышения концентрации сахарозы в органе запасаения сахарозы растения.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к повышению холодостойкости и/или к предотвращению, или ингибированию стрелкования культурных растений. В частности, настоящее изобретение относится к дерегулированию потока флоэмы и к его использованию для повышения холодостойкости, и/или предотвращению, или ингибированию стрелкования культурных растений. Настоящее изобретение особо применимо в области промышленного производства сахара из культурных растений.

Сахар - это собирательный термин для всех сладких на вкус моно- и дисахаридов, а также общее коммерческое название дисахарида сахарозы. Сахароза - это обычный бытовой или сахарный песок, также известный как сахароза. Сахароза представляет собой димер одной молекулы α-D-глюкозы и β-D-фруктозы, которые связаны между собой посредством -1, 2-гликозидной связи.

Сахароза образуется в растениях в результате фотосинтеза. Сахароза является невосстанавливающим дисахаридом и, поэтому является наиболее важным транспортным сахаром в растении, используемым в качестве источника питательных веществ и энергии.

Сахароза синтезируется в листьях растений и является основным сахаром, транспортируемым через флоэму от органов-источников к органам-поглотителям.

После выгрузки в поглотители сахароза может быть метаболизирована и использована в качестве предшественника энергии и в качестве строительного блока для роста и биосинтеза запасных соединений. Незеленые органы запаса, такие как клубни или стержневые корни, должны поддерживать источник в пропитанном состоянии для градиента-поглотителя. Импортируемая сахароза быстро превращается в относительно инертные запасные соединения, такие как крахмал, или распределяется внутриклеточно в большие клеточные вакуоли. Идентичность поглотителя и источника у органов растений является динамической, и инициируются переходы в ответ на эндогенные сигналы развития или в ответ на специфичные стимулы окружающей среды.

Коммерчески важными растениями для производства сахарозы являются сахарная свёкла (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*), сахарный тростник (*Saccharum officinarum*) и сахарная пальма (*Arenga pinnata*, синоним: *Arenga saccharifera* Labill., главным образом в Индонезии). В зонах с умеренным климатом, таких как Европа и Северная Африка, сахарная свёкла является основным видом культурных растений, из которого получают промышленную сахарозу.

Сахарная свёкла - двулетнее растение, которое в первый год своего развития образует крупный стержневой корень. Этот стержневой корень содержит сахарозу до 20% его массы в сыром виде. В течение второго года стержневой корень запасает сахарозу в качестве предшественника для формирования большого соцветия. Образование соцветий зависит от предшествующей фазы длительных низких температур, приблизительно, от 2 °C до 10 °C, что индуцирует яровизацию, процесс в течение периода холодов, когда растение переходит от вегетативной стадии к репродуктивной. Зависящее от яровизации стрелкование приводит к снижению выхода сахарозы. Несмотря на то, что сахарная свёкла является двулетним растением, ее выращивают в коммерческих целях как однолетнее растение из-за ее чувствительности к заморозкам и потому, что после яровизации у сахарной свеклы начинается цветение, что, в свою очередь, снижает выход сахара при сборе урожая. Считается, что сопутствующая потеря сахара стержневого корня может отрицательно сказаться на морозостойкости стержневого корня, поскольку известно, что сахара защищают ткань от повреждения морозом.

В коммерческих целях желательны длительный период выращивания (например, с весны до осени) и идентификация устойчивых к стрелкованию сортов.

В геноме сахарной свеклы были идентифицированы два основных локуса раннего стрелкования, *B* и *B2*, кодирующие ген-регулятор псевдоответа, КОНТРОЛИРУЮЩИЙ

ВРЕМЯ СТРЕЛКОВАНИЯ 1, BTC1 (Пин *и соавт.*, 2012 Current Biology 22: 1095-1101, включено в настоящий документ в качестве ссылки) и ДВОЙНОЙ белок ЦИНКОВОГО ПАЛЬЦА ТИПА В-ВОХ BvBBX19 (Далли *и соавт.*, 2014 Proc Natl Acad Sci USA 111: 10365, включено в настоящий документ в качестве ссылки), соответственно. У однолетней свеклы экспрессия обоих генов приводит к репрессии гена-репрессора цветения FT1 и последующей индукции гена-индуктора цветения FT2 и независимому от яровизации цветению в течение долгих дней. Двухлетняя свёкла гомозиготна по рецессивным аллелям btc1 и bbx19, которые кодируют нефункциональные белки, неспособные репрессировать ингибиторную функцию FT1 (Пфайффер *и соавт.*, 2014 Theoretical and applied genetics 127: 2479-2489, работа включено в настоящий документ в качестве ссылки). Соответственно, двухлетняя сахарная свёкла требует яровизации для BTC1- и BBX19-независимой репрессии FT1 и цветения (Пин *и соавт.*, 2010 Science 330: 1397, работа включено в настоящий документ в качестве ссылки).

Как описано в Примерах, авторы настоящего изобретения стремились предложить растения с улучшенной холодостойкостью и морозостойкостью, и/или с замедленным или предотвращенным стрелкованием.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Неожиданно было обнаружено, что в ответ на низкие температуры может произойти обратное превращение поглотителя (например, стержневого корня) в источник (например, лист) до стрелкования и до цветения. Дерегулирование потока флоэмы модулирует холодостойкость и/или стрелкование растений. Путем дерегулирования потока флоэмы у растений, как описано в настоящем документе, может быть повышена холодостойкость и/или может быть предотвращено, или ингибировано стрелкование. Поток флоэмы действует как регулятор холодостойкости и/или стрелкования у растений.

В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает способ повышения холодостойкости растения или его части и/или предотвращения, или ингибирования стрелкования растения, содержащий дерегулирование потока флоэмы в упомянутом растении или его части.

Соответственно, поток флоэмы от тканей-поглотителей (например, стержневых корней) к тканям-источникам (например, побегам) может быть уменьшен, ингибирован или обращен вспять, когда упомянутое растение или его часть выращивают в холодных условиях. Соответственно, поток флоэмы может быть уменьшен, ингибирован или обращен вспять после яровизации.

Соответственно, способ может содержать модификацию упомянутого растения или его части для:

i) повышения активности или экспрессии гена, содержащего:

a) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

b) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID №: 2 или 8, или кодирующую последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 2 или 8;

c) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами a) или b) в жестких условиях;

d) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

e) нуклеотидную последовательность, кодирующая гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или

ii) повышения активности или экспрессии полипептида:

a) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения,

по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

b) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

с) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

d) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9.

Соответственно, способ может содержать модификацию упомянутого растения или его части для:

i) снижения активности или экспрессии гена, содержащего:

a) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

b) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 5, 11, 14 или 17, или кодирующую последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 5, 11, 14 или 17;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или b) в жестких условиях;

d) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

е) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18; или

ii) снижения активности или экспрессии полипептида:

а) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

б) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

с) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

д) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает использование гена:

а) содержащего нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 или 11, 13, 14, 16 или 17;

б) содержащего нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17, или нуклеотидную

последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17;

с) содержащего нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или b) в жестких условиях;

d) содержащего нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3, 6, 9 или 12, 15 или 18;

e) кодирующего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18; или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18; или

f) кодирующего гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18;

для регулирования потока флоэмы в растении или его части; и/или повышения холодостойкости растения или его части; и/или предотвращения, или ингибирования стрелкования растения.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает использование гена:

а) содержащего нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%

или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 или 11, 13, 14, 16 или 17;

b) содержащего нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17;

c) содержащего нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или b) в жестких условиях;

d) содержащего нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3, 6, 9 или 12, 15 или 18;

e) кодирующего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18; или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18; или

f) кодирующего гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18;

для отбора растения, имеющего дерегулированный поток флоэмы в растении или его части; и/или повышенную холодостойкость; и/или замедленное, или ингибированное стрелкование.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает способ отбора растения с дерегулированным потоком флоэмы и/или с повышенной холодостойкостью, и/или замедленным, или ингибированным стрелкованием путем отбора аллеля, при этом, аллель

ассоциирован с дерегулированным потоком флoэмы, при этом, указанный аллель представляет собой:

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

б) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

д) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18;

е) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18;

ф) аллель по любому из пунктов а), б), с), д) или е); и

упомянутый способ содержит определение присутствия или отсутствия упомянутого аллеля, предпочтительно, при этом, упомянутый аллель идентифицируют путем обнаружения присутствия однонуклеотидных полиморфизмов, полиморфизмов длин, инсерционно-делеционных полиморфизмов.

В еще одном аспекте, настоящее изобретение предлагает способ продуцирования холодостойкого растения и/или растения с замедленным, или ингибированным стрелкованием, содержащий скрещивание растения-донора, содержащего аллель, ассоциированный с дерегулированным потоком флоэмы, при этом, упомянутый аллель содержит полинуклеотидную последовательность, содержащую:

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

б) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

д) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18;

е) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18; или

ф) аллель по любому из пунктов а), б), с), д) или е);

с растением-реципиентом, обладающим коммерчески желательными признаками.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает растение или его часть, которые можно получить (или получено) с помощью способа в соответствии с настоящим изобретением или использования в соответствии с настоящим изобретением.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает материал для размножения растений (такой как семя), получаемый (или полученный) из растения в соответствии с настоящим изобретением.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает модифицированную растительную клетку, при этом, растительная клетка была модифицирована для:

i) повышения активности или экспрессии гена, содержащего:

a) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

b) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 2 или 8;

c) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами a) или b) в жестких условиях;

d) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

е) нуклеотидную последовательность, кодирующая гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или

ii) повышения активности или экспрессии полипептида:

а) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

б) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

с) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

д) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9.

iii) снижения активности или экспрессии гена, содержащего:

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

б) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 5, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере,

90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 5, 11, 14 или 17;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

д) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

е) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18; или

iv) снижения активности или экспрессии полипептида:

а) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

б) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

с) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

d) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает модифицированное растение или его часть, содержащую модифицированную растительную клетку в соответствии с настоящим изобретением.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает материал для размножения растений, который можно получить (или получен) из модифицированного растения в соответствии с настоящим изобретением.

Соответственно, растение или его часть, или растительная клетка для использования в любом аспекте настоящего изобретения могут относиться к семейству *Amaranthaceae* (Амарантовые).

Соответственно, растение или его часть, или растительная клетка для использования в любом аспекте настоящего изобретения относится к роду *Beta* (Свекла).

Соответственно, растение или его часть, или растительная клетка для использования в любом аспекте настоящего изобретения является *Beta vulgaris*, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, *Beta vulgaris* subsp. *Vulgaris* var. *altissima*, *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *vulgaris*, *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *conditiva*, *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *crassa/alba*, и в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, поток флоэмы от стержневых корней к побегам уменьшается, ингибируется или обращается вспять, когда упомянутое растение или его часть выращивают в холодных условиях.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает использование растения или его части, или растительной клетки в соответствии с настоящим изобретением для размножения растения.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает использование растения или его части, или растительной клетки по настоящему изобретению для производства пищевого продукта, такого как сахар, сироп из сахарной свеклы, патока или напитков.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает использование растения или его части, или растительной клетки в соответствии с настоящим изобретением для производства корма для животных.

В еще одном аспекте, настоящее изобретение предлагает использование растения или его части, или растительной клетки в соответствии с настоящим изобретением для выращивания культурного растения.

В дополнительном аспекте, настоящее изобретение предлагает собранный корень растения в соответствии с настоящим изобретением, или получаемый (или полученный) из растения, размноженного из материала для размножения в соответствии с настоящим изобретением, или получаемый (или полученный) способом в соответствии с настоящим изобретением.

В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает использование нуклеотидной последовательности, выбранной из:

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

б) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

д) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18;

е) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18;

для выбора растения с дерегулированным потоком флоэмы и/или с повышенной холодостойкостью, и/или с замедленным, или ингибированным стрелкованием.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает способ повышения концентрации сахарозы в органе запасаения сахарозы растения, причем способ содержит модификацию упомянутого растения или его части для:

i) снижения активности или экспрессии гена, содержащего:

a) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

b) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 5, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 5, 11, 14 или 17;

c) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами a) или b) в жестких условиях;

d) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

e) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18; или

ii) снижения активности или экспрессии полипептида:

а) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

б) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

с) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18; или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

д) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает способ выбора растений, их частей или растительных клеток, имеющих дерегулированный поток флоэмы и/или повышенную холодостойкость, и/или замедленное, или ингибированное стрелкование после яровизации, путем скрининга упомянутого растения или его части, или растительной клетки для:

і) снижения активности или экспрессии гена, содержащего:

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

б) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2 или 8, или нуклеотидную

последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 2 или 8;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

д) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

е) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; и/или

ii) снижения активности или экспрессии полипептида:

а) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

б) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

с) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере

мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

d) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; и/или

iii) повышения активности или экспрессии гена, содержащего:

a) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

b) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 5, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 5, 11, 14 или 17;

c) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

d) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

e) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18; и/или

iv) повышения активности или экспрессии полипептида:

а) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

б) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

с) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

д) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, отобранную из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID № 4 или 5, или нуклеотидной последовательности, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 4 или 5;

б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 5, или из нуклеотидной последовательности, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления

настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 5;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

д) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, или из последовательности, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% (например, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99%) идентичность SEQ ID № 6;

е) нуклеотидной последовательности, кодирующей гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает выделенный полипептид, выбранный из группы, состоящей из:

а) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6; или

б) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% (например, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99%) идентичность SEQ ID № 6; или

с) гомолога, аналога или ортолога полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6.

В еще одном аспекте, настоящее изобретение предлагает генетическую конструкцию или вектор, содержащий полинуклеотид в соответствии с настоящим изобретением; или полинуклеотид, кодирующий полипептид в соответствии с настоящим изобретением.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СОПРОВОДИТЕЛЬНЫХ ЧЕРТЕЖЕЙ

Варианты осуществления настоящего изобретения будут теперь описаны только в качестве примера со ссылкой на сопроводительные чертежи, на которых:

На Фигуре 1 показан ответ биомассы и накопления сахара на низкие температуры в побегах и стержневых корнях 6-недельных растений сахарной свеклы из трех разных генотипов (GT1 = квадрат; GT2 = круг; GT3 = треугольник). Растения выращивали в течение шести недель при температуре 20 °C, затем перенесли на одну неделю в условия с температурой 12 °C, а затем в условия с температурой 4 °C (начало регистрации биомассы и накопления сахара) на 19 дней. Для каждой точки данных в полдень собирали целые органы (побеги или стержневые корни). Точки данных показывают средние значения от $n = 6$ до 10 растений \pm SD (стандартное отклонение). **(A,B)** Масса в сыром виде (FW), масса в сухом виде (DW) и содержание воды в побегах и корнях. **(C,D)** Накопление сахара и крахмала в течение периода охлаждения (4 °C) в побегах и стержневых корнях, соответственно. Значимые изменения в контрольном состоянии (первая точка данных) были рассчитаны с использованием двустороннего *t*-критерия Стьюдента 165 (* = $p < 0,05$).

На Фигуре 2 показаны параметры фотосинтеза, ассимиляции CO₂ и данные экспрессии листьев сахарной свеклы после воздействия холода. Растения сахарной свеклы трех генотипов (GT1 = квадрат; GT2 = круг; GT3 = треугольник) выращивали в течение шести недель при температуре 20 °C, а затем перенесли на одну неделю в условия с температурой 12 °C, а затем на три недели в условия с температурой 4 °C. **(A)** Измерения РАМ (мотив, смежный с протоспейсером) листьев трех различных генотипов. Квантовый выход фотосинтеза [Y(II)], нефотохимического тушения [Y(NPQ)] и нерегулируемого тушения [Y(NO)]. В каждый временной точке анализировали по четыре растения на каждый генотип. **(B)** Газообмен, измеренный для тех же растений, которые использовались в **(A)**. Показаны межклеточная концентрация CO₂ в листьях (C_i), скорость ассимиляции CO₂ (A) и скорость испарения (E). Для каждого измерения использовались четыре отдельных растения. Одни и те же растения использовались для измерений в разные временные точки после переноса в холодные условия. Значимые изменения в контрольном состоянии (первая точка данных) были рассчитаны с использованием *t*-критерия Стьюдента (* = $p < 0,05$). **(C)** Анализ основных компонентов (PC1 против PC2) для трех генотипов на основе значений экспрессии 162 генов, связанных с фотосинтезом, извлеченных из данных РНК-секвенирования листьев-источников растений, выращенных при температуре 20 °C после воздействия температуры 4 °C или воздействия контрольных условий (20 °C) в течение 14 дней, соответственно. **(D)** Процент считываний РНК-

секвенирования, аннотированных как гены, кодирующие белки, связанные с фотосинтезом (PS). Круговые диаграммы представляют средние значения для трех разных генотипов при температуре 20 °C (контроль) и через 14 дней при температуре 4°C. Левые круговые диаграммы показывают все мРНК и мРНК белков, связанных с PS, правые круговые диаграммы указывают мРНК белков, связанных с PS, в группах: PS.световая реакция, PS.цикл Кальвина и PS. Фотодыхание. (E) Экспрессия *активазы RuBisCO (Рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа)* (*Bv2_025300_tzou.t1*), *малая субъединица RuBisCO* (*Bv2026840_jyus.t1*), *хлорофилл A/B связывающий белок A* (*Bv_002570_dmif.t1*), *Пластоцианин* (*Bv_004160_hgjn.t1*), *глутатионредуктаза1* (*Bv3_069540_erom.t1*), *глутатионредуктаза2* (*Bv5_120360_jpwm.t1*), *супероксиддисмутаза1* (*Bv5_102420_sxsu.t1*), *Аскорбатпероксидаза1* (*Bv1_007470_ymzt.t1*). Данные представляют собой средние нормализованные значения cpm (число импульсов в минуту) трех отдельных анализов РНК-секвенирования для каждого генотипа и температурных условий \pm SD. Звездочки обозначают значения $p < 0,05$ в соответствии с двусторонним *t*-критерием в сравнении со значениями в контрольных условиях (20 °C). Три испытуемых генотипа представлены в виде трех столбиков, при этом, первый столбик представляет собой GT1, второй столбик представляет собой GT2, а третий столбик представляет собой GT3.

На Фигуре 3 показаны изменения в основном углеводном обмене в ответ на холод. (A) Дыхание (выработка CO₂) различных участков стержневого корня из GT1 в контрольных условиях (20 °C, третий столбик справа) или после переноса на одну неделю в условия температуры 4 °C (средний из трех столбиков). (B) Дыхание (выработка CO₂) из ткани листьев трех генотипов (GT1, GT2, GT3) в контрольных условиях (20 °C, третий столбик справа) или после переноса на одну неделю в условия температуры 4 °C (средний из трех столбиков). (C) Анализ основных компонентов (PC) (PC1 против PC2) для трех генотипов на основе значений экспрессии 112 генов с аннотацией GO "основной метаболизм СНО" (загрузки), извлеченных из данных РНК-секвенирования листьев-источников растений, выращенных при температуре 20 °C и перенесенных на 1 неделю в условия при температуре 12 °C затем на 14 дней в условия при температуре 4 °C или в контрольные условия (20 °C). (D) Анализ тепловой карты сгруппированных значений экспрессии, извлеченных из данных РНК-секвенирования. К строкам было применено масштабирование единичной дисперсии. Строки группируются с использованием расстояния Манхэттена и среднего сцепления. (E) Значения экспрессии для двух генов сахарозофосфатсинтазы (*BvSPSA1* и *BvSPSA2*), извлеченных из данных РНК-секвенирования побегов и корней, и активности SPS в листьях и корнях в условиях ограниченного (lim) и максимального (max) субстрата (F-6-P). Три испытуемых генотипа

представлены на левых графиках в виде трех столбиков, при этом, первый столбик представляет собой GT1, второй столбик представляет собой GT2, а третий столбик представляет собой GT3. (F) Значения экспрессии двух генов сахарозосинтазы (BvSUS1 и BvSUS2), извлеченных из данных РНК-секвенирования побегов, корней и обилия белка на основе подсчетов при МС (интенсивность без меток, единицы LFQ) у GT1, GT2, GT3. Три испытуемых генотипа представлены в виде трех столбиков, при этом, первый столбик представляет собой GT1, второй столбик представляет собой GT2, а третий столбик представляет собой GT3.

Фигура 4. Распределение ^{14}C -сахарозы и эскулина в листьях. (A-D) Авторадиография ^{14}C -сахарозы в листьях. (A) Схематическое изображение эксперимента. Стержневые корни инокулировали ^{14}C -раствором сахарозы, а собранные и высушенные листья через неделю подвергали авторадиографии. (B) Лист-источник репрезентативного растения, выращенный в течение одной недели при температуре 4 °C. Почернение жилок указывает на радиоактивность, включенную и распределенную в ткани листьев после введения радиоактивно меченой сахарозы в стержневые корни. Сокращения: p = черешок; mv = средняя жилка; 1° = вторичная жилка первого порядка; 2° = вторичная жилка второго порядка. (C) Лист-источник репрезентативного контрольного растения, выращенного при 20 °C. (D) радиоактивность в cpm (число импульсов в минуту), измеренная в отдельных черешках растений, выращенных при температуре 4 °C или 20 °C. Центральные линии показывают медианы; границы квадрата указывают на 25-й и 75-й перцентили; висеры в 1,5 раза превышают межквартильный диапазон, охватывая от 25-го до 75-го перцентилей, выбросы представлены точками; крестики представляют средние значения выборки; n = 16 точек выборки. (E-K) Загрузки эскулина. Желтая флуоресценция (видимая в виде колец в (I) и отмеченная стрелками) указывает на лигнифицированные сосуды ксилемы, синяя флуоресценция указывает на миграцию эскулина и отмечена звездочками. (E) Схематическое изображение эксперимента. Эскулин загружали на поцарапанную поверхность листа-источника растений, выращенных при температуре 20 °C. Растения, загруженные эскулином переносили в условия температуры 4 °C или выдерживали при температуре 20 °C. Черешки соседних незагруженным листьев-источников анализировали на флуоресценцию эскулина в растениях, выдержанных при температуре 4 °C или 20 °C. (F-I) Поперечные срезы черешка листа-источника, не загруженного эскулином, от растений, загруженных при температуре 20 °C. (F, G) Черешки, выдержанные при температуре 20 °C (F) Изображение, полученное методом яркого поля. (G) УФ-флуоресцентное изображение. (H, I): Черешки, выдержанные при температуре 4 °C. (H) Изображение, полученное методом яркого поля. (I) УФ-

флуоресцентное изображение. (J, K) Продольные срезы черешка, выдержанного при температуре 4 °С. J) Изображение, полученное методом яркого поля. K) УФ-флуоресцентное изображение. Сокращения: ху: ксилема, рh: флоэма. Столбики имеют размеры 50 мкм в G и H и 100 мкм в E, F, I и J.

Фигура 5. Зависящее от холода накопление *BvTST2.1* и *BvSUT4* в трех различных генотипах сахарной свеклы. (A) Обилие белка на основе подсчетов при МС, приведенных как LFQ (интенсивность без меток), и обилие транскриптов мРНК *BvTST2.1* (Bv5_115690_zuju.t1) на основе считываний РНК-секвенирования. Значения представляют собой средние значения от n=6 (белок) или n=3 (мРНК) биологических повторов на генотип ± SE (стандартная погрешность). (B) Обилие белка на основе подсчетов при МС, приведенных как LFQ (интенсивность без меток) и обилие транскриптов мРНК *BvSUT4* (Bv5_124860_zpft.t1) на основе считываний РНК-секвенирования. Значения представляют собой средние значения от n=6 (белок) или n=3 (мРНК) биологических повторов ± SE. Звездочки указывают на значительные различия между обработками при температуре 20 °С и 4 °С в соответствии с t-критерием (* = p < 0,05) Для GT2, значения LFQ *BvSUT4* были не анализируемыми. Три испытуемых генотипа представлены в виде трех столбиков, при этом, первый столбик представляет собой GT1, второй столбик представляет собой GT2, а третий столбик представляет собой GT3.

На Фигуре 6 показана экспрессия цветочных генов-регуляторов. Обилие транскриптов *BvBBX19* (Bv9_216430_rmw.t1), *BvBTC1* (Bv2_045920_gycn.t1), *BvFT1* (Bv9_214250_miuf.t1) и *BvFT2* (Bv4_074700_eewx.t1) на основе считываний РНК-секвенирования в побегах и стержневых корнях трех разных генотипов. Значения представляют собой средние значения от n=3 биологических повторов ± SE. Звездочки указывают на p-значения < 0,05 в соответствии с двусторонним t-критерием. Три испытуемых генотипа представлены в виде трех столбиков, при этом, первый столбик представляет собой GT1, второй столбик представляет собой GT2, а третий столбик представляет собой GT3.

На Фигуре 7 показаны диаграммы Венна дифференциально экспрессируемых генов (DEG) в листьях и стержневых корнях. Количество повышающих (Log2 кратное изменение ≥ 1) или понижающих (Log2 кратное изменение ≤ -1) генов-регуляторов (с FDR ≤ 0,01) указано внутри кружков на диаграммах Венна. Общее количество общих DEG (то есть, в пересечениях всех генотипов) было выше в стержневых корнях, чем в побегах (1215 DEG с повышенной регуляцией и 845 DEG с пониженной регуляцией в стержневых корнях против 624 с повышенной регуляцией и 524 с пониженной регуляцией в побегах).

На Фигуре 8 показан филогенез изоформ *Beta vulgaris* SPS и обилие белка изоформ BvSPS в стержневых корнях. (А) Филогенез белков BvSPS. (В, С) Обилие белка SPSA1 и SPSA2 на основе подсчетов при МС (интенсивности без меток, единицы LFQ) от GT1, GT2, GT3 (BvSPSA1 = Bv2_030670_mgoq.t1; BvSPSA2 = Bv8_193450_doak.t1).

На Фигуре 9 показан филогенез изоформ *Beta vulgaris* SUS и обилие белка изоформ BvSUS в стержневых корнях. (А) Филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей сахарозосинтазы из сахарной свеклы, арабидопсиса и картофеля. Белки сахарной свеклы имели следующие идентификаторы: BvSUS1: Bv8_190960_nnju.t1, BvSUS2: Bv7_163460_jmqz.t1, BvSUS3: Bv7_173620_ffuo.t1, BvSUS4: Bv4_084720_myet.t1. Белки арабидопсиса имели следующие идентификаторы: AtSUS1: AT5G20830, AtSUS2: AT5G49190, AtSUS3: AT4g02280, AtSUS4: AT3G43190, AtSUS5: AT5G37180, AtSUS6: AT1G73370. Белки картофеля имели следующие идентификаторы: StSUS1: NP_001275237.1, StSUS2: XP_015166930.1. (В,С) Обилие белка BvSUS1 и BvSUS2 (интенсивность без меток) в растворимой белковой фракции 993 стержневых корней из трех разных генотипов (белый = GT1, темно-серый = GT2, светло-серый =GT3) получали выращиванием при температуре 20 °С или выращиванием при температуре 20 °С и последующем переносе на две недели в условия температуры 4 °С.

На Фигуре 10 показаны фосфорилированные метаболиты в побегах и стержневых корнях растений сахарной свеклы. (А) схематическое изображение процессов метаболизма сахарозы. (В-Г) концентрации фосфорилированных метаболитов в побегах и корнях трех разных генотипов (левый столбик: GT1, средний столбик: GT2, правый столбик: GT3), выращенных в течение 8 недель при температуре 20 °С, а затем либо выдержанных еще 2 недели при температуре 20 °С, либо перенесенных в условия температуры 4 °С. Сокращения: SPS: Сахарозофосфатсинтаза, SPP: Сахарозофосфатфосфатаза, SUS: Сахарозосинтаза, G-6-P: Глюкоза-6-фосфат, F-6-P: Фруктоза-6-фосфат, UDP-Glc: UDP-глюкоза, S-6-P: Сахароза-6-фосфат.

На Фигуре 11 показаны примерные изображения радиоактивности, включенной и распределенной в ткани стержневого корня на холоде. Растения выращивали в течение 10 недель при температуре 20 °С, а затем переносили на 1 неделю в условия температуры 12 °С и на 1 неделю в условия температуры 4 °С. Стержневые корни инокулировали ¹⁴С-сахарозой и собирали через 5 дней. Тонкие продольные ломтики стержневого корня были приготовлены вручную, спрессованы и высушены. Слева направо: фотографическое изображение, запись изображения с фосфором, наложение фотографии и записи изображения с фосфором, увеличение интересующей области среза. Концы стрелок

указывают на места радиоактивности. Столбики = 5 мм для изображений целого корня и 0,5 мм для увеличений (крайние правые панели).

На Фигуре 12 показаны примерные изображения радиоактивности, включенной и распределенной в ткани стержневого корня. Растения выращивали в течение 10 недель при температуре 20 °С, а затем стержневые корни инокулировали ¹⁴С-сахарозой и собирали через 5 дней. Тонкие продольные ломтики стержневого корня были приготовлены вручную, спрессованы и высушены. Слева направо: фотографическое изображение, запись изображения с фосфором, наложение фотографии и записи изображения с фосфором, увеличение интересующей области среза. Концы стрелок указывают на места радиоактивности. Столбики имеют толщину 5 мм.

На Фигуре 13 показаны филогенез, последовательность и структура предсказанного 2D-белка VvSUT4. (А) Некорневое филогенетическое дерево транспортеров сахарозы из семейства SUT/SUC *Beta vulgaris* и *Arabidopsis thaliana*. Байесовский филогенетический анализ был проведен с помощью MrBayes версии 3.2.6 (Ронквист *и соавт.*, 2012). Г-н Байес руководил проведением двух параллельных, связанных между собой анализов Марковских цепей методом Монте-Карло у двадцати тысяч поколений. Стандартное отклонение разнесенных частот было ниже 0,01. Дерево было визуализировано с помощью FigTree версии 1.4.3. Последовательности белков сахарной свеклы имели следующие идентификаторы (RefBeet 1.2): VvSUT1: Vv1_000710_gzum.t1, VvSUT3: Vv6_154300_yemu.t1, VvSUT4: Vv5_124860_zpft.t1. Белки арабидопсиса имели следующие идентификаторы: AtSUC1: AT1G71880, AtSUC2: AT1G22710, AtSUC3: AT2G02860, AtSUC4: AT1G09960, AtSUC5: AT1G71890, 1032 ATSUC9: AT5G06170. (В) Последовательность и схематическое изображение белка VvSUT4. Белок имеет 535 аа и 12 трансмембранных доменов (подчеркнуто). N-конец включает первые 58 аа, а С-конец - самые последние 14 аа, расположенные в цитоплазме клетки. Она имеет центральную петлю между шестым и седьмым трансмембранными доменами, которая включает 35 аа.

На Фигуре 14 показана экспрессия *VvTST2;1* и *VvSUT4* в листьях и корнях растений сахарной свеклы на стадии от двух до восьми листьев.

На Фигуре 15 показана утечка электролитов из растений, которые были сконструированы для сверхэкспрессии AtTMT1 (зеленые квадраты), и контрольные растения (черные квадраты) после обработки холодом. Степень высвобождения электролита из ткани указывает на повреждение ткани, вызванное обработкой холодом.

На Фигуре 16 показано содержание сахара в растениях, которые были сконструированы для сверхэкспрессии VvSUT4, и в контрольных растениях.

На Фигуре 17 показана относительная проводимость электролитов растений, которые были сконструированы для сверхэкспрессии BvSUT4, и контрольных растений.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Предложено краткое описание идентификаторов последовательностей, используемых во всем описании объекта настоящего изобретения, и соответствующий список последовательностей, при этом:

SEQ ID № 1 соответствует последовательности генома транспортера сахара из тонопласта (TST) TST2.1 из *Beta vulgaris* (BvTST2.1).

SEQ ID № 2 соответствует последовательности кДНК TST2.1 из *Beta vulgaris* (BvTST2.1).

SEQ ID № 3 соответствует аминокислотной последовательности TST2.1 из *Beta vulgaris* (BvTST2.1).

SEQ ID № 4 соответствует последовательности SUT4 из *Beta vulgaris* (BvSUT4).

SEQ ID № 5 соответствует последовательности кДНК SUT4 из *Beta vulgaris* (BvSUT4).

SEQ ID № 6 соответствует аминокислотной последовательности SUT4 из *Beta vulgaris* (BvSUT4).

SEQ ID № 7 соответствует последовательности генома TMT1 из *Arabidopsis thaliana* (AtTMT1).

SEQ ID № 8 соответствует последовательности кДНК TMT1 из *Arabidopsis thaliana* (AtTMT1).

SEQ ID № 9 соответствует аминокислотной последовательности TMT1 из *Arabidopsis thaliana* (AtTMT1).

SEQ ID № 10 соответствует нуклеотидной последовательности SUC4 из *Arabidopsis thaliana* (AtSUC4).

SEQ ID № 11 соответствует последовательности кДНК SUC4 из *Arabidopsis thaliana* (AtSUC4).

SEQ ID № 12 соответствует аминокислотной последовательности e SUC4 из *Arabidopsis thaliana* (AtSUC4).

SEQ ID № 13 соответствует первой последовательности генома SWEET из *Beta vulgaris* (BvSWEET).

SEQ ID № 14 соответствует первой последовательности кДНК SWEET из *Beta vulgaris* (BvSWEET).

SEQ ID № 15 соответствует первой аминокислотной последовательности SWEET из *Beta vulgaris* (BvSWEET).

SEQ ID № 16 соответствует второй последовательности генома SWEET из *Beta vulgaris* (BvSWEET).

SEQ ID № 17 соответствует второй последовательности кДНК SWEET из *Beta vulgaris* (BvSWEET).

SEQ ID № 18 соответствует второй аминокислотной последовательности SWEET из *Beta vulgaris* (BvSWEET).

SEQ ID № 19 соответствует последовательности ДНК, специфичной для промотора 2-1-48 стержневого корня.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Впервые авторы настоящего изобретения показали, что путем дерегулирования потока флоэмы в растении или его части, то есть, путем отделения потока флоэмы от регулирования, по меньшей мере, одним механизмом, которым обычно подвергается поток флоэмы, может быть повышена холодостойкость указанного растения или его части. Авторы настоящего изобретения дополнительно показали, что путем дерегулирования потока флоэмы в растении или его части, то есть, путем отделения потока флоэмы от регулирования, по меньшей мере, одним механизмом, которым обычно подвергается поток флоэмы, возможно предотвратить или ингибировать стрелкование.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что переход потока происходит до стрелкования, то есть, до формирования соцветия, которое будет действовать как новый орган-поглотитель, использующий ремобилизованные сахара в качестве строительных блоков. Конкретнее, это изобретение относится к способам повышения холодостойкости и/или предотвращения, или ингибирования стрелкования растений, имеющих промышленное или коммерческое значение, путем изменения регуляции потока флоэмы.

Настоящее изобретение предлагает способ повышения холодостойкости растения или его части, и/или предотвращения, или замедления стрелкования растения, содержащий дерегулирование потока флоэмы в упомянутом растении или его части.

Авторы настоящего изобретения неожиданно определили, что переход потока флоэмы происходит после воздействия низких температур (например, после яровизации), но до стрелкования, то есть, до формирования соцветия, которое будет действовать как новый орган-поглотитель, использующий ремобилизованные сахара стержневого корня в качестве строительных блоков.

Неожиданно было обнаружено, что путем дерегулирования потока флоэмы в растении или его части может быть повышена холодостойкость упомянутого растения или его части, и/или может быть предотвращено или ингибирование стрелкования указанного

растения после яровизации. Настоящее изобретение предлагает растения, подходящие для выращивания в холодных условиях, которые сохраняют урожайность и содержание сахарозы в корнях, пригодных для сбора урожая. *Beta vulgaris* по настоящему изобретению может быть посеяна раньше, что приводит к более длительному вегетационному периоду, а это приводит к получению более обильной биомассы и к более высокому выходу сахара. Соответственно, растения можно выращивать из "озимой" свеклы. Это позволяет фермеру проводить дополнительный севооборот.

Дерегулированный поток флоэмы

Используемый в настоящем документе термин "дерегулированный поток флоэмы" означает, что поток флоэмы был отделен от регулирования, по меньшей мере, одним регулирующим механизмом, которому обычно подвергается поток флоэмы. Соответственно, поток флоэмы может быть уменьшен, ингибирован или обращен вспять по сравнению со сравниваемым растением в тех же условиях.

Флоэма представляет собой живую ткань сосудистых растений, которая транспортирует растворимые органические соединения, образующиеся в процессе фотосинтеза (например, сахарозу), в те части растений, где это требуется.

Используемый в настоящем документе термин "поток флоэмы" имеет свое обычное значение в данной области техники и относится к направлению потока через систему транспортировки флоэмы.

Массовое движение транспорта флоэмы требует, чтобы плазматическая мембрана оставалась интактной. На исходном конце флоэмы сахара перемещаются в ситовидные элементы флоэмы. Это увеличение растворенного вещества уменьшает водный потенциал клетки и заставляет воду поступать из окружающих областей путем осмоса. Увеличение объема воды в клетке вызывает увеличение давления, которое заставляет раствор сахара/воды/аминокислот двигаться к ткани-поглотителю. В ткани-поглотителе сахара выводятся из флоэмы путем активной транспортировки, которая увеличивает водный потенциал и заставляет воду вытекать из флоэмы путем осмоса. Ситовидные элементы должны поддерживать функционирующую плазматическую мембрану, чтобы помочь контролировать поток сахаров в ситовидный элемент и из него.

Растения могут использовать два различных способа для перемещения сахаров во флоэму. Симпластическая загрузка включает перемещение сахаров через плазмодесмы из одной клетки в другую. Апопластическая загрузка включает перемещение сахаров из апопласта (внеклеточного пространства клеточной стенки) через плазматическую мембрану и внутрь клетки. Это перемещение сахара против градиента концентрации осуществляется транспортерами сахара в плазматической мембране.

Другие молекулы, такие как белки и мРНК, также транспортируются по всему растению через флоэму.

При выращивании при умеренных температурах листья фотосинтезируют и вырабатывают сахарозу, полученная сахароза загружается во флоэму, откуда транспортируется к тканям-поглотителям (например, к стержневым корням). Обработка растений холодом (таких как *Beta vulgaris*) обычно приводит к обратному потоку во флоэме, то есть, ткани, которые были источниками во время фотосинтеза, становятся поглотителями, и наоборот. Например, сахароза, хранящаяся в стержневом корне после обработки холодом, обычно загружается во флоэму и транспортируется к листьям/побегам. После яровизации флоэма обычно перемещается из тканей с относительно высоким концентрациями сахарозы (например, органы запасаения) в ткани с относительно более низким концентрациями сахарозы (например, листья/побеги) для обеспечения энергией и питательными веществами стрелкования и/или цветения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, поток флоэмы дерегулируют перед стрелкованием и/или перед цветением. Соответственно, поток флоэмы от органов запасаения к органам-поглотителям может быть уменьшен, ингибирован или обращен вспять перед стрелкованием и/или перед цветением.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, поток флоэмы дерегулируют после яровизации, индуцированной низкой температурой. Соответственно, поток флоэмы от органов запасаения (например, стержневых корней) к органам-поглотителям (например, листьям и/или побегам) может быть уменьшен, ингибирован или обращен вспять после яровизации, индуцированной низкой температурой.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, поток флоэмы дерегулируют после яровизации, индуцированной низкой температурой, и перед стрелкованием, и/или перед цветением. Соответственно, поток флоэмы от органов запасаения (например, стержневых корней) к органам-поглотителям (например, листьям и/или побегам) может быть уменьшен, ингибирован или обращен вспять после яровизации, индуцированной низкой температурой, и перед стрелкованием, и/или перед цветением.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, поток флоэмы растения по настоящему изобретению не обращается вспять после обработки холодом и/или яровизации. Другими словами, растение по настоящему изобретению сохраняет ту же идентичность ткани-источника и ткани-поглотителя после обработки холодом и/или после яровизации, что и до обработки холодом, например, в то время, когда листья растения подвергались фотосинтезу. Соответственно, поток флоэмы после яровизации,

индуцированной низкой температурой, и перед стрелкованием, и/или перед цветением растения по настоящему изобретению может перемещаться от листьев и/или побегов к стержневым корням.

Используемый в настоящем документе термин "яровизация" имеет свое обычное значение в данной области техники и относится к переходу от вегетативной к генеративной фазе, индуцированному длительным периодом низкой температуры, таким как продолжительный холод зимой, или искусственно созданными условиями.

Растениям, которые были яровизированы, могут потребоваться дополнительные сигналы или рост, прежде чем у них начнется стрелкование или цветение. Стрелкование и/или цветение могут произойти неделями позже.

В одном аспекте, яровизация может относиться к воздействию на растение низкой температуры, такой как 12 °C или менее (в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, 10 °C или менее, 8 °C или менее, 6 °C или менее, 4 °C или менее, 2 °C или менее) в течение периода, по меньшей мере, один (например, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре, по меньшей мере, пять или, по меньшей мере, шесть месяцев) месяц.

Термины "холодные температуры" или "холодные условия", используемые в настоящем документе, могут относиться к температурам, которые достаточны для инициации яровизации данного растения. Соответственно, низкие температуры могут относиться к таким температурам, как 12 °C или менее (в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, 10 °C или менее, 8 °C или менее, 6 °C или менее, 4 °C или менее, 2 °C или менее). Соответственно, холодные температуры могут относиться к температурам от примерно 2 °C до примерно 12 °C, от примерно 5 °C до примерно 10 °C или от примерно от 6 °C до примерно 8 °C.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, дерегулированный поток флоэмы означает, что поток флоэмы уменьшен, ингибирован или обращен вспять относительно потока флоэмы в сравниваемом растении при тех же условиях. Соответственно, дерегулированный поток флоэмы уменьшен, ингибирован или обращен вспять относительно потока флоэмы в сравниваемом растении в холодных условиях и/или после яровизации.

В одном аспекте, поток флоэмы от тканей-поглотителей (например, стержневых корней) к тканям-источникам (например, листьям или побегам) уменьшен, ингибирован или обращен вспять, когда упомянутое растение или его часть выращивают в холодных условиях.

Используемый в настоящем документе термин "ткани-поглотители" относится к любой ткани растения, которая запасает или использует сахарозу. Как правило, поглотителями являются ткани растения с низкой осмотической концентрацией и низким давлением воды по сравнению с другими тканями растения.

В то время как растение осуществляет фотосинтез, ткани-поглотители могут включать органы запасаения, такие как корни (например, стержневые корни). При определенных условиях другие ткани, такие как листья или побеги, могут функционировать как ткани-поглотители. Например, после воздействия низких температур или после яровизации растущие ткани, такие как листья и/или побеги, требуют энергии и питательных веществ, и могут функционировать как ткани-поглотители.

Используемый в настоящем документе термин "ткани-поглотители" относится к любой ткани растения, которая продуцирует или выделяет сахарозу. Как правило, источниками являются ткани растения с областями высокой осмотической концентрации и высокого давления воды по сравнению с другими тканями растения.

Ткани-источники включают листья во время фотосинтеза, когда концентрация сахарозы относительно высока по сравнению с остальной частью растения. При определенных условиях органы запасаения, такие как корни (например, стержневые корни), могут функционировать в качестве источников. Например, стержневые корни после яровизации могут функционировать как источники, и сахароза может быть перемещена во флоэму и перераспределена в другие ткани, которые нуждаются в сахарозе, например, ткани, которым требуется энергия для стрелкования и/или цветения.

В одном аспекте, поток флоэмы от тканей-поглотителей (например, стержневых корней) к тканям-источникам (например, побегам) уменьшен.

Соответственно, поток флоэмы из тканей-поглотителей (например, стержневых корней) в ткани-источники (например, побеги) уменьшают, по меньшей мере, на 5%, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 55%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 65%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 75%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%.

Поток флоэмы может быть измерен с использованием любого известного в данной области техники способа. Например, с помощью количественного анализа радиоактивно меченой транслокации. Количественные анализы радиоактивно меченой транслокации

известны в данной области техники, например, анализы, которые описаны в работе Лью и соавт., *Journal of Experimental Botany*, том 63, выпуск 11, 28 июня 2012 г., страницы 4315-4320, которые включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Холодостойкость

Выращивание коммерческих культур в качестве озимых культур может улучшить их экономические характеристики за счет повышения урожайности. Холодостойкость является необходимым условием для успешного возделывания озимых культур. Однако низкие температуры могут также индуцировать преждевременную яровизацию и последующее раннее стрелкование и снизить урожайность, например, снизить производство сахара. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что путем дерегулирования потока флоэмы сахароза может удерживаться в тканях-поглотителях (например, стержневых корнях), и может быть улучшена холодостойкость, и/или может быть предотвращено, или ингибировано стрелкование.

Степень повреждения растений холодом или морозом зависит от ряда факторов, включая, например, чувствительность растения к температуре (например, тропические растения, как правило, не развили способность избегать внутриклеточного замораживания), скорости охлаждения и прогрева, относительную влажность воздуха, способность растительной ткани выдерживать холод, и минимальную температуру, достигаемую растительной тканью.

Используемый в настоящем документе термин "холодостойкость" относится к способности растения или его части, или растительной клетки выдерживать низкие температуры.

Соответственно, растения по настоящему изобретению проявляют меньшее повреждение тканей после воздействия низких температур по сравнению со сравниваемыми растениями (или контрольными). В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растения по настоящему изобретению имеют, по меньшей мере, на 5%, на 10%, на 15%, на 20%, на 25%, на 30%, на 35%, на 40%, на 45%, на 50%, на 55%, на 60%, на 65%, на 70%, на 75%, на 80%, на 85%, на 90%, на 95% меньше повреждений тканей после воздействия низких температур по сравнению со сравниваемым растением.

Повреждение тканей может быть измерено с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники. Например, повреждение тканей после низких температур может быть определено путем измерения высвобождения электролита из ткани (см., например, М.Б. Мюррей и соавт., *New Phytol* 1989, 113, 307-311; П.А. Клеменс и соавт., *Plant Physiol.* 2013, 63 (3): 1338-52. doi: 10.1104/стр.113.224972; и П.А.

Клеменс и *соавт.*, New Phytol. 2014, 202(1):188-97. doi: 10.1111/nph.12642.), которые включены в настоящий документ в качестве ссылки).

Поврежденные клетки не в состоянии поддерживать химический состав своего содержимого и высвободить электролиты через поврежденные мембраны. Повышенную скорость потери электролитов можно определить, поместив ткань в воду и измерив проводимость полученного раствора.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растения по настоящему изобретению имеют, по меньшей мере, на 5%, на 10%, на 15%, на 20%, на 25%, на 30%, на 35%, на 40%, на 45%, на 50%, меньшее утечки электролитов по сравнению со сравнимым растением, при этом, количественный анализ высвобождения электролита проводят при тех же условиях.

Количественный анализ высвобождения электролитов / Измерения электропроводности

Измерение электропроводности замороженной ткани листьев (как, например, применялось в работе Клеменс и *соавт.*, 2013, Клеменс и *соавт.*, 2014) оценивали у четырехнедельных растений, которые были акклиматизированы до температуры 4 °C в течение 4 дней. Один полностью развернутый лист, собранный в полдень, помещали в стеклянную пробирку, содержащую 2 мл стерильной деионизированной воды. Пробирки переносили в криостат при температуре 0 °C на 1 час с последующим охлаждением на 1 °C в час до минимальной температуры -6 °C. Замораживание воды внутри стеклянных пробирок инициировали при температуре -1 °C с помощью замороженной инокуляционной петли. Затем пробирки размораживали в течение ночи, а затем встряхивали в течение ночи на горизонтальном шейкере при температуре 4 °C. После разморозки пробирки заполняли 3 мл стерильной деионизированной воды и осторожно встряхивали еще в течение одного часа при комнатной температуре. Электропроводность каждого образца определяли количественно при комнатной температуре с помощью измерителя электропроводности LF521 (WTW, Вайльхайм, Германия) и сравнивали с общей электропроводностью после кипячения в течение 2 часов и встряхивания в течение ночи.

Соответственно, растения по настоящему изобретению могут переносить холод и/или мороз лучше, чем соответствующие сравнимые растения (или контрольные). В одном варианте осуществления настоящего изобретения, культурное растение по настоящему изобретению имеет, по меньшей мере, на 5%, на 10%, на 15%, на 20%, на 25%, на 30%, на 35%, на 40%, на 45%, на 50%, на 55%, на 60%, на 65%, на 70%, на 75%, на

80%, на 85%, на 90%, на 95% более высокую выживаемость по сравнению с культурой сравниваемых растений.

Соответственно, растения по настоящему изобретению могут выдерживать более низкие температуры без повреждения тканей или отмирания по сравнению со сравниваемым растением.

Соответственно, растения по настоящему изобретению могут выдерживать более низкие температуры в течение более длительного периода времени без повреждения тканей или отмирания по сравнению со сравниваемым растением.

Настоящее изобретение относится к способам продуцирования растений или их частей, обладающих повышенной холодостойкостью. Настоящее изобретение относится к растениям, которые проявляют повышенную холодостойкость по сравнению с уровнем холодостойкости у сравниваемых растений.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, проростки растений по настоящему изобретению, имеющие 6 или менее (например, два или четыре) настоящих листа, обладают повышенной холодостойкостью по сравнению со сравниваемыми проростками.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, проростки растений по настоящему изобретению, имеющие 6 или более (например, 8 или более) настоящих листьев, обладают повышенной холодостойкостью по сравнению со сравниваемыми проростками.

Используемый в настоящем документе термин "морозостойкость" относится к способности растения или его части, или растительной клетки выдерживать мороз. Соответственно, морозостойкость может относиться к способности растения или его части, или растительной клетки выдерживать внеклеточный лед.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, морозостойкость включает предотвращение замерзания, что относится к способности растения или его части, или растительной клетки избегать образования внеклеточного или внутриклеточного льда.

Критическая минимальная температура, которую может выдержать растение, определяется сочетанием экологических и генетических факторов. Непосредственное повреждение от мороза происходит, когда кристаллы льда образуются внутри протоплазмы клеток (внутриклеточное замораживание), тогда как косвенное повреждение может произойти, когда лед образуется внутри растений, но вне клеток (то есть, внеклеточное замораживание). На самом деле растению вредит не холодная температура, а образование льда. Считается, что образование внутриклеточного льда вызывает

механическое разрушение протоплазматической структуры. Степень повреждения, вызванного внутриклеточным замораживанием, зависит главным образом от того, насколько быстро падает температура и до какого уровня она переохлаждает перед замораживанием.

Стрелкование

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение предлагает способ предотвращения или ингибирования стрелкования растения, содержащий дерегулирование потока флоэмы в упомянутом растении (например, в растении *Beta vulgaris*) или его части.

Соответственно, растения (например, растения *Beta vulgaris*) по настоящему изобретению могут быть устойчивыми к стрелкованию.

Используемый в настоящем документе термин "стрелкование" имеет свое обычное значение в данной области техники и относится к процессу, при котором растение прекращает продуктивный рост и переключается на репродуктивный рост. Стрелкование обычно относится к первым видимым признакам образования цветоносного стебля (или стеблей), которые являются частью попытки растения произвести семена для размножения. Для получения стрелкующегося стебля растение обычно перенаправляет ресурсы с продуцирования листьев, корней или других съедобных частей. Стрелкование обычно используется в качестве предсказания формирования цветка.

Растения, у которых имеется стрелкование, как правило, дают низкий урожай, и у них вкус хуже по сравнению с растениями, у которых не имеется стрелкование.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает способы предотвращения или ингибирования стрелкования и/или цветения растения.

Термин "ингибирование стрелкования и/или цветения" растения (например, растения *Beta vulgaris*) относится к уменьшению доли растений со стрелкованием и/или формированием цветков по сравнению со сравниваемым растением, то есть, растением того же подвида или сорта на сравниваемой стадии развития, в частности, на второй стадии через год после прохождения соответствующего холодного периода, то есть, после яровизации.

Соответственно, растения по настоящему изобретению (например, растение *Beta vulgaris*) проявляют менее 80%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, менее 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% или 10%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, менее, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% или 0,1% от процента стрелкующихся растений по сравнению со сравниваемыми растениями не по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, стрелкование и/или цветение может быть по существу предотвращено или полностью предотвращено.

Термин "по существу предотвращенное" или "полностью предотвращенное" стрелкование и цветение понимается как означающий, что ингибирование составляет, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 99,5%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 99,8%, или, по меньшей мере, 99,9%, то есть, уменьшение доли стрелкующихся растений до не более 20%, не более 15% или не более 10%, не более 5%, не более 2%, не более 1% или не более 0,5%, особенно на второй год после яровизации относительно сравниваемого растения или популяции растений, то есть, растения или популяции растений того же подвида или сорта на сравниваемой стадии развития, в частности, на второй год после прохождения соответствующего холодного периода, то есть, после яровизации.

Способы

Авторы настоящего изобретения неожиданно определили, что переход потока флоэмы происходит после воздействия холодных условий, но до стрелкования, то есть, до формирования соцветия, которое будет действовать как новый орган-поглотитель, использующий ремобилизованные сахара стержневого корня.

Настоящее изобретение предлагает способы повышения холодостойкости и/или ингибирования, или предотвращения стрелкования путем дерегулирования изменения потока флоэмы, которое обычно происходит в результате обработки холодом, то есть, после яровизации и пред стрелкованием.

Путем нацеливания на активность и/или экспрессию генов, участвующих в регуляции потока флоэмы, настоящее изобретение предлагает растения с повышенной холодостойкостью и замедленным или ингибированным стрелкованием по сравнению со сравниваемыми растениями.

В одном аспекте, поток флоэмы может быть дерегулирован путем модификации активности или экспрессии генов, которые контролируют транспорт сахарозы.

В одном аспекте, поток флоэмы может быть дерегулирован путем модуляции активности или экспрессии транспортеров сахарозы. Не желая быть связанными теорией, отметим, что модификация активности или экспрессии транспортера сахарозы может увеличивать или уменьшать транспорт сахарозы из данной ткани, тем самым изменяя поток флоэмы.

"Экспрессия" гена обычно относится к уровню транскрипции. Экспрессию гена можно измерить с использованием любого известного в данной области техники способа, например, способом нозерн-блоттинга, РНК-секвенирования, гибридизации *in situ*, ДНК-микрочипов и ОТ-ПЦР. В качестве альтернативы, экспрессию гена можно измерить косвенно путем измерения уровня продукта гена, например, белка, кодируемого упомянутым геном способом вестерн-блоттинга.

"Активность" транспортеров, раскрытая в настоящем документе, относится к их способности транспортировать субстрат. Активность транспортера может быть модифицирована путем изменения его клеточной локализации, специфичности субстрата или взаимодействия с другими белками, такими как аффинность связывания для субстрата.

Активность транспортера может быть определена с помощью флуоресцентного репортера, например, молекулы субстрата с флуоресцентной меткой, и измерения транспорта с помощью микроскопии.

В одном аспекте, активность или экспрессию гена или белка измеряют относительно сравняемого продукта.

Термин "сравняемое растение" или "сравняемый продукт", как определено в настоящем документе, будет означать растение или продукт, полученный из растения (например, растения *Beta vulgaris*), которое не было модифицировано по настоящему изобретению, но у которого все другие соответствующие признаки были одинаковыми (например, вид растения, условия выращивания, способ обработки растения). Сравняемое растение или сравняемый продукт по настоящему изобретению может означать растение (например, растение *Beta vulgaris*) или его часть, такую как корень (например, стержневой корень), собранный корень (например, собранный стержневой корень) или материал для размножения растения (например, материал для размножения *Beta vulgaris*), или продукт, содержащий упомянутое растение, или его часть, получаемую или полученную из растения, которое не было модифицировано по настоящему изобретению, например, для дерегуляции потока флоэмы. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, сравняемым растением является растение, которое не проявляет дерегулированного потока флоэмы во время или после воздействия холодных условий. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, сравняемое растение не проявляет замедленного стрелкования после воздействия холодных условий.

Термин "модифицирующий" или "модифицированный", используемый в настоящем документе, означает растение (например, растение *Beta vulgaris*), которое было

модифицировано или изменено. Настоящее изобретение содержит модификацию растений с использованием методов генетической модификации растений или негенетической модификации растений. Такие способы хорошо известны в данной области техники, и примеры методов генетической модификации включают методы трансформации, трансгеники, цисгеники и редактирования генов. Примеры методов негенетической модификации включают мутагенез с помощью быстрых нейтронов, химический мутагенез, например, мутагенез, индуцированный с помощью этилметансульфоната (EMS), и современные подходы к анализу популяций.

Термин "немодифицированное растение", как определено в настоящем документе, будет означать растение (например, растение *Beta vulgaris*), которое не было модифицировано по настоящему изобретению для дерегуляции потока флоэмы, и у которого все другие соответствующие признаки были одинаковыми (например, вид растения, условия выращивания, способ обработки и так далее). В одном варианте осуществления настоящего изобретения, немодифицированное растение представляет собой растение, которое не проявляет дерегулированного потока флоэмы во время или после воздействия холодных условий. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, немодифицированное растение не проявляет замедленного стрелкования после воздействия холодных условий.

Повышение экспрессии генов

В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает способ повышения холодостойкости растения или его части, и/или предотвращения, или замедления стрелкования растения, содержащий повышение активности или экспрессии антипортера сахарозы/протона, находящегося в тонопласте запасующих вакуолей стержневого корня. Вакуолярная мембрана участвует в поглощении растворенного вещества в вакуоль и в высвобождении растворенного вещества из вакуоли. Протоны и сахара перемещаются через эту мембрану в дополнение к метаболитам и неорганическим ионам. Считается, что градиент протонов через эту мембрану приводит к накоплению и/или высвобождению сахаров. Антипортер сахарозы/протона импортирует сахарозу в вакуоль. Подходящим образом, антипортер сахарозы/протона может представлять собой связанный с протоном антипортер, способный загружать сахарозу в вакуоль. Соответственно, антипортер сахарозы/протона может происходить из *Beta vulgaris* или представлять собой гомолог последовательности *Beta vulgaris*. Соответственно, антипортер сахарозы/протона может происходить из *Arabidopsis thaliana* или представлять собой гомолог последовательности *Arabidopsis thaliana*. В одном аспекте, ген антипортера сахарозы/протона содержит:

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

б) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 2 или 8;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

д) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

е) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9.

SEQ ID № 1 соответствует последовательность генома транспортера сахара тонопласта (TST) TST2.1 из *Beta vulgaris* (BvTST2.1).

SEQ ID № 2 соответствует последовательности кДНК TST2.1 из *Beta vulgaris* (BvTST2.1).

SEQ ID № 3 соответствует аминокислотной последовательности TST2.1 из *Beta vulgaris* (BvTST2.1).

SEQ ID № 7 соответствует последовательности генома TMT1 из *Arabidopsis thaliana* (AtTMT1).

SEQ ID № 8 соответствует последовательности кДНК TMT1 из *Arabidopsis thaliana* (AtTMT1).

SEQ ID № 9 соответствует аминокислотной последовательности TMT1 из *Arabidopsis thaliana* (AtTMT1).

Не желая быть связанными теорией, отметим, что повышение экспрессии и/или активности антипортера сахарозы/протона, такого как TST2.1 или TMT1 (например, в стержневом корне), может увеличить загрузку сахарозы в вакуоль. Соответственно, повышение экспрессии и/или активности антипортера сахарозы/протона, такого как TST2.1 или TMT1 (например, в стержневом корне), может увеличить загрузку сахарозы в вакуоль, дерегулировать поток флоэмы в растении или его части и повысить холодостойкость растения или его части, и/или предотвратить или ингибировать стрелкование растения. В одном аспекте, белок антипортера сахарозы/протона:

a) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

b) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

c) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

d) представляет собой гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9.

Настоящее изобретение предлагает способ повышения холодостойкости растения или его части, и/или предотвращения, или ингибирования стрелкования растения, содержащий дерегулирование потока флоэмы в упомянутом растении или его части путем модификации упомянутого растения или его части для:

i) повышения активности или экспрессии гена, содержащего:

a) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

b) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 2 или 8;

c) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами a) или b) в жестких условиях;

d) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

e) нуклеотидную последовательность, кодирующая гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или

ii) повышения активности или экспрессии полипептида:

a) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения,

по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

b) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

с) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

d) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, антипортер сахарозы/протона содержит аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 3, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность с ней, или ее гомолог. Соответственно, антипортер сахарозы/протона содержит аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 3, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85% идентичность с ней, которая способна функционировать как антипортер сахарозы/протона тонопласта, или ее гомолог SEQ ID №3. Соответственно, гомологом SEQ ID № 3 может быть SEQ ID № 9 или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность с ней, которая способна функционировать как антипортер сахарозы/протона тонопласта.

Белок, который способен функционировать как антипортер сахарозы/протона тонопласта, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессируется в тонопласте.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, антипортер сахарозы/протона содержит аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 3, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с ней.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, антипортер сахарозы/протона содержит аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 9, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, или по меньшей мере, 99% идентичность с ней.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, антипортер сахарозы/протона кодируется полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, показанную как SEQ ID № 1, SEQ ID № 2, SEQ ID № 7 или SEQ ID № 8, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними.

Соответственно, антипортер сахарозы/протона для использования по настоящему изобретению может быть кодирован полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, показанную как SEQ ID № 1, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ней.

Соответственно, антипортер сахарозы/протона для использования по настоящему изобретению может быть кодирован полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, показанную как SEQ ID № 2, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ней.

Соответственно, антипортер сахарозы/протона для использования по настоящему изобретению может быть кодирован полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, показанную как SEQ ID № 7, или последовательность,

которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ней.

Соответственно, антипортер сахарозы/протона для использования по настоящему изобретению может быть кодирован полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, показанную как SEQ ID № 8, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ней.

Термин "повышение" (например, повышение активности или экспрессии гена), используемый в настоящем документе, означает, что активность или экспрессия гена выше по сравнению с активностью гена или экспрессией немодифицированного гена в сравниваемом продукте.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, модификацию, которая повышает активность или экспрессию антипортера сахарозы/протона тонопласта, выбирают из группы, состоящей из:

повышения, стимулирования или усиления транскрипции, трансляции или экспрессии антипортера сахарозы/протона тонопласта;

увеличения синтеза полипептида, кодируемого антипортером сахарозы/протона тонопласта; или его высвобождения из внутриклеточных запасов; или

снижения скорости деградации полипептида, кодируемого геном антипортера сахарозы/протона тонопласта.

Соответственно, способ может содержать трансформацию клетки растения (например, растения *Beta vulgaris*) с помощью генетической конструкции, которая:

i) повышает активность или экспрессию гена, содержащего:

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере

мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

b) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 2 или 8;

c) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или b) в жестких условиях;

d) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

e) нуклеотидную последовательность, кодирующая гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или

ii) повышает активность или экспрессию полипептида:

a) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

b) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

c) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% или,

по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

d) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9.

Соответственно, конструкция может содержать:

a) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

b) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 2 или 8;

c) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами a) или b) в жестких условиях;

d) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

e) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9

или содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок, который способен стимулировать или усиливать, по меньшей мере, один эндогенный антипортер сахарозы/протона тонопласта. Следует понимать, что каждый из этих вариантов приводил бы к повышенной активности и экспрессии полипептида, кодируемого геном антипортера сахарозы/протонного тонопласта. Способ может содержать регенерацию растения из трансформированной клетки.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, активность, по меньшей мере, одного гена, кодирующего антипортер сахарозы/протона тонопласта, может быть повышена путем введения (или обеспечения) мутации, по меньшей мере, в один ген, кодирующий антипортер сахарозы/протона тонопласта. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, активность, по меньшей мере, одного гена, кодирующего антипортер сахарозы/протона тонопласта, может быть повышена путем введения (или обеспечения) мутации в промоторный или энхансерный элемент, который координирует экспрессию гена. Соответственно, мутация может находиться за пределами кодирующей последовательности гена.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, антипортер сахарозы/протона тонопласта для использования по настоящему изобретению проявляет повышенную активность по сравнению с немодифицированным белком. Белок для использования по настоящему изобретению может проявлять, по меньшей мере, примерно на 5%, по меньшей мере, примерно на 10%, по меньшей мере, примерно на 20%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90%, по меньшей мере, примерно на 100%, по меньшей мере, примерно на 200%, по меньшей мере, примерно на 300%, по меньшей мере, примерно на 500%, по меньшей мере, примерно на 1000%, по меньшей мере, примерно на 2000%, по меньшей мере, примерно на 3000%, по меньшей мере, примерно на 5000%, по меньшей мере, примерно на 10 000%, по меньшей мере, примерно на 20 000%, по меньшей мере, примерно на 30 000%, по меньшей мере, примерно на 50 000% или, по меньшей мере, примерно на 100 000% больше активности по сравнению с немодифицированным антипортером сахарозы/протона тонопласта.

Соответственно, промоторная область гена может быть модифицирована для повышения экспрессии гена. Промоторы и/или энхансеры, которые координируют экспрессию гена, могут быть модифицированы для повышения экспрессии гена. В частности, ТАТА-боксы или другие активирующие мотивы в промоторе могут быть

модифицированы для повышения экспрессии гена. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, антипортер сахарозы/протона тонопласта содержит мутацию, которая делает антипортер сахарозы/протона тонопласта конститутивно активным. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, активность антипортера сахарозы/протона тонопласта может быть повышена путем сверхэкспрессии антипортера сахарозы/протона тонопласта. Соответственно, активность антипортера сахарозы/протона тонопласта может быть повышена путем обеспечения множественных копий гена антипортера сахарозы/протона тонопласта.

Соответственно, активность, по меньшей мере, одного, гена, кодирующего антипортер сахарозы/протона тонопласта, может быть повышена путем введения мутации, по меньшей мере, в один ген, кодирующий антипортер сахарозы/протона тонопласта, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9, или функциональный вариант или функциональный фрагмент, или его ортолог, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 3 или 9; или, при этом, по меньшей мере, один ген, кодирующий антипортер сахарозы/протона тонопласта, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или функциональный вариант, или функциональный фрагмент, или ортолог SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, способ повышения активности и/или экспрессии гена содержит использование активирующей промотор последовательности нуклеиновой кислоты, сконфигурированной для целевой сайт-специфичной инсерции в

промотор-реципиент, контролирующей экспрессию представляющей интерес молекулы нуклеиновой кислоты в клетке или организме, при этом, промотор, активирующий последовательность нуклеиновой кислоты, вызывает повышенную экспрессию представляющей интерес молекулы нуклеиновой кислоты посредством сайт-специфичной инсерции, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, представляющая интерес молекула нуклеиновой кислоты является гетерологичной или нативной для промотора-реципиента и/или представляет собой эндогенную, или экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты для клетки или организма.

Такие способы описаны в EP 3 546 582, который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

Снижение экспрессии генов

В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает способ повышения холодостойкости растения или его части и/или предотвращения, или замедления стрелкования растения, содержащий снижение активности или экспрессии белка, который опосредует отток сахарозы, например, симпортера сахарозы/протона, или белка, экспортирующего сахарозу, например, белки SWEET. Соответственно, белок может происходить из *Beta vulgaris* или являться гомологом последовательности *Beta vulgaris*. Соответственно, белок может происходить из *Arabidopsis thaliana* или являться гомологом последовательности *Arabidopsis thaliana*.

Вакуолярная мембрана участвует в поглощении растворенного вещества в вакуоль и в высвобождении растворенного вещества из вакуоли. Протоны и сахара перемещаются через эту мембрану в дополнение к метаболитам и неорганическим ионам. Считается, что градиент протонов через эту мембрану приводит к накоплению и/или высвобождению сахаров. Симпортеры сахарозы/протона, такие как BvSUT4 (SEQ ID № 6) и AtSUC4 (SEQ ID № 12), катализируют связанный с протоном экспорт сахарозы из вакуоли. Транспортёры сахарозы, такие как белки SWEET (SEQ ID № 15 и SEQ ID № 18), экспортируют сахарозу. SEQ ID № 10 соответствует нуклеотидной последовательности SUC4 из *Arabidopsis thaliana* (AtSUC4).

SEQ ID № 11 соответствует последовательности кДНК SUC4 из *Arabidopsis thaliana* (AtSUC4).

SEQ ID № 12 соответствует аминокислотной последовательности e SUC4 из *Arabidopsis thaliana* (AtSUC4).

SEQ ID № 4 соответствует последовательности генома SUT4 из *Beta vulgaris* (BvSUT4).

SEQ ID № 5 соответствует последовательности кДНК SUT4 из *Beta vulgaris* (BvSUT4).

SEQ ID № 6 соответствует аминокислотной последовательности SUT4 из *Beta vulgaris* (BvSUT4).

Не желая быть связанными теорией, отметим, что снижение экспрессии и/или активности симпортера сахарозы/протона, такого как BvSUT4 или AtSUC4 (например, в стержневом корне), может снизить экспорт сахарозы из вакуоли. Соответственно, снижение экспрессии и/или активности симпортера сахарозы/протона, такого как BvSUT4 или AtSUC4 (например, в стержневом корне), может снизить экспорт сахарозы из вакуоли,

дерегулировать поток флоэмы в растении или его части и повысить холодостойкость растения или его части, и/или предотвратить или ингибировать стрелкование растения.

SEQ ID № 13 соответствует первой последовательности генома SWEET из *Beta vulgaris* (BvSWEET).

SEQ ID № 14 соответствует первой последовательности кДНК SWEET из *Beta vulgaris* (BvSWEET).

SEQ ID № 15 соответствует первой аминокислотной последовательности SWEET из *Beta vulgaris* (BvSWEET).

SEQ ID № 16 соответствует второй геномной последовательности SWEET из *Beta vulgaris* (BvSWEET).

SEQ ID № 17 соответствует второй последовательности кДНК SWEET из *Beta vulgaris* (BvSWEET).

SEQ ID № 18 соответствует второй аминокислотной последовательности SWEET из *Beta vulgaris* (BvSWEET).

Не желая быть связанными теорией, отметим, что снижение экспрессии и/или активности унипортера сахарозы, например, белка SWEET, такого как SEQ ID № 15 или SEQ ID № 18, может ингибировать выгрузку сахарозы из флоэмы, что приводит к накоплению сахарозы во флоэме. Соответственно, снижение экспрессии и/или активности унипортера сахарозы, например, белка SWEET, такого как, SEQ ID № 15 или SEQ ID № 18, может ингибировать выгрузку сахарозы из флоэмы, что приводит к накоплению сахарозы во флоэме, дерегулированию потока флоэмы в растении или его части и к повышению холодостойкости растения или его части, и/или к предотвращению, или ингибированию стрелкования растения.

В одном аспекте ген, активность или экспрессия которого снижена, содержит:

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

б) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 5, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере,

90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 5, 11, 14 или 17;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

д) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

е) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18.

В одном аспекте, белок, активность или экспрессия которого снижена:

а) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

б) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

с) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

d) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18.

Настоящее изобретение предлагает способ повышения холодостойкости растения или его части, и/или предотвращения, или ингибирования стрелкования растения, содержащий дерегулирование потока флоэмы в упомянутом растении или его части путем модификации упомянутого растения или его части для:

i) снижения активности или экспрессии гена, содержащего:

a) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

b) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 5, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 5, 11, 14 или 17;

c) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами a) или b) в жестких условиях;

d) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

e) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18; или

ii) снижения активности или экспрессии полипептида:

a) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

b) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

c) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

d) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, белок, активность или экспрессия которого снижена, содержит аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, или по меньшей мере, 99% идентичность с ней, или ее гомологом. Соответственно, антипортер сахарозы/протона содержит аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, или последовательность, которая содержит, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99% идентичность с ней, которая способна

функционировать как антипортер сахарозы/протона тонопласта, или гомологом SEQ ID №6. Соответственно, гомологом SEQ ID № 6 может быть SEQ ID № 12 или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99% идентичность с ней, которая способна функционировать как симпортер сахарозы/протона.

Белок, который способен функционировать как симпортер сахарозы/протона, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессируется в тонопласте.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, симпортер сахарозы/протона содержит аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность с ней.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, симпортер сахарозы/протона содержит аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 12, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, или по меньшей мере, 99% идентичность с ней.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, симпортер сахарозы/протона кодируется полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, показанную как SEQ ID № 4, SEQ ID № 5, SEQ ID № 10 или SEQ ID № 11, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними.

Соответственно, симпортер сахарозы/протона для использования по настоящему изобретению может быть кодирован полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, показанную как SEQ ID № 4, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ней.

Соответственно, антипортер сахарозы/протона для использования по настоящему изобретению может быть кодирован полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, показанную как SEQ ID № 5, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ней.

Соответственно, антипортер сахарозы/протона для использования по настоящему изобретению может быть кодирован полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, показанную как SEQ ID № 10, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ней.

Соответственно, антипортер сахарозы/протона для использования по настоящему изобретению может быть кодирован полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, показанную как SEQ ID № 11, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ней.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, белок, активность или экспрессия которого снижена, содержит аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 15, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере,

80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99% идентичность с ней, или ее гомологом. Соответственно, белок SWEET содержит аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 15, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичную с ней, которая способна выгружать сахарозу из флоэмы в побеге, или с гомологом SEQ ID №15. Соответственно, гомологом SEQ ID № 15 может быть SEQ ID № 18 или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99% идентичность с ней, которая способна выгружать сахарозу из флоэмы побега.

Белок, который способен выгружать сахарозу из флоэмы побега, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессируется в побегах.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, белок SWEET содержит аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99% идентичность с ней.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, симпортер сахарозы/протона содержит аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99% идентичность с ней.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, белок SWEET кодируется полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, показанную как SEQ ID № 13, SEQ ID №14, SEQ ID № 16 или SEQ ID № 17, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в

предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними.

Соответственно, белок SWEET для использования по настоящему изобретению может кодироваться полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, показанную как SEQ ID № 13, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ней.

Соответственно, белок SWEET для использования по настоящему изобретению может кодироваться полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, показанную как SEQ ID № 14, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ней.

Соответственно, белок SWEET для использования по настоящему изобретению может кодироваться полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, показанную как SEQ ID № 16, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ней.

Соответственно, белок SWEET для использования по настоящему изобретению может кодироваться полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, показанную как SEQ ID № 17, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере

мере, 96%, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ней.

Используемый в настоящем документе термин "ингибирование" (например, ингибирование активности или экспрессии гена) означает, что активность или экспрессия гена ниже или снижена по сравнению с активностью гена или экспрессией гена в сравниваемом продукте.

В некоторых вариантах осуществления настоящего документа, активность или экспрессия гена может быть модулирована (то есть, повышена или снижена), по меньшей мере, примерно на 10%, 20%, 30% или 40%, соответственно, по меньшей мере, примерно на 50%, 60%, 70%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, примерно на 80%, 90%, 95% или 100% по сравнению с активностью или экспрессией гена в растении (например, в растении *Beta vulgaris*), которое не было модифицировано по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, активность или экспрессия гена может быть модулирована (то есть, повышена), по меньшей мере, примерно на 200%, 300% или 500%, соответственно, по меньшей мере, примерно на 1000%, 2000%, 3000% или 5000%, более подходяще, по меньшей мере, примерно на 10000%, 20000%, 30000%, 50000% или 100000% по сравнению с активностью или экспрессией гена в растении (например, в растении *Beta vulgaris*), которое не было модифицировано по настоящему изобретению.

Соответственно, экспрессия или активность гена, содержащего нуклеотидную последовательность, как указано в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или их варианты, как определено в настоящем документе, может быть уменьшена, частично инактивирована, ингибирована, элиминирована, нокаутирована или утрачена таким образом, что экспрессия белка или функция белка не поддается обнаружению.

В одном аспекте, ген, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или их варианты нокаутированы. Другими словами, ген, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или их варианты были полностью выведены из строя.

Любой известный в данной области способ снижения или предотвращения экспрессии, или активности белка может быть использован в способах по настоящему изобретению.

В качестве примера, настоящий способ может содержать:

- обеспечение мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, показанную как SEQ

ID № 6, 12, 15 или 18, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними;

- обеспечение мутации в регуляторной области (например, промоторе или энхансере), которая содействует контролю экспрессии белка, содержащего аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними;

- обеспечение антисмысловой РНК, малой интерферирующей РНК или микроРНК, которая снижает уровень последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, содержащий аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или аминокислотную последовательность, которая содержит, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними.

Каждый из вышеуказанных подходов приводит к снижению или предотвращению экспрессии или активности белка, содержащего аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними.

Используемый в настоящем документе термин "мутация" охватывает естественный генетический вариант или сконструированный вариант. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, термин "мутация" относится к изменению в

нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, или в аминокислотной последовательности по сравнению с последовательностью, показанной как SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, мутация вызывает дерегуляцию потока флоэмы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, способ по настоящему изобретению может содержать введение последовательности нуклеиновой кислоты в растение или его часть, или растительную клетку, при этом, упомянутая нуклеиновая кислота приводит к снижению или элиминации экспрессии, или активности белка, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или их варианту, описанному в настоящем документе. Соответственно, указанная последовательность нуклеиновой кислоты может быть введена в растение или его часть, или клетку. Соответственно, последовательность эндогенной нуклеиновой кислоты в растении или его части, или клетке может быть модифицирована по настоящему изобретению (например, путем редактирования генов).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, все SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или их варианты, описанные в настоящем документе, могут быть модифицированы, например, ингибированы или мутированы.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растение или растительная клетка по настоящему изобретению является гомозиготной. Соответственно, растение или растительная клетка может быть гомозиготной для модификации, например, ингибирования или мутации.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, никакой эндогенный белок (или эндогенный и функциональный белок) не присутствует в растении по настоящему изобретению. Если присутствует какой-либо эндогенный белок, то он, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, находится в неактивной форме.

В одном варианте осуществления, способ по настоящему изобретению может содержать введение мутации в последовательность нуклеиновой кислоты, показанной как SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или в последовательность нуклеиновой кислоты,

которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с ними.

Мутация может изменять геном растения таким образом, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, содержит аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая содержит, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18 полностью или частично удаляется, или иным образом ее делают нефункциональной.

Мутация может прерывать последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними.

Прерывание может привести к тому, что последовательность нуклеиновой кислоты не будет транскрибирована и/или транслирована.

Последовательность нуклеиновой кислоты может быть прервана, например, путем удаления или иной модификации старт-кодона ATG последовательности нуклеиновой кислоты таким образом, что трансляция белка уменьшается или предотвращается.

Последовательность нуклеиновой кислоты может содержать, по меньшей мере, одно изменение нуклеотидов, которые снижают или предотвращают экспрессию белка, или влияют на миграцию белка. Например, экспрессия белка может быть снижена или

предотвращена введением, по меньшей мере, одного преждевременного стоп-кодона, сдвига рамки, сплайсинговой мутации или непереносимой аминокислотной замены в открытой рамке считывания.

Преждевременный стоп-кодон относится к мутации, которая вводит стоп-кодон в открытую рамку считывания и предотвращает трансляцию всей аминокислотной последовательности. Преждевременным стоп-кодоном может быть кодон TAG ("янтарь"), TAA ("охра") или TGA ("опал" или "умбра").

Мутация со сдвигом рамки (также называемая ошибкой кадрирования или сдвигом рамки считывания) представляет собой мутацию, вызванную инсерционно-делеционным полиморфизмом (инсерциями или делециями) ряда нуклеотидов в последовательности нуклеиновой кислоты, которая не делится на три. Из-за триплетной природы экспрессии генов кодонами, инсерция или делеция может изменить рамку считывания, что приведет к трансляции, совершенно отличной от оригинала. Мутация со сдвигом рамки часто приводит к считыванию кодонов после мутации для кодирования разных аминокислот. Мутация со сдвигом рамки обычно приводит к введению преждевременного стоп-кодона.

Сплайсинговая мутация вставляет, удаляет или изменяет ряд нуклеотидов в специфичном сайте, в котором происходит сплайсинг во время процессинга мРНК в зрелую мРНК. Делеция сайта сплайсинга приводит к тому, что в зрелой мРНК остается, по меньшей мере, один интрон, что может привести к образованию аномальных белков.

Непереносимая аминокислотная замена относится к мутации, которая вызывает несинонимичную аминокислотную замену в белке, что приводит к сниженной или удаленной функции белка.

Любой известный в данной области техники способ введения мутации в последовательность нуклеиновой кислоты может быть использован в способе по настоящему изобретению. Например, может быть использована гомологичная рекомбинация, при которой создается вектор, в котором соответствующая последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты мутирует и используются для трансформации растений или растительных клеток. Затем могут быть выбраны рекомбинантные растения или растительные клетки, экспрессирующие мутированную последовательность.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, мутация вводит непереносимую аминокислотную замену в белке, содержащем аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей

мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, мутация снижает активность белка по отношению к белку, показанному как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательности, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, мутация не изменяет уровень или экспрессию, но снижает активность белка по отношению к белку, показанному как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательности, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18.

Экспрессию белка можно измерить путем измерения присутствия белка с использованием антитела, специфичного для белка, например, методом вестерн-блоттинга. Активность транспортера может быть измерена с использованием количественного анализа на основе флуоресценции и микроскопии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, белок может содержать мутацию, которая снижает его активность или экспрессию. Соответственно, мутация может изменять клеточную локализацию белка, например, может предотвращать экспрессию транспортера в мембране. Соответственно, мутация может изменять аффинность транспортера для его субстрата.

Мутация может быть делецией, сплайсинговой мутацией или кодоном, кодирующим непереносимую аминокислотную замену.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты может быть полностью или частично удалена. Удаление может быть непрерывным или может содержать множество участков последовательности. Делеция, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, удаляет достаточное количество нуклеотидной последовательности, так что последовательность нуклеиновой кислоты больше не кодирует функциональный белок. Делеция может быть

полной, и в этом случае 100% кодирующей части последовательности нуклеиновой кислоты отсутствует по сравнению с соответствующим геномом сравниваемого немодифицированного растения. Делеция может, например, удалить, по меньшей мере, 50, 60, 70, 80 или 90% кодирующей части последовательности нуклеиновой кислоты. Соответственно, по меньшей мере, часть белка может быть удалена. Делеция может, например, удалить, по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% кодирующей части белка.

Делеция может удалить, по меньшей мере, часть трансмембранного домена.

Делеция может, например, удалить, по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% трансмембранного домена.

Соответственно, делеция может удалить, по меньшей мере, 50 аминокислот, по меньшей мере, 100 аминокислот, по меньшей мере, 150, по меньшей мере, 200, по меньшей мере, 250 аминокислот из белка. Соответственно, делеция может удалить, по меньшей мере, 50 аминокислот, по меньшей мере, 100 аминокислот, по меньшей мере, 150, по меньшей мере, 200, по меньшей мере, 250 аминокислот из белка.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, делеция может удалить, по меньшей мере, 100 аминокислот, по меньшей мере, 150, по меньшей мере, 200, по меньшей мере, 250, по меньшей мере, 300, по меньшей мере, 350 аминокислот с С-конца белка.

Соответственно, мутированный белок может представлять собой усеченный белок, в котором отсутствует, по меньшей мере, примерно 100 аминокислот, по меньшей мере, примерно 150, по меньшей мере, примерно 200, по меньшей мере, примерно 250, по меньшей мере, примерно 300, по меньшей мере, примерно 350 аминокислот, соответствующих аминокислотам с С-конца SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательности, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними.

Делеция может удалить, по меньшей мере, часть активного сайта белка. Делеция может удалить активный сайт белка.

Способы делеции последовательностей нуклеиновых кислот в растениях известны в данной области техники. Например, может быть использована гомологичная рекомбинация, при которой создается вектор, в котором отсутствует соответствующая последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты, и используется для

трансформации растений или растительных клеток. Затем могут быть выбраны рекомбинантные растения или растительные клетки, экспрессирующие новую часть последовательности.

Модификация последовательности нуклеиновой кислоты может быть выполнена с использованием методов направленного мутагенеза (также именуемых направленным обменом нуклеотидов (TNE) или олиго-направленным мутагенезом (ODM)). Методы направленного мутагенеза включают, без ограничения, методы, использующие нуклеазы цинкового пальца, TALEN (см. WO2011/072246 и WO2010/079430), Cas9-подобную, Cas9/крПНК/трансактивирующую крПНК, Cas9/гПНК или другие системы CRISPR (см. WO 2014/071006 и WO2014/093622), мегануклеазы (см. WO2007/047859 и WO2009/059195), или методы направленного мутагенеза, использующие мутагенные олигонуклеотиды, возможно, содержащие химически модифицированные нуклеотиды для усиления мутагенеза с комплементарностью последовательности гену, в протопластах растений (например, KeyBase® или TALEN).

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, системы мутагенеза, такие как TILLING (таргетирование индуцированных локальных поражений в геномах; МакКаллум *и соавт.*, 2000, Nat Biotech 18:455, и МакКаллум *и соавт.* 2000, Plant Physiol. 123, 439-442, оба включены в настоящий документ в качестве ссылки) могут быть использованы для генерирования линий растений, которые содержат ген, кодирующий белок, имеющий мутацию. В методе TILLING используется традиционный химический мутагенез (например, мутагенез, индуцированный с помощью этилметансульфоната (EMS), который продуцирует случайные мутации) с последующим высокопроизводительным скринингом на наличие мутаций. Таким образом, могут быть получены растения, семена, клетки и ткани, содержащие ген, имеющий желаемую мутацию.

Способ может содержать этапы мутагенеза семян растений (например, мутагенез EMS), объединение отдельных растений или ДНК, ПЦР-амплификацию интересующей области, образование гетеродуплекса и высокопроизводительную детекцию, идентификацию мутантного растения, секвенирование мутантного продукта ПЦР. При этом понимается, что другие методы мутагенеза и селекции могут быть в равной степени использованы для получения таких модифицированных растений. Семена могут, например, подвергаться облучению или химической обработке, а растения могут подвергаться скринингу на наличие модифицированного фенотипа.

Делеционный мутагенез с помощью быстрых нейтронов может быть использован для обратной генетики (то есть, с помощью ПЦР) для идентификации линий растений,

несущих делецию в эндогенном гене. См., например, Охшима *и соавт.* (1998) *Virology* 213: 472-481; Окубара *и соавт.* (1994) *Genetics* 137:867-874; и Кесада *и соавт.* (2000) *Genetics* 154:421-4315, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки.

В другом подходе, доминантные мутанты могут быть использованы для запуска сайленсинга РНК из-за инверсии гена и рекомбинации дублированного локуса гена. См., например, Кусаба *и соавт.* (2003) *Plant Cell* 15: 1455-1467 (включено в настоящий документ в качестве ссылки).

Модифицированные растения можно отличить от немодифицированных растений, то есть, растений дикого типа, с помощью молекулярных методов, таких как мутация (мутации), присутствующая в ДНК, и модифицированные фенотипические характеристики. Модифицированные растения могут быть гомозиготными или гетерозиготными для модификации. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, модифицированные растения являются гомозиготными для модификации.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, способ снижения или предотвращения экспрессии белка, содержащего аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними и не содержит обработку растения химическим веществом (например, агрохимикатом).

Другие способы снижения или предотвращения экспрессии, или активности будут очевидны специалисту в данной области техники и включают использование индуцированного вирусом сайленсинга генов (VIGS), сайленсинга микроРНК, РНКи, антисмысловых инсерций, инсерций тДНК или доминантных негативных конструкций (или антиморфных мутаций).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессия белка, содержащего аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность

последовательности с ними, может быть снижена или элиминирована путем индуцированного вирусом сайленсинга генов.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессия белка, содержащего аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними, может быть снижена или элиминирована посредством микроРНК.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессия белка, содержащего аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними, могут быть снижена или элиминирована посредством РНКи.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессия белка, содержащего аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними, может быть снижена или элиминирована путем антисмысловой супрессии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессия белка, содержащего аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность

последовательности с ними, может быть снижена или элиминирована путем смысловой супрессии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессия белка, содержащего аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними, может быть снижена или элиминирована путем инсерций тДНК.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессия белка, содержащего аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними, может быть снижена или элиминирована путем доминантно-негативных конструкций (или антиморфных мутаций).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессия белка, содержащего аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними, может быть снижена или элиминирована с помощью системы, основанной на направленном мутагенезе.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессия белка, содержащего аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере

мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними, может быть снижена или элиминирована с помощью систем, основанной на CRISPR.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессия белка, содержащего аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с ними, может быть снижена или элиминирована с помощью нуклеазы цинкового пальца, TALEN, мегануклеаз, мутагенных олигонуклеотидов или TILLING.

КОММЕРЧЕСКИ ЖЕЛАТЕЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растения по настоящему изобретению имеют дерегулированный поток флоэмы, в то время как другие коммерчески желательные признаки, по меньшей мере, сохраняются.

В частности, урожайность растения по настоящему изобретению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, не снижается по сравнению со сравнимым растением, которое не было модифицировано по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления, растения по настоящему изобретению продуцируют органы запасаания, аналогичные по размеру и/или качеству со сравнимыми растениям, которые не были модифицированы по настоящему изобретению.

Термин "коммерчески желательные признаки", используемый в настоящем документе, будет включать такие признаки, как урожайность, покрытие пологом, высота зрелых растений, качество (например, качество собранных корней), устойчивость к абиотическим (например, засухоустойчивость) стрессам, устойчивость к гербицидам и/или устойчивость к биотическим (например, насекомым, бактериям или грибам) стрессам.

В одном аспекте, растение (например, *Beta vulgaris*) по настоящему изобретению имеет выход от 50% до 150%, от 55% до 145%, от 60% до 140%, от 65% до 135%, от 70% до 130%, от 75% до 125%, от 80% до 120%, от 85% до 115%, от 90% до 110%, от 95% до 105%, от 50% до 100%, от 55% до 100%, от 60% до 100%, от 65% до 100%, от 70% до

100%, от 75% до 100%, от 80% до 100%, от 85% до 100%, от 90% до 100%, от 95% до 100%, от 100% до 150%, от 105% до 150%, от 110% до 150%, от 115% до 150%, от 120% до 150%, от 125% до 150%, от 130% до 150%, от 135% до 150%, от 140% до 150% или от 145% до 150% урожая по сравнению со сравниваемым растением при выращивании в аналогичных полевых условиях.

В другом аспекте, урожайность растения (например, *Beta vulgaris*) по настоящему изобретению составляет приблизительно или, по меньшей мере, в 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, или в 3,0 раза больше, чем урожайность сравниваемого растения при выращивании в аналогичных полевых условиях.

В одном аспекте, урожайность растения (например, *Beta vulgaris*) по настоящему изобретению составляет приблизительно, по меньшей мере, 20 тонн с гектара, по меньшей мере, 30 тонн с гектара, по меньшей мере, 40 тонн с гектара, по меньшей мере, 50 тонн с гектара, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 60 тонн с гектара, например, по меньшей мере, 65, по меньшей мере, 70, по меньшей мере, 75, по меньшей мере, 80, по меньшей мере, 85, по меньшей мере, 90 тонн или, по меньшей мере, 100 тонн с гектара.

СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

Настоящее изобретение предлагает способ продуцирования холодостойкого растения и/или растения с замедленным или ингибированным стрелкованием, содержащий скрещивание растения-донора, содержащего аллель, ассоциированный с дерегулированным потоком флоэмы, с растением-реципиентом, которое обладает коммерчески желательными признаками.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение предлагает способ продуцирования холодостойкого растения и/или растения с замедленным или ингибированным стрелкованием, содержащий скрещивание растения-донора, содержащего аллель, ассоциированный с дерегулированным потоком флоэмы, при этом, упомянутый аллель содержит полинуклеотидную последовательность, содержащую:

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

b) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17;

c) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами a) или b) в жестких условиях;

d) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18;

e) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18; или

f) аллель по любому из пунктов a), b), c), d) или e);

с растением-реципиентом, обладающим коммерчески желательными признаками.

Способ продуцирования растения может содержать выполнение ПЦР для идентификации аллеля, ассоциированного с дерегулированным потоком флоэмы. Соответственно, способ может содержать выполнение ПЦР для идентификации аллеля, содержащего:

a) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

b) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17, или нуклеотидную

последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или b) в жестких условиях;

d) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18;

e) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18; или

f) аллель по любому из пунктов а), b), c), d) или e);

в полученном потомстве.

РАСТЕНИЯ

Термин "растение" по настоящему изобретению включает целые растения или части такого целого растения. Целые растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, представляют собой семенные растения или культурное растение. "Части растения" представляют собой, например, вегетативные органы/структуры побега, например, листья, стебли и клубни; корни, цветки и цветковые органы/структуры, например, прицветники, чашелистики, лепестки, тычинки, плодолистики, пыльники и семяпочки; семя, включая зародыш, эндосперм и семенную оболочку; плод и зрелую завязь; растительную ткань, например, сосудистую ткань, покровную ткань и тому подобное; и клетки, например, устьичные клетки, яйцеклетки, пыльцу, трихомы и тому подобное; и их потомство.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) является или происходит из однодольного растения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) является или получено из двудольного растения.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) является или получено из сахароносной культуры. Соответственно, сахароносной культурой может быть сахарная свёкла, сахарный тростник, сахарная пальма или сахарное сорго.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) относится к семейству *Amaranthaceae*. Соответственно, растение (или его часть, или растительная клетка) может происходить из подсемейства *Betoideae*. Подсемейство *Betoideae* включает несколько групп сортов, таких как сахарная свёкла, обыкновенная свёкла или столовая свёкла, мангольд или листовая свёкла и кормовая свёкла, которая является кормовой культурой.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) относится к роду *Beta*. Род *Beta* содержит такие важные культуры, как сахарная свёкла, мангольд, обыкновенная свёкла и кормовая свёкла.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) относится к виду *Beta vulgaris*.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) относится к подвиду *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*.

Термин "*Beta vulgaris*" или "*Расщепление Beta vulgaris*" понимается как относящийся к растению рода

Beta vulgaris, например *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var *altissima* (сахарная свекла в узком смысле), *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (приморская свекла), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var *vulgaris* (мангольд), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var *conditiva* (красная свекла / свекла), *Beta vulgaris* ssp. *eras sa vulgaris* var / *alba* (кормовая свекла).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) относится к семейству *Poaceae*.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) относится к роду *Sorghum*. Род *Sorghum* содержит важные культуры, такие как культивируемое *Sorghum bicolor* (двухцветное сорго), которое используется в пищу в качестве зерна и в сиропе из сорго или патоке из сорго. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) относится к виду *Sorghum bicolor*.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) относится к роду *Saccharum*. Род *Saccharum* содержит важные культуры, такие как сорта сахарного тростника.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) относится к виду *Saccharum officinarum*.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) относится к семейству *Arecaceae*.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) относится к роду *Arenga*. Род *Arenga* содержит важные культуры, такие как сорта сахарной пальмы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) относится к виду *Arenga saccharifera* или *Arenga pinnata*.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) относится к семейству *Sapindaceae*.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) относится к роду *Acer*. Род *Acer* содержит важные культуры, такие как сорта сахарного клена.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть, или растительная клетка) относится к виду *Acer saccharum*.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение (или его часть или растительная клетка) является или получено из культурного растения, такого как корнеплод (включая настоящие корни, такие как стержневые корни и клубневидные корни, и не корни, такие как луковицы, клубнелуковицы, корневища и клубни).

Соответственно, культурное растение может иметь стержневой корень. Соответственно, культурное растение может быть выбрано из: *Arracacia xanthorrhiza* (аргасача), *Beta vulgaris* (свёкла и кормовая свёкла), *Brassica* spp. (брюква и репа), *Bunium persicum* (чернушка посевная), лопух (*Arctium*, семейство *Asteraceae*), морковь (*Daucus carota* subsp. *sativus*), сельдерей (*Apium graveolens rapaceum*), дайкон (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus*), одуванчик (*Taraxacum*) spp., *Lepidium meyenii* (мака), *Microseris lanceolata* (ромашка мурнонг или ямс), *Pachyrhizus* spp. (хикама и ахипа), пастернак (*Pastinaca sativa*), *Petroselinum* spp. (корень петрушки), редис (*Raphanus sativus*), *Scorzonera hispanica* (скорцонера испанская), *Sium sisarum* (поручейник сахарный), *Tragopogon* spp. (козлобородник) и *Vigna lanceolata* (кустовая морковь или кустовой картофель).

Соответственно, культурное растение может иметь клубневидный корень. Соответственно, культурное растение может быть выбрано из: *Amorphophallus galbra* (желтая лилия ямс), *Conopodium majus* (гикори гладкий или земляной каштан), *Dioscorea polystachya* (нагаймо, китайский ямс, корейский ямс, горный ямс), *Hornstedtia scottiana* (природный имбирь), *Ipomoea batatas* (сладкий картофель), *Ipomoea costata* (пустынный

ямс), *Manihot esculenta* (кассава или юка, или маниока), *Mirabilis expansa* (маука или чаго), *Psoralea esculenta* (псоралея съедобная, типсин или степная репа) и *Smallanthus sonchifolius* (якон),

Соответственно, культурное растение может образовывать клубни. Соответственно, культурное растение может быть выбрано из: *Apios americana* (зигаденус жилистый или земляной орех), *Cyperus esculentus* (земляной миндаль или чуфа), *Dioscorea* spp. (ямс, сладкий картофель лилового цвета), *Dioscorea polystachya* (китайский ямс, белое название или белое название), *Helianthus tuberosus* (артишок иерусалимский или топинамбур), *Hemerocallis* spp. (лилейник), *Lathyrus tuberosus* (чина клубеньковая), *Oxalis tuberosa* (ока или новозеландский ямс), *Plectranthus edulis* и *P. esculentus* (кембили, дазо и другие), *Solanum tuberosum* (картофель), *Stachys affinis* (китайский артишок или кросне), *Tropaeolum tuberosum* (машуа или аньо) и *Ulucus tuberosus* (уллюко).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, материал для размножения растений может быть получен (или получен) из растения по настоящему изобретению.

Используемый в настоящем документе термин "материал для размножения растений" относится к любому растительному материалу, взятому из растения, из которого могут быть продуцированы другие растения. Соответственно, материал для размножения растений может быть выбран из семени, каллусов растений и маточных корневищ растений. Подходящим материалом для размножения растений может быть семя. Подходящим материалом для размножения растений могут быть каллусы растений. Подходящим материалом для размножения растений могут быть маточные корневища растений.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растительная клетка, растение, часть растения и/или материал для размножения растения могут быть получены (например, получены) способом по настоящему изобретению.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растение или его часть, или растительная клетка представляет собой растение или его часть, или растительную клетку *Beta vulgaris*. В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растение или его часть, или растительная клетка представляет собой растение или его часть, или растительную клетку *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*.

ПРОДУКТЫ

Настоящее изобретение также предлагает продукты, которые можно получить или получены из растений по настоящему изобретению.

Продукт, который можно получить или получен из растения по настоящему изобретению, может представлять собой материал для размножения растений. Другой продукт, который можно получить или получен из растения по настоящему изобретению, может представлять собой собранный корень.

Соответственно, собранный корень может быть использован в последующем применении, таком как обработка.

Сахар обычно получают из стружки сахарной свеклы в процессе экстракции водой. Затем экстракт можно обработать оксидом кальция для осаждения растительных кислот, таких как щавелевая кислота или винная кислота, и белков. Избыток извести отделяют введением углекислого газа. Путем последующего выпаривания воды из сахарного раствора в вакууме получают сиропобразный раствор. Кристаллизирующийся сахар отделяют от оставшегося коричневого сиропа центрифугированием. Остаток, патоку, используют в качестве корма для крупного рогатого скота или используют для спиртового брожения. Очистка сахара (рафинирование) осуществляют путем перекристаллизации, фильтрации и выпаривания в вакууме. Кроме того, сахарную свеклу можно использовать также для производства биогаза или биоэтанола.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает использование растения или его части, или растительной клетки по настоящему изобретению для производства пищевого продукта, такого как сахар, сироп из сахарной свеклы, патока или напитков. Соответственно, растение или его часть, или растительная клетка по настоящему изобретению могут быть использованы для производства сахара (например, рафинированного сахара). Соответственно, растение или его часть, или растительная клетка по настоящему изобретению могут быть использованы для производства сиропа из сахарной свеклы. Соответственно, растение или его часть, или растительная клетка по настоящему изобретению могут быть использованы для производства патоки. Соответственно, растение или его часть, или растительная клетка по настоящему изобретению могут быть использованы для производства корма для животных. Соответственно, растение или его часть, или растительная клетка по настоящему изобретению могут быть использованы для производства напитков (например, алкогольных напитков).

ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ/ПОЛИПЕПТИДЫ/КОНСТРУКЦИИ

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, конструкции, которые модулируют (то есть, повышают или снижают) активность или экспрессию, по меньшей мере, одного гена, как определено в настоящем документе, могут быть трансформированы в растительные клетки, соответственно, направляемые промотором.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предложены конструкции, которые:

i) повышения активности или экспрессии гена, содержащего:

a) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

b) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 2 или 8;

c) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

d) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

e) нуклеотидную последовательность, кодирующая гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или

ii) повышения активности или экспрессии полипептида:

a) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере

мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

b) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

c) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

d) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения, предложены конструкции, которые:

i) снижают (то есть, ингибируют) активность или экспрессию гена, содержащего:

a) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

b) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 5, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 5, 11, 14 или 17;

c) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или b) в жестких условиях;

d) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

e) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18; или

ii) снижения активности или экспрессии полипептида:

a) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

b) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом a) в жестких условиях;

c) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92% или, по меньшей мере, 94%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

d) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18,

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, указанные конструкции трансформируются в растительные клетки, направляемые промотором. Например, генетическая конструкция может представлять собой конструкцию для редактирования генов или может содержать молекулу РНКи, которая может содержать

молекулу малой интерферирующей РНК (миРНК) или молекулу короткошпилечной (кшРНК).

Конструкции могут быть введены в растения в соответствии с настоящим изобретением с помощью подходящего вектора, например, с помощью векторов трансформации растений. Вектор трансформации растений может содержать кассету экспрессии, содержащую 5'-3' в направлении транскрипции, промоторную последовательность, последовательность конструкции, нацеленную на ген, и, необязательно, 3' нетранслируемую терминирующую последовательность, включающую стоп-сигнал для РНК-полимеразы и сигнал полиаденилирования для полиаденилазы. Промоторная последовательность может присутствовать, по меньшей мере, в одной копии, и такие копии могут быть идентичными или вариантами промоторной последовательности, как описано выше. Терминирующая последовательность может быть получена из растительных, бактериальных или вирусных генов. Подходящими терминирующими последовательностями являются, например, терминирующая последовательность *rbcS E9* гороха, терминирующая последовательность *nos*, полученная из гена *ноналинсинтазы Agrobacterium tumefaciens*, и *терминирующая последовательность 35S* вируса мозаики цветной капусты. Специалисту в данной области техники будут вполне понятны другие подходящие терминирующие последовательности.

Конструкция по настоящему изобретению может также содержать механизм, усиливающий экспрессию гена, для увеличения силы промотора. Примером такого элемента-усилителя является элемент, полученный из части промотора гена *пластоцианина* гороха, и который является объектом Международной патентной заявки № WO 97/20056, который включен в настоящий документ в качестве ссылки. Подходящими элементами-усилителями могут быть, например, элемент-усилитель *nos*, полученный из гена *ноналинсинтазы Agrobacterium tumefaciens*, и элемент-усилитель *35S*, полученный из вируса мозаики цветной капусты.

Эти регуляторные области могут быть получены из того же гена, что и промоторная последовательность ДНК, или могут быть получены из разных генов, из *Beta vulgaris* или других организмов. Все регуляторные области должны быть способны функционировать в клетках ткани, подлежащей трансформации.

Последовательность ДНК промотора может быть получена из того же гена, что и интересующий ген, например, ген, который промотор собирается направить, или может быть получена из другого гена, из *Beta vulgaris* или другого организма.

Кассета экспрессии может быть включена в основной вектор трансформации растений, такой как *pBIN 19 Plus*, *pBI 101*, *pKYLX71:35S2*, *pCAMBIA2300* или другие

подходящие векторы трансформации растений, известные в данной области техники. В дополнение к cassette экспрессии, вектор трансформации растения будет содержать такие последовательности, которые необходимы для процесса трансформации. Они могут включать гены *Agrobacterium vir*, по меньшей мере, одну граничную последовательность Т-ДНК и селектируемый маркер или другие средства идентификации трансгенных растительных клеток.

Термин "вектор экспрессии или вектор трансформации растения" означает конструкцию, способную к экспрессии *in vivo* или *in vitro*. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, вектор экспрессии включен в геном организма. В одном варианте осуществления, вектор по настоящему изобретению экспрессирует белок, например, белок TST2.1 или TMT1, описанный в настоящем документе. Термин "включенный", в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, охватывает стабильное включение в геном.

Способы трансформации растений хорошо известны в данной области техники и включают, например, трансформацию, опосредованную *агробактериями*. Основным принципом создания генетически модифицированных растений является введение генетической информации в геном растения таким образом, чтобы обеспечить стабильное сохранение введенного генетического материала. Обзор общих методов можно найти в статьях Потрикус (*Annu Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol* [1991] 42:205-225) и Кристон (*AgroFood-Industry Hi-Tech* март/апрель 1994 17-27), которые включены в настоящий документ в качестве ссылки. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, трансформацию и регенерацию сахарной свеклы осуществляют способом, описанным Линдси (Линдси К. (1991) "Регенерация и трансформация

сахарной свеклы посредством *Agrobacterium tumefaciens*" Руководство по культуре тканей растений В7: 1-13, издательство Kluwer Academic Publishers, которое включено в настоящий документ в качестве ссылки).

Как правило, при трансформации, *опосредованной агробактериями*, бинарный вектор, несущий интересующую чужеродную ДНК, то есть, конструкцию по настоящему изобретению, переносят из соответствующего штамма *Agrobacterium* в растение-мишень путем совместного культивирования *Agrobacterium* с эксплантами из растения-мишени. Трансформированную растительную ткань затем регенерируют на селективной среде, которая содержит селектируемый маркер и гормоны роста растений. Альтернативой является способ погружения цветков (Клаф и Бент, 1998 *Plant J.* 1998 декабрь; 16(6):735-43, который включен в настоящий документ в качестве ссылки), при котором цветочные почки интактного растения приводятся в контакт с суспензией штамма *Agrobacterium*,

содержащей химерный ген, и после посева семян, трансформированные отдельные растения проращивают и идентифицируют путем выращивания на селективных средах. Непосредственное заражение тканей растений *Agrobacterium* является простым способом, который широко используется и который описан в работе Бутчер Д.Н. *и соавт.*, (1980), *Способы культивирования тканей для фитопатологов*, под ред.: Д.С. Ингрэмс и Дж.П. Хелгесон, 203-208, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки.

Другие подходящие способы трансформации включают, например, прямой перенос генов в протопласты с использованием методов полиэтиленгликоля или электропорации, бомбардировку частицами, микроинъекцию и использование волокон из карбида кремния. Трансформированные растения, использующие баллистическую трансформацию, включая метод усов из карбида кремния, описаны в работе Фрейм Б.Р., Брайтон П.Р., Бэгнолл С.В., Льюноу К. Дж., Буллок В.П., Уилсон Х.М., Данвелл Дж.М., Томпсон Дж.А. и Ван К. (1994), которая включена в настоящий документ в качестве ссылки. Продуцирование фертильных трансгенных растений кукурузы путем трансформации, опосредованной усами из карбида кремния, описано в *The Plant Journal* 6: 941-948, которое включено в настоящий документ в качестве ссылки), а методы вирусной трансформации описаны, например, в работе Мейер П., Хайдманн И. и Ниденхоф И. (1992), которая включена в настоящий документ в качестве ссылки. Использование вируса мозаики кассавы в качестве векторной системы для растений описано в *Gene* 110: 213-217, которое включено в настоящий документ в качестве ссылки. Дополнительные методы по трансформации растений можно найти в EP-A-0449375, включенной в настоящий документ в качестве ссылки.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к векторной системе, которая несет конструкцию и вводит ее в геном организма, такого как растение, в данном случае в растение *Beta vulgaris*. Векторная система может содержать один вектор, но она может содержать и два вектора. В случае двух векторов, векторная система обычно называется бинарной векторной системой. Бинарные векторные системы описаны более подробно в Gynheung Anetal, (1980), Бинарные векторы, *Руководство по молекулярной биологии растений* А3, 1-19, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки.

Одна широко используемая система для трансформации растительных клеток использует плазмиду Ti из *Agrobacterium tumefaciens* или плазмиду Ri из *Agrobacterium rhizogenes*, описанная Эн *и соавт.*, (1986), *Plant Physiol.* 81, 301-305 и Бутчер Д.Н. *и соавт.*, (1980), *Способы культивирования тканей для фитопатологов*, под ред.: Д.С. Ингрэмс и Дж.П. Хелгесон, 203-208, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки. После каждого способа введения желательного экзогенного гена по настоящему

изобретению в растения, может потребоваться присутствие и/или инсерция дополнительных последовательностей ДНК. Использование Т-ДНК для трансформации растительных клеток интенсивно изучалось и описано в патенте EP-A-120516; Хукема, в работе: Система бинарных векторов растений, Offset-drukkerij Кантерс Б.Б., Амстердам, 1985, глава V; Фрейли и соавт., *Crit. Rev. Plant Sci.*, 4:1-46; и Анетал., *EMBO J* (1985) 4:277-284, включенных в настоящий документ в качестве ссылки.

Растительные клетки, трансформированные конструкцией (конструкциями), которая модулирует активность или экспрессию белка, описанных в настоящем документе, можно выращивать и поддерживать в соответствии с хорошо известными способами культивирования тканей, такими как культивирование клеток в подходящей культуральной среде, снабженной необходимыми факторами роста, такими как аминокислоты, растительные гормоны, витамины, и так далее.

Термин "трансгенное растение" применительно к настоящему изобретению включает любое растение, которое содержит конструкцию, которая модулирует активность или экспрессию гена по настоящему изобретению. Соответственно, трансгенное растение представляет собой растение, которое было трансформировано конструкцией по настоящему изобретению. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, трансгенное растение проявляет дерегулированный поток флоэмы в холодных условиях или после яровизации. Термин "трансгенное растение" не охватывает нативные нуклеотидные кодирующие последовательности в их естественной среде, когда они находятся под контролем своего нативного промотора, который также находится в своей естественной среде.

В одном аспекте, нуклеотидная последовательность, ген, конструкция, вектор трансформации растений или растительная клетка по настоящему изобретению находятся в выделенной форме. Термин "выделенный" означает, что нуклеотидная последовательность, ген, конструкция, вектор трансформации растений или растительная клетка, по меньшей мере, по существу, не имеют, по меньшей мере, одного другого компонента, с которым последовательность естественным образом ассоциирована в природе и встречается в природе.

В одном аспекте, нуклеотидная последовательность, ген, конструкция, вектор трансформации растений или растительная клетка по настоящему изобретению находятся в очищенной форме. Термин "очищенный" означает в относительно чистом состоянии, например, по меньшей мере, примерно 90% чистоты, или, по меньшей мере, примерно 95% чистоты, или, по меньшей мере, примерно 98% чистоты.

Термин "нуклеотидная последовательность", используемый в настоящем документе, относится к олигонуклеотидной последовательности или полинуклеотидной последовательности и к варианту, гомологам, фрагментам и их производным (таким как, их части). Нуклеотидная последовательность может быть геномного, синтетического или рекомбинантного происхождения, которая может быть двухцепочечной или одноцепочечной, независимо от того, представляет ли она смысловую или антисмысловую цепь.

Термин "нуклеотидная последовательность" применительно к настоящему изобретению включает геномную ДНК, кДНК, синтетическую ДНК и РНК. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, он означает ДНК, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, последовательность кДНК, кодирующую в соответствии с настоящим изобретением.

Аминокислоты, упомянутые в настоящем документе, использованы с названием аминокислоты, трехбуквенным сокращением или однобуквенным сокращением. Термин "белок", используемый в настоящем документе, включает белки, полипептиды и пептиды. Используемый в настоящем документе термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "полипептид" и/или термина "белок". В некоторых случаях, термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "пептид". В некоторых случаях, термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "фермент".

В настоящем описании и в формуле изобретения могут использоваться обычные однобуквенные и трехбуквенные коды для аминокислотных остатков. Трехбуквенный код аминокислот определен в соответствии с Объединенной комиссией IUPACIUB по биохимической номенклатуре (JCBN). Также следует понимать, что полипептид может кодироваться более чем одной нуклеотидной последовательностью из-за вырожденности генетического кода.

В некоторых случаях, нуклеотидная последовательность для использования по настоящему изобретению функционально связана с регуляторной последовательностью, которая способна обеспечивать экспрессию нуклеотидной последовательности, например, выбранной клеткой-хозяином. В качестве примера, настоящее изобретение охватывает вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, как описано в настоящем документе, функционально связанную с такой регуляторной последовательностью, то есть, вектор является вектором экспрессии.

Термин "функционально связанный" относится к смежному положению, при котором описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им

функционировать по назначению. Регуляторную последовательность, "функционально связанную" с кодирующей последовательностью, лигируют таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с контрольными последовательностями.

Термин "регуляторные последовательности" включает промоторы и энхансеры, и другие сигналы регуляции экспрессии. Термин "промотор" используется в обычном смысле, принятом в этой области техники, например, сайт связывания РНК-полимеразы. Нуклеотидная последовательность в конструкции, которая кодирует ген, может быть функционально связана, по меньшей мере, с промотором.

Термин "конструкция", который является синонимом таких терминов, как "кассета" или "вектор", включает нуклеотидную последовательность для использования по настоящему изобретению, прямо или косвенно присоединенную к промотору.

Примером непрямого присоединения является предоставление подходящей спейсерной группы, такой как интронная последовательность, такая как Sh1-интрон или ADH-интрон, между промотором и нуклеотидной последовательностью по настоящему изобретению. То же самое относится и к термину "слитый", используемому в настоящем изобретении, который включает прямое или косвенное присоединение. В некоторых случаях, термины не охватывают естественную комбинацию нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, обычно ассоциированный с промотором гена дикого типа, и когда они оба находятся в своей естественной среде. Конструкция может даже содержать или экспрессировать маркер, который позволяет осуществлять выбор генетической конструкции.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, промотор может быть выбран из группы, состоящей из: конститутивного промотора, тканеспецифичного промотора, регулируемого развитием промотора и индуцируемого промотора.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, промотор может быть конститутивным промотором.

Конститутивный промотор направляет экспрессию гена в различные части растения непрерывно во время развития растения, хотя ген может не экспрессироваться на одном и том же уровне во всех типах клеток. Примеры известных конститутивных промоторов включают промоторы, ассоциированные с транскриптом 35S вируса мозаики цветной капусты (Оделл Дж.Т., Нейги Ф., Чуа Н.Х. (1985). Идентификация последовательностей ДНК, требующихся для активности промотора 35S вируса мозаики цветной капусты. *Nature*. 313 810-2), ген актина риса 1 (Чжан В., Макэлрой Д., Ву Р. (1991). Анализ активности 5'-области Act1 риса в трансгенных растениях риса. *Plant Cell* 3

1155-65) и ген убиквитина 1 кукурузы (Корнехо М.Дж., Лут Д., Бланкеншип К.М., Андерсон О.Д., Блечл А.Е. (1993). Активность промотора убиквитина кукурузы в трансгенном рисе. *Plant Molec. Biol.* 23 567-81). Конститутивные промоторы, такие как промотор вируса кольцевой гравировки гвоздики (CERV) (Халл Р., Сэдлер Дж., Лонгстафф М.(1986) (CaMV/35S), промотор 35S вируса мозаики норичника. Последовательность ДНК вируса кольцевой гравировки гвоздики: сравнение с вирусом мозаики цветной капусты и ретровирусами. *Журнал EMBO*, 5 (2): 3083-3090).

Конститутивный промотор может быть выбран из: промотора вируса кольцевой гравировки гвоздики (CERV), вируса мозаики цветной капусты (промотор CaMV 35S), промотора гена актина 1 риса или гена убиквитина 1 кукурузы.

Промотор может быть тканеспецифичным промотором. Тканеспецифичный промотор представляет собой промотор, который направляет экспрессию гена в одной (или нескольких) частях растения, обычно на протяжении всей жизни этих частей растения. Категория тканеспецифичных промоторов обычно также включает промоторы, специфичность которых не является абсолютной, то есть, они также могут направлять экспрессию на более низком уровне в тканях, отличных от предпочтительной ткани. Тканеспецифичные промоторы включают промотор фазеолина, промотор легумина b4, *usp*-промотор, промотор *sbr*, промотор ST-LS1, B33 (промотор пататина класса I). В настоящем изобретении могут быть использованы и другие промоторы, которые показывает повышенную специфичность к органу запасаения сахарозы или к его частям, то есть, которые активны, в частности, в этом органе запасаения сахарозы или в его частях. Для сахарной свеклы промотором может быть, например, специфичный для корня или стержневого корня промотор. Специалист в данной области техники знает о них из предшествующего уровня техники: WO02/40687, Олтманнс, Х. *и соавт.* (2006) *Planta* 224: 485-495, Но, Сил А *и соавт.* (2012) *Трансгенные исследования* 21: 265-278. Для сахарного тростника, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, могут быть использованы промоторы, специфичные для стебля, такие как промоторы, которые известны из работы Гошу Абраха, Цион. "Выделение и характеристика специфичного для стебля промоторного элемента из сахарного тростника", дисс. Стелленбос: Стелленбосский университет, 2005. Говендер, К. "Специфические для ствольных клеток промоторы из сорго и кукурузы для использования в сахарном тростнике", дисс. Стелленбос: Стелленбосский университет, 2008; и Мадж, С.Р. *и соавт.* (2013) *Журнал Plant Biotechnology* 1: 502-509).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, предпочтительным тканеспецифичным промотором является специфичный для стержневого корня промотор.

Соответственно, специфичным для стержневого корня промотором может быть промотор 2-1-48. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, тканеспецифичным промотором для использования в настоящем изобретении является трансспецифичный промотор, представленный в SEQ ID № 19, или его вариант, имеющий, по меньшей мере, 80% идентичность последовательности с ним, при условии, что указанный вариант способен направлять экспрессию в ткань стержневого корня.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, промотор может представлять собой регулируемый развитием промотор.

Регулируемый развитием промотор направляет изменение экспрессии гена, по меньшей мере, в одной части растения в определенное время во время развития растения. Ген может экспрессироваться в этой части растения в другое время на другом (обычно более низком) уровне, а также может экспрессироваться в других частях растения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, промотор может представлять собой индуцируемый промотор.

Индуцируемый промотор способен направлять экспрессию гена в ответ на индуктор. В отсутствие индуктора ген не будет экспрессироваться. Индуктор может воздействовать непосредственно на промоторную последовательность или может действовать путем противодействия эффекту молекулы-репрессора. Индуктор может представлять собой химический агент, такой как метаболит, белок, регулятор роста (такой как ауксин и салициловая кислота, которые активируют промотор OCS), или токсичный элемент, физиологический стресс, такой как тепло, свет (такой как промотор SSU сои), повреждение (например, pos, промотор нопалинсинтазы), или осмотическое давление, или косвенное следствие действия патогена или вредителя. Регулируемый развитием промотор может быть описан как специфический тип индуцируемого промотора, отвечающего на эндогенный индуктор, продуцированный растением, или на экологический стимул в определенный момент жизненного цикла растения. Примеры известных индуцируемых промоторов включают промоторы, ассоциированные с ответом на повреждения, такие как описаны Уорнер С.А., Скотт Р., Дрейпер Дж. ((1993) Журнал Plant 3 191-201), с ответом на температуру, как описано Бенфей и Чуа (1989) (Бенфей, П.Н., and Чуа, Н.Х. ((1989) Science 244 174-181), и химически индуцированные, как описано в работе Гатц ((1995) Methods in Cell Biol. 50 411-424).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая либо белок, который обладает специфическими свойствами для дерегуляции потока флоэмы, как определено в настоящем документе, либо белок, который подходит для модификации, может быть идентифицирована и/или выделена, и/или очищена из любой клетки или организма,

продуцирующего упомянутый белок. В данной области техники хорошо известны различные способы идентификации и/или выделения, и/или очистки нуклеотидных последовательностей. В качестве примера, методы ПЦР-амплификации для получения большего количества последовательностей могут быть использованы после того, как подходящая последовательность была идентифицирована и/или выделена, и/или очищена.

В другой альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, нуклеотидная последовательность может быть получена синтетическим путем с помощью установленных стандартных способов, например фосфоамидитным способом, описанным Бейкаж С.Л. *и соавт.*, (1981) *Tetrahedron Letters* 22, стр. 1859-1869, который включен в настоящий документ в качестве ссылки, или способом, описанным Маттес *и соавт.*, (1984) *Журнал ЕМВО*. 3, стр. 801-805, который включен в настоящий документ в качестве ссылки. В фосфоамидитном способе синтезируют олигонуклеотиды, например, в автоматическом синтезаторе ДНК, очищают, отжигают, лигируют и клонируют в соответствующих векторах.

Настоящее изобретение также охватывает использование последовательностей, имеющих степень идентичности последовательности или гомологии последовательности с аминокислотной последовательностью (последовательностями) полипептида, имеющего определенные в настоящем документе специфические свойства, или любой нуклеотидной последовательности, кодирующей такой полипептид (далее именуемой "гомологичной последовательностью (последовательностями)"). В настоящем документе термин "гомолог" означает объект, имеющий определенную гомологию с соответствующими аминокислотными последовательностями и соответствующими нуклеотидными последовательностями. В настоящем документе термин "гомология" может быть приравнен к термину "идентичность".

Гомологичная аминокислотная последовательность и/или нуклеотидная последовательность, и/или фрагменты должны обеспечивать и/или кодировать полипептид, который сохраняет функциональную активность и/или усиливает активность гена. Например, гомолог транспортера сахарозы будет функционировать как транспортер сахарозы, а гомолог антипортера сахарозы/протона будет функционировать как антипортер сахарозы/протона. Как правило, гомологичные последовательности будут содержать те же активные сайты и так далее, что и, например, соответствующая аминокислотная последовательность, или будут кодировать те же активные сайты. Хотя гомологию также можно рассматривать в рамках сходства (то есть, аминокислотных остатков, имеющих сходные химические свойства/функции), в контексте настоящего изобретения предпочтительно выражать гомологию в рамках идентичности

последовательности. Гомологичные последовательности обычно сохраняют функциональные домены или мотивы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, гомологичная последовательность включает аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность, которая имеет одно, два или несколько добавлений, делеций и/или замен по сравнению с рассматриваемой последовательностью.

ИДЕНТИЧНОСТЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Сравнение идентичности последовательностей может быть проведено визуально или, что более обычно, с помощью всегда доступных программ сравнения последовательностей. Эти коммерчески доступные компьютерные программы могут вычислять % гомологии между, по меньшей мере, двумя последовательностями. % гомологии или % идентичности могут быть вычислены по смежным последовательностям, то есть, одна последовательность выровнена с другой последовательностью, и каждая аминокислота в одной последовательности непосредственно сравнивается с соответствующей аминокислотой в другой последовательности, по одному остатку за раз. Это называется выравниванием "без гэпов". Как правило, такие выравнивания без гэпов выполняются только на относительно небольшом количестве остатков.

Хотя это очень простой и последовательный способ, он не учитывает, что, например, в идентичной в остальном паре последовательностей одна инсерция или делеция приведет к нарушению выравнивания следующих аминокислотных остатков, что потенциально может привести к значительному снижению % гомологии при выполнении глобального выравнивания. Следовательно, большинство способов сравнения последовательностей разработаны для получения оптимальных выравниваний, которые учитывают возможные инсерции и делеции без чрезмерного снижения общей оценки гомологии. Это достигается путем вставки "гэпов" в выравнивании последовательностей, чтобы попытаться максимизировать локальную гомологию.

Однако эти более сложные способы назначаются "штрафы за гэпы" каждому гэпу, возникающему в выравнивании, так что для того же количества идентичных аминокислот выравнивание последовательностей с как можно меньшим количеством гэпов, что отражает более высокую степень родства между двумя сравниваемыми последовательностями, даст более высокую оценку, чем выравнивание последовательностей с большим количеством гэпов. Обычно используются "затраты на аффинные гэпы", которые взимают относительно высокую стоимость за существование гэпа и меньший штраф за каждый последующий остаток в гэпе. Это наиболее часто используемая система подсчета гэпов. Высокие штрафы за гэпы, конечно, приведут к

оптимальным выравниваниям с меньшим количеством гэпов. Большинство программ выравнивания позволяют модифицировать штрафы за гэпы. Однако при использовании такого программного обеспечения для сравнения последовательностей предпочтительно использовать значения по умолчанию.

Таким образом, расчет максимального % гомологии в первую очередь требует получения оптимального выравнивания с учетом штрафов за гэпы. Подходящей компьютерной программой для проведения такого выравнивания является Vector NTI (Invitrogen Corp.). Примеры программного обеспечения, которое может выполнять сравнение последовательностей, включают, но не ограничиваются ими, пакет BLAST (см. *Осубельи соавт.* 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4-е издание - глава 18), BLAST 2 (см. FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 и tatiana@ncbi.nlm.nih.gov), FASTA (Альтшульи *соавт.* 1990 J. Mol. Biol. 403-410) и AlignX, например. По меньшей мере, BLAST, BLAST 2 и FASTA доступны для оффлайн и онлайн поиска (см. *Осубельи соавт.* 1999, стр. от 7-58 до 7-60).

Хотя конечный % гомологии может быть измерен в рамках идентичности, сам процесс выравнивания обычно не основан на сравнении пар по принципу "все или ничего". Вместо этого обычно используется масштабированная матрица оценки сходства, которая присваивает оценки каждому попарному сравнению на основе химического сходства или эволюционного расстояния. Примером такой матрицы, обычно используемой, является матрица BLOSUM62, которая представляет собой матрицу по умолчанию для пакета программ BLAST. Векторные программы NTI обычно используют либо общедоступные значения по умолчанию, либо пользовательскую таблицу сравнения символов, если она прилагается (дополнительные сведения см. в руководстве пользователя). Для некоторых применений, предпочтительно использовать значения по умолчанию для пакета Vector NTI.

В качестве альтернативы, проценты гомологии могут быть рассчитаны с использованием функции множественного выравнивания в Vector NTI (Invitrogen Corp.), основанной на алгоритме, аналогичном CLUSTAL (Хиггинс Д.Г. и Шарп П.М. (1988), Gene 73(1), 237-244). Как только программное обеспечение произведет оптимальное выравнивание, можно вычислить % гомологии, предпочтительно % идентичности последовательности. Программное обеспечение обычно делает это как часть сравнения последовательностей и генерирует числовой результат.

Если при определении идентичности последовательностей используются штрафы за гэпы, то для попарного выравнивания предпочтительно использовать следующие параметры:

ДЛЯ BLAST	
ОТКРЫТИЕ ГЭПА	0
ПРОДЛЕНИЕ ГЭПА	0

ДЛЯ CLUSTAL	ДНК	БЕЛОК	
ДЛИНА СЕГМЕНТА	2	1	тройной К
ШТРАФ ЗА ГЭП	15	10	
ПРОДЛЕНИЕ ГЭПА	6,66	0,1	

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, CLUSTAL может использоваться с установленным штрафом за гэп и продление гэпа, как определено выше. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, штрафы за гэпы, используемые для выравнивания по BLAST или CLUSTAL, могут отличаться от штрафов за гэпы, которые описаны выше. Специалисту в данной области техники будет понятно, что стандартные параметры для выполнения выравниваний по BLAST и CLUSTAL могут периодически меняться, и он сможет выбрать соответствующие параметры на основе стандартных параметров, детализированных для алгоритмов выравнивания по BLAST или CLUSTAL на этот момент.

Соответственно, степень идентичности в отношении нуклеотидной последовательности определяют, по меньшей мере, по 50 смежным нуклеотидам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по 60 смежным нуклеотидам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по 70 смежным нуклеотидам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по 80 смежным нуклеотидам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по 90 смежным нуклеотидам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по 100 смежным нуклеотидам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по 150 смежным нуклеотидам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по 200 смежным нуклеотидам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по 250 смежным нуклеотидам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по 300 смежным нуклеотидам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по 350 смежным нуклеотидам, в

предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по меньшей мере, по 400 смежным нуклеотидам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по меньшей мере, по 450 смежным нуклеотидам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по меньшей мере, по 500 смежным нуклеотидам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по 550 смежным нуклеотидам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по 600 смежным нуклеотидам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по 650 смежным нуклеотидам или в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, по меньшей мере, по 700 смежным нуклеотидам.

Соответственно, степень идентичности в отношении нуклеотида, кДНК, cds или аминокислотной последовательности может быть определена для всей последовательности.

Последовательности также могут иметь делеции, инсерции или замены аминокислотных остатков, которые продуцируют молчащее изменение и приводят к функционально эквивалентному веществу. Преднамеренные аминокислотные замены можно делать на основе сходства полярности, заряда, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природы остатков до тех пор, пока сохраняется вторичная связывающая активность вещества. Например, отрицательно заряженные аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту; положительно заряженные аминокислоты включают лизин и аргинин; а аминокислоты с незаряженными полярными концевыми группами, имеющими аналогичные значения гидрофильности, включают лейцин, изолейцин, валин, глицин, аланин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, фенилаланин и тирозин.

Могут быть сделаны консервативные замены, например, в соответствии с приведенной ниже Таблицей. Аминокислоты в одном и том же блоке во второй колонке и предпочтительно в одной и той же строке в третьей колонке могут быть заменены друг на друга:

АЛИФАТИЧЕСКИЙ	Неполярный	G A P
		I L V
	Полярный – незаряженный	C S T M
		N Q
	Полярный – заряженный	D E

		К Р
АРОМАТИЧЕСКИЙ		Н F W Y

Настоящее изобретение также охватывает гомологичную замену (в настоящем документе и замена, и замещение используются для обозначения взаимной замены существующего аминокислотного остатка альтернативным остатком), которая может иметь место, то есть, равноценную замену, такую как основное на основное, кислотное на кислотное, полярное на полярное и так далее. Также может происходить негомологичная замена, то есть, с одного класса остатков в другой или, альтернативно, с включением неприродных аминокислот, таких как, орнитин (далее именуемый Z), диаминомасляная кислота орнитин (далее именуемый В), норлейцин орнитин (далее именуемый О), пириилаланин, тиенилаланин, нафтилаланин и фенилглицин.

Замещения, которые также могут быть произведены неприродными аминокислотами, включают; альфа* и альфа-дизамененные* аминокислоты, N-алкил аминокислоты*, молочную кислоту*, галогенидные производные природных аминокислот, такие как трифтортирозин*, p-Cl-фенилаланин*, p-Br-фенилаланин*, p-I-фенилаланин*, L-аллилглицин*, β-аланин*, L-α-аминомасляная кислота*, L-γ-аминомасляная кислота*, L-α-аминоизомасляная кислота*, L-ε-аминокапроновая кислота[#], 7-аминогептановая кислота*, L-метионинсульфон^{#*}, L-норлейцин*, L-норвалин*, п-нитро-L-фенилаланин*, L-гидроксипролин[#], L-тиопролин*, метильные производные фенилаланина (Phe), такие как, 4-метил-Phe*, пентаметил-Phe*, L-Phe (4-амино)[#], L-Тур (метил)*, L-Phe (4-изопропил)*, L-Tic (1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновая кислота)*, L-диаминопропионовая кислота[#] и L-Phe (4-бензил)*. Обозначение * было использовано для цели обсуждения, приведенной выше (относится к гомологичной или негомологичной замене), чтобы указать гидрофобную природу производного, тогда как # было использовано для указания гидрофильной природы производного, #* указывает на амфипатические характеристики.

Варианты аминокислотных последовательностей могут включать подходящие спейсерные группы, которые могут быть вставлены между любыми двумя аминокислотными остатками последовательности, включая алкильные группы, такие как метильные, этильные или пропильные группы, в дополнение к аминокислотным спейсерам, таким как остатки глицина или β-аланина. Другая форма вариации включает присутствие, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка в пептоидной форме, что будет хорошо понятно специалистам в данной области техники. Во избежание сомнений, "пептоидная форма" используется для обозначения вариантов аминокислотных остатков,

при этом, α -углерод замененная группа находится на атоме азота остатка, а не на α -углероде. Способы получения пептидов в пептоидной форме известны в данной области техники, например, Саймон Р.Дж. *и соавт.*, *PNAS* (1992) 89(20), 9367-9371 и Хорвелл Д.К. *Trends Biotechnol.* (1995) 13(4), 132-134.

Нуклеотидные последовательности, используемые в настоящем изобретении, могут включать синтетические или модифицированные нуклеотиды. В данной области техники известно несколько различных типов модификации олигонуклеотидов. Они включают метилфосфонатный и фосфоротиоатный остовы и/или добавление акридиновых или полилизиновых цепей на 3' и/или 5' концах молекулы. Для целей настоящего изобретения следует понимать, что нуклеотидные последовательности, описанные в настоящем документе, могут быть модифицированы любым доступным в данной области техники способом. Такие модификации могут быть осуществлены для того, чтобы повысить активность или продолжительность жизни нуклеотидных последовательностей по настоящему изобретению *in vivo*.

Настоящее изобретение также охватывает последовательности, которые комплементарны последовательностям нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, или последовательности, которые способны к гибридизации либо с последовательностями по настоящему изобретению, либо с последовательностями, которые комплементарны им. Термин "гибридизация", используемый в настоящем документе, должен включать "процесс, посредством которого цепь нуклеиновой кислоты соединяется с комплементарной цепью посредством спаривания оснований", а также процесс амплификации, осуществляемый по технологиям полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Термины "гибридизирование" и "гибридизация" относятся к процессу, в котором одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты добавляется к цепи нуклеиновой кислоты, которая комплементарна в максимально возможной степени, то есть, вступает в спаривание оснований. Стандартные способы гибридизации описаны, например, в работе Сэмбрук *и соавт.* 2001. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 85%, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% оснований молекулы нуклеиновой кислоты вступают в спаривание оснований с цепью нуклеиновой кислоты, которая комплементарна в максимально возможной степени. Возможность такого добавления зависит от жесткости условий гибридизации. Термин "жесткость" относится к условиям гибридизации. Высокая степень жесткости присутствует, когда спаривание оснований усложняется; низкая

степень жесткости присутствует, если спаривание оснований упрощается. Например, жесткость условий гибридизации зависит от концентрации соли или силы ионов и температуры. В целом, жесткость может быть увеличена путем повышения температуры и/или уменьшения содержания соли. Под термином "жесткие условия гибридизации" в настоящем документе подразумеваются условия, при которых гибридизация преимущественно происходит только между гомологичными молекулами нуклеиновой кислоты. Термин "условия гибридизации", таким образом, относится не только к условиям, преобладающим при фактическом добавлении нуклеиновых кислот, но также и к условиям, преобладающим на последующих этапах промывки. Жесткими условиями гибридизации являются, например, условия, при которых гибридизируются преимущественно только те молекулы нуклеиновых кислот, которые имеют, по меньшей мере, 80%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% идентичность последовательностей. Жесткими условиями гибридизации являются, например, гибридизация в $4\times\text{SSC}$ (додецилсульфат натрия) при температуре $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ и последующая повторная промывка в $0,1\times\text{SSC}$ при температуре $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ в общей сложности в течение примерно 1 часа. Используемый в настоящем документе термин "жесткие условия гибридизации" может также означать гибридизацию при температуре $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ в $0,25$ моль/л фосфате натрия, pH 7,2, 7% SDS, 1 ммоль ЭДТА и 1% BSA (бычий сывороточный альбумин) в течение 16 часов и последующую двукратную промывку $2\times\text{SSC}$ и 0,1% SDS при температуре 68°C . В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, гибридизация происходит в жестких условиях.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист средней квалификации в данной области техники, к которой относится данное изобретение. Синглтон, *и соавт.*, СЛОВАРЬ МИКРОБИОЛОГИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ, 20 ИЗД., John Wiley and Sons, Нью-Йорк (1994), и Хейл и Мархэм, БИОЛОГИЧЕСКИЙ СЛОВАРЬ ХАРПЕРА КОЛЛИНЗА, Харпер Коллинз, Нью-Йорк (1991) предоставляют специалисту в данной области техники общий словарь многих терминов, используемых в настоящем изобретении.

Это изобретение не ограничивается описанными в настоящем документе примерами способов и материалов, и любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы на практике или при испытании вариантов осуществления этого изобретения. Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, любые

последовательности нуклеиновых кислот записываются слева направо в ориентации от 5' до 3'; аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от amino до карбокси, соответственно.

Заголовки, представленные в настоящем документе, не являются ограничениями различных аспектов или вариантов осуществления этого изобретения, которые могут быть получены посредством ссылки на описание изобретения в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определяются посредством ссылки на описание изобретения в целом.

Другие определения терминов могут содержаться в целом в описании изобретения. Прежде чем примеры вариантов осуществления настоящего изобретения будут описаны более подробно, следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретными описанными вариантами его осуществления, поскольку они, конечно, могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения и не является ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Там, где указан диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение с точностью до десятой доли единицы нижнего предела, если контекст явно не указывает иное, между верхним и нижним пределами этого диапазона, также конкретно раскрывается. Каждый меньший диапазон между любым указанным значением или промежуточным значением в указанном диапазоне и любым другим указанным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне охватывается настоящим изобретением. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться или исключаться из диапазона, и каждый диапазон, в котором либо, ни один или оба предела не включены в меньшие диапазоны, также охватывается данным описанием с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, то диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включены в это изобретение.

Следует отметить, что используемые в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа "a", "an" и "the" включают ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает иное. Таким образом, например, ссылка на "ген" или "фермент" включает множество таких агентов-кандидатов и их эквивалентов, известных специалистам в данной области техники, и так далее.

ПРЕИМУЩЕСТВА

Авторы настоящего изобретения неожиданно определили, что переход потока флоэмы происходит после воздействия низких температур (например, после яровизации), но до стрелкования, то есть, до формирования соцветия, которое будет действовать как новый орган-поглотитель, использующий ремобилизованные сахара стержневого корня в качестве строительных блоков.

Неожиданно было обнаружено, что путем дерегулирования потока флоэмы в растении или его части может быть повышена холодостойкость упомянутого растения или его части, и/или может быть предотвращено или ингибировано стрелкование указанного растения после яровизации. Настоящее изобретение предлагает растения, подходящие для выращивания в холодных условиях, которые сохраняют урожайность и содержание сахарозы в корнях, пригодных для сбора урожая. *Beta vulgaris* по настоящему изобретению может быть посеяна раньше, что приводит к более длительному вегетационному периоду, а это приводит к получению более обильной биомассы и к более высокому выходу сахара. Соответственно, растения можно выращивать как "озимую" свеклу. Это позволяет фермеру проводить дополнительный севооборот.

Настоящее изобретение может предложить следующие преимущества: продуцирование всходов растений *Beta vulgaris* без побегов и не цветущих; продуцирование растения *Beta vulgaris* в качестве озимой свеклы; продуцирование растения *Beta vulgaris* в качестве яровой свеклы; увеличение биомассы растения *Beta vulgaris*; увеличение выхода сахара; предотвращение стрелкования *Beta vulgaris*; продление кампании по сбору урожая *Beta vulgaris*; предотвращение потерь запасных веществ *Beta vulgaris*; использование более высокой влажности осенью; укрытие почвы и использование накопленного азота; и/или защита полезных насекомых в полевых условиях.

Публикации, обсуждаемые в настоящем документе, предоставляются исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в настоящем документе не должно быть истолковано как признание того, что такие публикации составляют предшествующий уровень техники для формулы изобретения, прилагаемой к настоящему документу.

ПРИМЕРЫ

Материалы и способы

Материалы и способы

Растительный материал и условия роста

Для этого исследования были использованы три гибридных генотипа сахарной свеклы (GT1, GT2, GT3; KWS SAAT SE, Германия). Растения проращивали и выращивали

на стандартном почвенном субстрате ED73 (Einheitserdwerke Patzer, Германия)/ 10% (об/об) песчаной смеси при освещении в темноте 10 ч/14 ч, относительной влажности 60% и интенсивности света 110 мкмоль м⁻² с⁻¹. Для изучения кинетики роста и накопления сахара, растения выращивали в течение 6 недель при температуре 20 °С, переносили на 1 неделю в условия температуры 12 °С, а затем на 3 недели в условия температуры 4 °С. Для анализа РНК-seq и протеома, растения выращивали в течение 10 недель при температуре 20 °С, переносили на 1 неделю в условия температуры 12 °С, а затем на 2 недели в условия температуры 4 °С. Контрольные растения выдерживали при температуре 20 °С. Для сбора урожая, растения разрезали на побеги и стержневые корневые ткани. Для каждой ткани было создано 4 пула из трех разных растений. Ткани измельчали кухонным ножом, переносили в жидкий азот и выдерживали при температуре -80 °С до дальнейшей обработки.

Измерения флуоресценции хлорофилла

Фотосинтетическую активность измеряли с помощью системы Imaging-PAM M-Series (Heinz Walz, Effeltrich, Германия). Растения помещали в темноту на 12 мин, чтобы истощить энергию ФСII. Затем измеряли емкость ФСII путем насыщения его серией световых импульсов PAR 76 (мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹), как указано в Таблице 1. Записанную флуоресценцию использовали для расчета эффективного квантового выхода ФСII [$Y(II) = (Fm'-F)/Fm'$], квантового выхода регулируемой диссипации энергии [$Y(NPQ) = 1 - Y(II) - 1/(NPQ+1+qL(Fm/Fo-1))$] и нерегулируемой диссипации энергии [$Y(NO) = 1/(NPQ+1+qL(Fm/Fo-1))$]. Требуемые коэффициенты рассчитывались по формулам

$$[NPQ = (Fm-Fm')/Fm'], [qN = (Fm-Fm')/(Fm-Fo')], [Fo' = Fo / (Fv/Fm + Fo/Fm')], [qP = (Fm'-F)/(Fm'-Fo')] \text{ и } [qL = (Fm'-F)/(Fm'-Fo') \times Fo'/F = qP \times Fo'/F]$$

Таблица 1. Программа измерений фотосинтетической активности

Время [с]	Световой импульс	
0	PAR 76	
+50	PAR 76	
+20	PAR 76	14 циклов

Измерения газообмена

Для анализа параметров, связанных с газообменом, использовалась GFS-3000-система (Heinz Walz, Effeltrich, Германия). Газообменную кювету площадью 2,5 см² использовали для измерения скорости ассимиляции CO₂, дыхания, концентрации CO₂ в листьях и испарения листа-источника сахарной свеклы. Области листьев, включающие

большие центральные средние жилки, не использовались. Условия внутри кюветы были установлены на ту же температуру, влажность и концентрацию CO₂, при которых выращивались растения. Последовательность измерений приведена в Таблице 2. Перечисленные интервалы были определены путем пробного эксперимента, в котором измеряли время, необходимое для стабилизации потока CO₂ после переноса среза листа в кювету и адаптации к измененной интенсивности света. Измерение начинали после стабилизации потока CO₂, на что потребовалось примерно 5 минут. Измерения проводили с использованием 4 биологических и 3 технических (повторных измерений одного и того же растения) повторов в течение 1 мин для каждого условия, чтобы учесть изменения, вызванные наблюдаемыми естественными колебаниями листьев и площадью листьев за пределами кюветы. 30-секундный интервал между измерениями был необходим для того, чтобы лист вернулся к стабилизированному значению.

Таблица 2: Программа измерений газообмена

Время [с]	Интенсивность света	Измерение
0	PAR 0	
+220	PAR 0	фотосинтетическая активность
+30	PAR 0	фотосинтетическая активность
+30	PAR 0	фотосинтетическая активность
+460	PAR 125	дыхание/испарение (свет)
+30	PAR 125	дыхание/испарение (свет)
+30	PAR 125	дыхание/испарение (свет)
+320	PAR 0	дыхание/испарение (темнота)
+30	PAR 0	дыхание/испарение (темнота)
+30	PAR 0	дыхание/испарение (темнота)

Дыхание ткани стержневого корня сахарной свеклы

Дыхание стержневых корней измеряли путем вырезания кубиков ткани размером 0,5 см² из центральных областей стержневого корня и измерения выработки CO₂ в кювете для целого растения объемом 60 см³. Значения были нормализованы к массе ткани.

Извлечение и секвенирование РНК

РНК выделяли из трех биологических копий на генотип, ткань (листа и корня, соответственно) и обработку, соответственно. Примерно 100 мг замороженного растительного материала растирали в порошок в гомогенизаторе TissueLyser (Qiagen, Hilden, Германия) при частоте 30 Гц в течение 90 секунд. После измельчения образцы

снова переносили в жидкий N₂, добавляли 1,5 мл реагента для лизиса QIAzol (Qiagen, Hilden, Германия), трижды перемешивали на вортексе в течение 30 секунд и центрифугировали при температуре 4 °C в течение 10 мин при 12000 g. Супернатанты переносили в неиспользованные пробирки, инкубировали при комнатной температуре (RT) в течение 5 мин, экстрагировали 300 мкл хлороформа, перемешивали на вортексе в течение 15 сек и центрифугировали при температуре 4 °C в течение 15 мин при 12000 g. Водные супернатанты переносили в неиспользованные пробирки и осаждали РНК 750 мкл изопропанола в течение 10 мин при RT и замедляли скорость вращения при температуре 4 °C в течение 10 мин при 12000 g. Осадки промывали 75% EtOH (этиловый спирт), а гранулы РНК сушили при температуре 37 °C в течение 5-10 мин перед ресуспендированием в 100 мкл DEPC-H₂O (Диэтилпиракарбонат-H₂O) путем осторожного встряхивания при температуре 37 °C в течение 5-10 мин. Для удаления остаточных загрязнителей РНК дополнительно очищали с помощью НАБОРА RNeasy KIT (Qiagen, Hilden, Германия). На 100 мкл суспензии РНК добавляли 350 мкл RLT-буфера (входит в комплект) и кратковременно перемешивали на вортексе. Затем добавляли 250 мкл этанола и снова перемешивали смесь на вортексе. РНК очищали на спин-колонке и, наконец, элюировали из колонки с получением конечного объема 50 мкл (в DEPC-H₂O) на образец. РНК определяли количественно (NanoDrop 2000/2000c, Thermo Fisher) для каждого образца перед дальнейшим процессингом или хранением при температуре -80 °C. Качество РНК подтверждали с помощью биоанализатора Agilent Technologies 2100 (Пало-Альто, Калифорния, США). РНК (2 мкг на образец) транскрибировали в кДНК и секвенировали с использованием системы Illumina, Inc. HiSeq 2000. Секвенирование и сборка были предоставлены в качестве отдельной услуги (GATC GmbH, Констанц, Германия). Процесс статистического анализа включал нормализацию данных, графическое исследование необработанных и нормализованных данных, тест на дифференциальное выражение для каждого признака между условиями и корректировку необработанного значения p. Анализ проводили с использованием пакетов программного обеспечения R, Bioconductor (Джентльмен *и соавт.*, 2004. Genome biology 5: R80, включенный в настоящий документ в качестве ссылки), включая DESeq2 (Андерс и Хубер, 2010 Genome biology 11: R106; Лав *и соавт.*, 2014 Genome biology 15: 550, они оба включены в настоящий документ в качестве ссылки) и пакета SARTools, разработанного в PF2 – Институте Пастера.

Филогенетический анализ

Множественное выравнивание последовательностей аминокислотных последовательностей проводили с использованием Clustal Omega (Сиверс *и соавт.*, 2011

Mol Syst Biol 7: 539, включено в настоящий документ в качестве ссылки). Байесовский филогенетический анализ был проведен с помощью MrBayes версии 3.2 (Ронквисти *соавт.*, 2012 Systematic Biology 61: 539-542, включен в настоящий документ в качестве ссылки). MrBayes всегда выбирал наиболее подходящие модели "Jones" (Джонс *и соавт.*, 1992 Bioinformatics 8: 275-282, включено в настоящий документ в качестве ссылки) и "WAG" (Уилан и Голдман, 2001 Молекулярная биология и эволюция

18: 691-699, включено в настоящий документ в качестве ссылки) для анализа аминокислотных замен белков SPS и белков SUS, соответственно. MrBayes провел два параллельных, связанных между собой анализа цепей Марковских цепей методом Монте-Карло с четырьмя цепями для 300000 поколений. Образцы деревьев брали у каждой 1000 поколений. Анализы проводили до тех пор, пока стандартное отклонение разнесенных частот не стало ниже 0,005. Консенсусные деревья были вычислены после отбраковки первых 25% деревьев и визуализированы с использованием FigTree версии 1.4.3.

Анализ PCA и тепловой карты

Для данных РНКseq для анализа использовались средние значения *срт.* Данные были визуализированы с помощью

ClustVis (Метсалу и Вило, 2015 Nucleic acids research 43: W566–W570, включено в настоящий документ в качестве ссылки).

Анализ растворимых сахаров и крахмала

Листья и стержневые корни собирали отдельно, замораживали в жидком азоте, лиофилизировали и хранили при температуре -80 °С до момента использования. Растертый в порошок материал экстрагировали дважды 1 мл 80% EtOH при температуре 80 °С в течение 1 ч. Объединенные экстракты выпаривали в вакуумном центрифужном концентраторе (Эппендорф, Гамбург, Германия), а гранулы растворяли в ddH₂O. Для выделения крахмала гранулы промывали 80% раствором EtOH и 1 мл ddH₂O. К гранулам добавляли 200 мкл воды и образец обрабатывали в автоклаве в течение 40 мин при температуре 121 °С. 200 мкл ферментной смеси (5 Ед α-амилазы; 5 Ед амилоглюкозидазы в 200 ммоль ацетата натрия, рН 4,8) добавляли к гранулам, и крахмал гидролитически расщеплялся на глюкозные звенья при температуре 37 °С в течение 4 ч. Ферментативное разложение прекращали путем нагревания образцов до температуры 95 °С в течение 10 мин. После центрифугирования (20000 g; 10 мин; 21 °С) супернатант можно было использовать для количественного определения крахмала. Экстрагированные сахара и гидролитически расщепленный крахмал определяли количественно с использованием NAD⁺-ферментативный анализ.

Анализ фосфорилированных метаболитов

Содержание фосфорилированных промежуточных продуктов (Глюкозо-6-фосфат, Фруктозо-6-фосфат, Сахароза-6-фосфат, UDP-глюкоза, UDP) определяли в соответствии с (Хорст *и соавт.*, 2010 Plant Physiol. 152:293., включено в настоящий документ в качестве ссылки).

Количественный анализ транслокации радиоактивно меченой сахарозы

Для анализа использовали растения сахарной свеклы в возрасте от десяти до 12 недель, выращенные при температуре 20 °С в условиях короткого дня (10 ч света, 14 ч темноты). Растения для обработки холодом выращивали еще 1 неделю при температуре 12 °С, а затем выдерживали 6-7 дней при температуре 4 °С. Стержневые корни, выдержанные при температуре 4 °С и 20 °С, частично освобождали от окружающего почвенного субстрата, и в верхней половине стержневого корня (примерно на 1 см ниже поверхности почвы) проделывали отверстие диаметром 1 мм с помощью биопсии. Образовавшуюся ямку заполняли 10 мкл 1-2 разведенной радиоактивно меченой сахарозы (536 мКи/ммоль) (Hartmann Analytical, Брауншвейг, Германия) и покрывали каплей вазелина. Затем растения выдерживали еще 10 дней при температуре 4 °С или 20 °С (контроль). В конце обработки все листья-источники растений, которым были сделаны инъекции, отделяли и по отдельности зажимали между промокательной бумагой для блотирования. Для обнаружения радиоактивности в стержневых корнях, стержневые корни выкапывали, промывали и нарезами тонкими ломтиками (толщиной примерно 0,5 мм) с помощью ножа для нарезки трюфелей и зажимали между промокательной бумагой для блотирования. Радиоактивность регистрировали с помощью планшетов с изображением с фосфором (подвергали в течение 4-5 ч воздействию адаксиальной поверхности прессованных и высушенных листьев или высушенных ломтиков стержневого корня), а планшеты анализировали с помощью экрана Cyclone Storage Phosphor Screen (Packard Bioscience, Мерилен, Коннектикут, США). Для количественного определения радиоактивности в черешках, черешки листьев-источников из тех же листьев, которые использовали для фосфоимиджинга, срезали, измельчали и растирали в порошок. 5-10 мг порошка смешивали с 2 мл сцинтилляционного коктейля и регистрировали число импульсов в минуту (срм) с помощью жидкостного сцинтилляционного анализатора TRI-Carb 2810TR (Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс, США).

Транспортировка эскулина в растение

Для анализа использовали десятидневные растения сахарной свеклы, выращенные при температуре 20 °С в условиях короткого дня (10 ч света, 14 ч темноты). Один лист-источник на растение (обычно на стадии 10-12 листьев) истирали с адаксиальной стороны мелкой наждачной бумагой (класс 800). Около 500 мкл 100 ммоль

раствора эскулина сесквигидрата (Carl Roth, Карлсруэ, Германия) распределяли по поврежденной поверхности листа с помощью пластиковой пипетки. Обработанные листья покрывали полиэтиленовой пленкой, выдерживали еще 2 дня при температуре 20 °С, а затем переносили в условия температуры 4 °С или выдерживали при температуре 20 °С (контроль). После пребывания 5-7 дней на холоде, листья-источники, не загруженные эскулином, отделяли и срезы черешков анализировали на флуоресценцию эскулина с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5II (Leica, Мангейм, Германия) с использованием УФ-объектива HCX PL APO lamda blue 20.0x0.70 IMM. Срезы стержневых корней с тех же самых растений анализировали на флуоресценцию эскулина, чтобы убедиться, что эскулин успешно транслоцировался в стержневые корнеплоды как на растениях, обработанных холодом, так и на контрольных растениях. Ширина полос излучения составляла 440-465 нм для обнаружения флуоресценции эскулина и 594-631 нм для флуоресценции лигнина.

Экстракция растворимого белка

Растения собирали, промывали и разделяли на холоде на стержневые корни и листья-источники. Замороженную листовую ткань растирали в порошок с помощью N2(1) с использованием мельницы Retsch (Retsch GmbH, Германия). 800 мкл буфера E1 (50 ммоль HEPES-KOH, pH 7,5, 10 ммоль MgCl₂, 1 ммоль ЭДТА, pH 7,5, 2 ммоль ДТТ, 1 ммоль PMSF, 1 ммоль Refabloc, 5 ммоль аминоксаноуксусной кислоты, 0,1% (об/об) Triton X-100, 10% (об/об) глицерина) соединяли с 100 мг растертой в порошок ткани в чашке Эппендорфа объемом 1,5 мл. Образцы перемешивали на вортексе и центрифугировали в течение 3 мин при 12000 g при температуре 4 °С. 500 мкл супернатанта загружали в колонку Sephadex NAP5 (G25) (GE Health Care, Великобритания), предварительно уравновешенную буфером E1 в/м Triton X-100. Элюенты собирали в предварительно охлажденные чашки Эппендорфа и хранили при температуре -20 °С. Ткани стержневого корня обрабатывали, как описано выше, со следующими изменениями: Стержневые корни смешивали с буфером E1 при температуре 4 °С до получения однородной пульпы. Пульпу грубо фильтровали через кухонное сито и центрифугировали. 5 мл супернатанта подвергали диализу через мембрану с размером пор 12 кДа в течение 48 ч против 2 л ddH₂O. Воду меняли семь-восемь раз. Образцы собирали в предварительно охлажденные чашки Эппендорфа и использовали для ферментативных испытаний или хранили при температуре -20 °С. Была проведена жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрия.

Выделение вакуолей стержневого корня и вакуолярных белков

Вакуоли выделяли, как описано в работе (Юнг *и соавт.*, 2015 Nature Plants 1: 14001.) со следующими модификациями. Ткань стержневого корня *Beta vulgaris* нарезали тонкими ломтиками (толщиной приблизительно 0,5 мм) с помощью ножа для нарезки трюфелей. Ломтики были нарезаны мелкими кубиками с помощью лезвия бритвы. Затем кубики стержневого корня переносили в 130 мл собирательного буфера (750 ммоль маннита; 5 ммоль ЭДТА, рН 8; 50 ммоль Tris HCl, рН 7,6; 1 ммоль ДТТ) и инкубировали на льду в течение 15 минут при легком перемешивании. Затем раствор фильтровали через кухонное сито и сито из нержавеющей стали (размер ячеек сита 125 мкм). Вакуоли и другие клеточные компартменты осаждали центрифугированием (2000 g; 10 мин; 4°C). Осадок ресуспендировали в 40 мл центрифугирующего буфера (собирательный буфер + 30% (весовых долей) Nycodenz (AxisShield, Гейдельберг, Германия)) и переносили в пробирки для центрифугирования Sorval (36 мл). Во время центрифугирования в последующем роторе с фиксированным углом наклона Sorval SS-34 (1000 g; 15 мин; 4°C) интактные вакуоли всплывают в верхнюю фазу самообразующегося градиента Nycodenz. Интактные вакуоли аликвотировали во фракциях по 1 мл с добавлением 1 мкл ингибитора протеиназы Pefabloc (Sigma Aldrich Merck, Дармштадт, Германия), чтобы блокировать активность протеазы. Для осаждения вакуолярных белков выделенные вакуоли смешивали с 20% трихлоруксусной кислотой в соотношении 1:1 (об/об) и инкубировали при температуре -20 °C в течение одного часа. После инкубации образцы центрифугировали (20000 g; 10 мин; 4°C) и дважды промывали 100% этанолом и 100% ацетоном. Гранулу белка ресуспендировали в 8 моль/л мочевины и использовали для МС-анализа. Жидкостную хроматографию и тандемную масс-спектрометрию проводили, как описано в работе (Юнг *и соавт.*, 2015 выше).

Количественный анализ сахарозофосфатсинтазы

80 мкг растворимого белка добавляли к 200 мкл свежеприготовленного Emax (50 ммоль HEPES-KOH, рН 7,5, 20 ммоль KCl, 4 ммоль MgCl₂, 12 ммоль UDP-Glc, 10 ммоль Frc-6-P : Glc-6-P (1:4)), Elim (50 ммоль HEPES-KOH, рН 7,5, 20 ммоль KCl, 4 ммоль MgCl₂, 4 ммоль UDP-Glc, 2 ммоль Frc-6-P : Glc-6-P (1:4), 5 ммоль KH₂PO₄) и Eblank (= Emax в/м UDP-глюкозы и сахарофосфатов), соответственно. Образцы инкубировали в течение 20 мин при температуре 25 °C, затем 5 мин при температуре 95 °C для остановки реакции и центрифугировали при 12000 г при температуре 4 °C в течение 5 мин. 100 мкл супернатанта пипеткой добавляли к 100 мкл 5 моль/л KOH и инкубировали 10 мин при температуре 95 °C. Раствор смешивали с 800 мкл антрона (14,6 моль/л H₂SO₄, 0,14% (весовых долей) антрона) и немедленно измеряли поглощение при 620 нм. Калибровочный стандарт готовили с использованием 0-5 ммоль сахарозы.

Субклеточная локализация BvSUT4 в протопластах мезофилла *Arabidopsis* и сахарной свеклы

CDS BvSUT4 (Bv5_124860_zpft.t1= BVRB_5g124860) амплифицировали из РНК листьев *B. vulgaris* с помощью геноспецифичных праймеров BvSUT4-CACC-f (5'- CAC CAT GAC AGG CCA GGA CCA AAA TA-3') и BvSUT4-rev (5'- TAC ATG CAT CAC ATG AAC TCT GG-3'). Полученную открытую рамку считывания клонировали в pENTR/D-TOPO (Life Technologies, Дармштадт, Германия), секвенировали и рекомбинировали в совместимый с Gateway вектор назначения pK7FWG,0 для получения слияния p35S::BvSUT4-GFP. Временную трансформацию протопластов мезофилла *A. thaliana* выполняли, как описано в работе (Абель и Теологис, 1994 *The Plant Journal* 5: 421-427, включено в настоящий документ в качестве ссылки). Выделение и временную трансформацию протопластов мезофилла *B. vulgaris* проводили, как описано в работе (Ниберль и соавт., 2017 *Plant Biology* 19:315-326, включено в настоящий документ в качестве ссылки).

Пример 1 - Воздействие холода приводит к быстрой потере воды побегами и корнями, но не к продуцированию биомассы побегов

Чтобы выявить зависящую от холода динамику роста органов-источников и органов-поглотителей сахарной свеклы, отслеживали массу побегов и стержневых корней растений трех различных гибридных генотипов (GT1, GT2 и GT3) (растения первоначально выращивали в контрольных условиях [20 °C], затем акклиматизировали в течение одной недели при температуре 12 °C) затем на 19 дней растения переносили в холодные (4 °C) условия (Фигура 1). Масса побегов в сухом виде (DW), но не масса в сыром виде (FW) продолжала увеличиваться во время выдержки растений при температуре 4 °C. Следовательно, содержание воды в побегах постепенно уменьшилось почти наполовину в конце зарегистрированного времени (Фигура 1А). Одновременно FW, но также и DW стержневых корней уменьшались вместе с содержанием воды в стержневых корнях в течение периода воздействия холода (Фигура 1А, Б). Эти результаты показали, что рост стержневых корней был более подвержен влиянию холода, чем рост побегов, и предполагали различные физиологические и метаболические ответы тканей побегов и корней на воздействие холода.

Пример 2 - Уровни сахара ведут себя по-разному в побегах и стержневых корнях на холоде

В нашем анализе зависящего от холода роста листовой материал (полученный из тех же растений сахарной свеклы, которые использовались для расчета биомассы и содержания воды (Фигура 1А)) показал явное повышение уровней глюкозы и фруктозы (и

в меньшей степени дисахарида сахарозы) после переноса в условия температуры 4 °С (Фигура 1С). В отличие от растворимых сахаров, содержание крахмала в листьях во всех трех генотипах быстро снижалось после переноса в условия температуры 4 °С, достигая от 20 до 33% от значения, имевшегося до переноса (Фигура 1С, крайняя правая панель).

В тканях стержневого корня динамика накопления сахара заметно отличалась от таковой в побегах. Хотя уровни глюкозы и фруктозы немного повышались на холоде, они достигали лишь от 10 до 20 процентов от концентраций моносахаридов в листьях. Перед переносом в условия температуры 4 °С, уровни сахарозы стержневого корня превышали уровни моносахаридов в 30-100 раз. Уровни крахмала в корнеплодах всех генотипов были чрезвычайно низкими и практически не изменились при обработке холодом (Фигура 1D). Однако три проанализированных генотипа проявили различную динамику накопления сахара и крахмала на холоде. В то время как уровни сахарозы GT2 и GT3 стержневых корней явно снижались на холоде, уровни сахарозы GT1 колебались лишь незначительно. Интересно, что резкое падение концентрации сахарозы GT3 в стержневых корнях (на примерно 400 мкмоль/г DW) и в меньшей степени GT2 (на примерно 200 мкмоль/г DW) не сопровождалось пропорциональным увеличением содержания моносахаридов, как можно было бы ожидать при исключительном гидролизе сахарозы. Эти существенные потери сахарозы стержневого корня скорее дали основание предполагать, что этот сахар либо (i) все чаще потреблялся, (ii) превращался в соединения, отличные от моносахаридов глюкозы и фруктозы, либо (iii) экспортировался из ткани стержневого корня в другие органы.

Пример 3 - Воздействие холода влияет на скорость фотосинтеза и ассимиляцию углекислого газа

Чтобы проанализировать влияние холода на фотосинтез сахарной свеклы, мы измерили эффективность фотосинтеза листьев-источников трех различных генотипов при воздействии низких температур с помощью амплитудно-модулированной (РАМ) флуорометрии и ассимиляции CO₂ с измерениями газообмена (Фигура 2). Эти измерения показали, что квантовый выход (Y(II)) Фотосистемы II, концентрации CO₂ в листьях (C_i), скорость ассимиляции CO₂ (A) и скорость испарения листьев (E) зависели от температуры окружающей среды и что растения, подвергшиеся воздействию холода, отвечали снижением эффективности фотосинтеза (Фигура 2). Все три генотипа показали небольшое, но значительное снижение Y(II) уже после недельного переноса в условия температуры 12 °С. Одновременно нефотохимическое тушение Y(NPQ), но не нерегулируемое тушение Y(NO) увеличивалось при этой температуре в листьях всех трех генотипов (Фигура 2A). Более высокий квантовый выход Y (NPQ) при температуре 12 °С

по сравнению с температурой 20 °С указывает на увеличенный поток электронов в направлении пути Мелера-аскорбатпероксидазы при воздействии этой температуры, например, для диссипации тепловой энергии в реакционных центрах Фотосистемы II. После переноса в условия температуры 4 °С, $Y(II)$ еще больше уменьшился и не восстанавливался в течение испытуемого периода времени. Однако уменьшение квантового выхода $Y(NPQ)$ и значительное увеличение квантового выхода $Y(NO)$ указывали на то, что электроны не отклонялись в сторону круговорота воды, а вместо этого подвергались нерегулируемой диссипации энергии, что, возможно, индуцировало повреждения мембраны и появление свободных радикалов при этой низкой температуре (Фигура 2А). Измерения газообмена CO₂ ясно показали, что снижение активности PSII, определенное с помощью РАМ флуорометрии, сопровождалось резким снижением скорости ассимиляции CO₂ при температуре 4 °С, но не при температуре 12 °С (Фигура 2В). Скорость испарения (E) увеличивались у всех трех генотипов уже при температуре 12 °С, но более сильно при температуре 4 °С. Повышенное испарение совпало с зависящим от охлаждения увеличением концентрации CO₂ в листьях, а это указывает на тот факт, что, несмотря на увеличенное открытие устьиц, активность ферментов цикла Кальвина была значительно снижена (Фигура 2В). В частности, растения GT2 (круги на Фигуре 2В) ответили увеличением открытия устьиц и увеличением испарения после переноса в условия температуры 12 °С, что привело к более высокой ассимиляции CO₂ при температуре 12 °С по сравнению с температурой 20 °С у этого генотипа.

Чтобы получить представление о глобальной холодозависимой экспрессии генов в тканях-источниках и тканях-поглотителях сахарной свеклы, мы провели анализ РНК-seq на ткани листа и стержневого корня растений сахарной свеклы из вышеуказанных генотипов, подвергшихся воздействию условий холода (4 °С) или контроля (20 °С). Для этих независимых анализов на холодозависимость, образцы отбирали через 14 дней после переноса из условий температуры 12 °С в условия температуры 4 °С, то есть, когда метаболическое накопление сахаров (Фигура 1) и скорость фотосинтеза были максимально контрастными. Полученные считывания РНК-seq были сопоставлены с эталонным геномом сахарной свеклы (Доум и соавт., 2013 Nature 505: 546, включено в настоящий документ в качестве ссылки). Воздействие холода индуцировало глобальную перестройку экспрессии генов как в тканях побега, так и в тканях стержневого корня. Была извлечена информация о транскрипте генов, участвующих в фотосинтезе. В РС-анализе, основанном на значениях экспрессии в ткани листа всех 162 генов, обозначенных как "фотосинтез", "световая реакция фотосинтеза", "цикл Кальвина фотосинтеза" или "фотодыхание фотосинтеза", проведенном с использованием программного обеспечения

Mapman Ontology для сахарной свеклы, PC1 четко разделил обработку температурной в трех генотипах. PC1 объяснил 84,5%, PC2 7,1% различий в экспрессии между температурой 4 °C и 20 °C в пределах генотипов (Фигура 2C). Независимые генотипы не были четко разделены, и, соответственно, уровни экспрессии генов, связанных с фотосинтезом, вели себя одинаково во всех трех генотипах (Фигура 2C). При температуре 20 °C примерно 9% всех считываний транскриптов каждого генотипа можно было отнести к подгруппам "фотосинтеза". После воздействия температуры 4 °C эта группа была представлена только 3% всех считываний, что указывает на резкое снижение регуляции генов, связанных с фотосинтезом, на холоде (Фигура 2D). Снижение экспрессии наблюдалось, например, для транскриптов с наибольшей гомологией генам, кодирующим активазу RuBisCO (VvRCA), малую субъединицу RuBisCO (VvRBCS), белок, связывающий хлорофилл A/B (VvCAVA), и пластоцианин (VvPC) (Фигура 2E, верхний ряд). Гены, связанные с обработкой АФК, с другой стороны, демонстрировали дифференциальную регуляцию. В то время как у генов, кодирующих глутатионредуктазы, была повышена регуляция на холоде, у генов, кодирующих супероксиддисмутазу или аскорбатредуктазу, регуляция была понижена, или она была не существенной, соответственно (Фигура 2E, нижний ряд). Таким образом, данные продемонстрировали, что фотосинтез сахарной свеклы был чрезвычайно чувствителен к температуре охлаждения ниже 12 °C, и предположили, что (едва происходящая) ассимиляция CO₂ не полностью объясняет увеличение биомассы и сахара, определенное для листьев сахарной свеклы, обработанной холодом (Фигура 1).

Пример 4 - Низкие температуры изменяют основной углеводный метаболизм в побегах и стержневых корнях

Было исследовано, можно ли объяснить снижение концентрации сахарозы стержневого корня на холоде усилением дыхания и приведут ли холодные условия к дифференциальной экспрессии генов, участвующих в основном углеводном метаболизме (Фигура 3). Дыхание в ткани стержневого корня зависело от исследуемой части стержневого корня, поскольку оно уменьшалось с увеличением глубины окружающей почвы (Фигура 3A). Это зависящее от положения уменьшение дыхания (пропорциональное глубине почвы, окружающей соответствующую часть стержневого корня) также наблюдалось при температуре 4 °C, однако, в каждой части стержневого корня дыхание было – по сравнению с соответствующим контролем – в целом ниже, когда сахарная свёкла подвергалась воздействию температуры 4 °C (Фигура 3A). Эти данные свидетельствуют о том, что на холоде углеводы в стержневом корне использовались для гликолитического и окислительного катаболизма в меньшей степени, чем в контрольных

условиях при температуре 20 °С. В побегах, то есть, в листьях-источниках всех генотипов, наоборот, дыхание усиливалось на холоде (Фигура 3B), а это указывает на то, что зрелые листья, которые вряд ли являются PS-активными при этой температуре (Фигура 2), имели высокую потребность в поступлении углеводов из других источников. Одним из таких источников, вероятно, был крахмал, содержание которого в листьях уменьшалось на холоде (Фигура 1). Анализ PC и тепловой карты, загруженных значениями экспрессии генов, отнесенных к “основному метаболизму СНО”, выявил различия, зависящие от органа и температуры (Фигура 3C, Фигура 3D). Первый основной компонент PC1 объяснил 66,9% различий в экспрессии между корнями и побегами, а PC2 объяснил 17,9% различий в экспрессии между температурой 20 °С и температурой 4 °С. Оба органа показали более четкое разделение при температуре 20 °С по сравнению с температурой 4 °С (Фигура 3C). Представление тепловой карты наглядно показывает, что регуляция уровней экспрессии генов, способствующих деградации и синтезу крахмала в листьях, была повышена (деградация крахмала) или понижена (синтез крахмала) под воздействием холода, соответственно. Несмотря на чрезвычайно низкие уровни крахмала в стержневых корнях (Фигура 1), гены, связанные с крахмалом, также экспрессировались и регулировались в стержневых корнях (Фигура 3D).

Наблюдалось повышение регуляции уровней экспрессии генов синтеза сахарозы в корнях на холоде, но регуляция не изменилась в побегах. Однако регуляция генов деградации сахарозы была явно понижена в корнях, но слегка повышена в побегах (Фигура 3D). Сахарозофосфатсинтаза (SPS) и сахарозосинтаза (SUS) являются ключевыми факторами деградации и синтеза сахарозы и регулируют распределение углеводов между тканями-источниками и тканями-поглотителями (Волл *и соавт.*, 2014; Штурм, 1996; Мартини *соавт.*, 1993; Ковтун и Дайе, 1995; все они включены в настоящий документ в качестве ссылки). Полногеномный поиск в геноме сахарной свеклы ((Доум *и соавт.*, 2013 выше, включен в настоящий документ в качестве ссылки)) идентифицировал две изоформы SPS и четыре изоформы SUS. Байесовский анализ идентифицировал обе изоформы SPS как гомологи подгруппы *Arabidopsis* SPS ‘A’ (Волл *и соавт.*, 2014 включен в настоящий документ в качестве ссылки) (Фигура 8). Две изоформы SPS показали дифференциальную тканеспецифичную и зависящую от холода экспрессию. В побегах всех генотипов экспрессия SPSA1 была примерно в 10 раз выше, чем в корнях, когда растения подвергались воздействию температуры 20 °С. Обработка холодом повысила регуляцию его экспрессии в корнях до семикратного уровня, но не повлияла на уровни экспрессии в побегах. Экспрессия SPSA2 при температуре 20 °С была низкой в побегах, но высокой в корнях всех трех испытанных генотипов. Экспрессия этой изоформы была

ранее идентифицирована как специфичная для стержневого корня, индуцируемая глюкозой и репрессированная сахарозой (Гессе *и соавт.*, 1995, включен в настоящий документ в качестве ссылки). Экспрессия SPSA2 также не изменилась, или даже его регуляция снизилась (в случае GT2) в побегах после обработки холодом, но, в отличие от SPSA1, экспрессия SPSA2 была индуцирована в стержневых корнях всех генотипов. На уровне белка, выявленном с помощью МС-анализа растворимого протеома из тех же тканей стержневого корня, которые использовались для анализа транскриптома, была повышена регуляция BvSPSA1, но не BvSPSA2 (Фигура 8). Однако активность SPS была выше при температуре 4 °С по сравнению с температурой 20 °С как в белковых экстрактах из листьев, так и из стержневых корней (Фигура 3E). Более высокие уровни, особенно UDP в стержневых корнях и Сахарозо-6-фосфат как в побегах, так и в стержневых корнях на холоде по сравнению с контрольными температурами, а также уровни продуктов извлечения F-6-P и UDP-глюкозы, и аллостерического SPS активатора G-6-P поддерживали сценарий, в котором активность SPS была повышена как в корнях, так и в побегах (Фигура 8).

Экспрессия четырех изоформ сахарозосинтазы показала различия, зависящие от ткани и температуры (Фигура 3F). В то время как изоформы BvSUS1 и BvSUS2 были сильно экспрессированы в корнях и имели обилие соответствующих белков, BvSUS3 и BvSUS4 были слабо экспрессированы, и их соответствующие белки не были обнаружены посредством МС в растворимой фракции протеома (Фигура 3F). Как BvSUS1, так и BvSUS2 были экспрессированы от десяти (BvSUS1) до ста раз выше (BvSUS2) в корнях, чем в побегах. После периода воздействия холода уровни мРНК обеих изоформ в корнях снизились примерно наполовину. Интересно, что уровни транскрипта BvSUS2 в побегах увеличились от десяти до двадцати раз, однако, не достигнув высоких уровней в стержневых корнях (Фигура 3F). BvSUS2, но не BvSUS1, также был значительно снижен на уровне белка, что указывает на дифференциальную динамику оборота белка двух изоформ на холоде. Взятые вместе, эти данные показали, что развивающиеся стержневые корни сместились на холоде от потребляющей/запасающей сахарозу ткани, к ткани, синтезирующей сахарозу, и это подтверждает утвержденные характеристики тканевой-поглотителей.

Пример 5 - При низких температурах происходит обратная транслокация флоэмы сахарозы и эскулина

Приведенные выше примеры показали, что индуцированное холодом накопление сахара в побегах не было вызвано или только в недостаточной степени вызвано ассимиляцией диоксида углерода или деградацией крахмала, и было выдвинуто

предположение, что углерод, используемый в качестве строительного блока для метаболитов побегов, может быть ремобилизован из клеток-накопителей стержневого корня. Чтобы отследить судьбу углерода у стержневого корня после воздействия низких температур, ткань стержневого корня непосредственно подкармливали радиоактивно меченой ^{14}C -сахарозой путем введения вещества снаружи в мясистую паренхиматическую ткань стержневого корня растений, выращенных в контрольных условиях при температуре 20 °C, или растений, подвергнутых воздействию холода (5 дней при температуре 12 °C и затем 7 дней при температуре 4 °C). Затем обработанные растения выдерживали еще одну неделю при контрольных или низких температурах, а затем разделяли на отдельные листья и стержневые корни. Листья или продольные тонкие срезы стержневых корней прессовали и сушили, а введенную радиоактивность визуализировали с помощью планшетов с изображением с фосфором и программного обеспечения (Фигура 4 и Фигуры 11 и 12).

Этот анализ неожиданно показал, что растения, выращенные при температуре 4 °C, показали распределение радиоактивности в листьях-источниках. Радиоактивность в листьях растений, обработанных холодом, была обнаружена в жилках листьев, и интенсивность постепенно снижалась к кончику листа, что указывает на транспорт через сосуды флоэмы (Фигура 4B). Однако у растений, выращенных в контрольных условиях, радиоактивность вряд ли могла быть обнаружена в листьях-источниках (Фигура 4C). Однако радиоактивность в некоторой степени обнаруживалась в молодых листьях-поглотителях контрольных растений и экстрагировалась из объединенных черешков побегов (Фигура 4D). Эта радиоактивность может представлять собой транспортируемую ксилемой сахарозу или ее производные из-за повреждения проколотых сосудов в результате процедуры инвазивной инокуляции. Резкая потеря воды в побегах при холоде (Фигура 1) однако указывала на то, что при температуре 4 °C радиоактивно меченая сахароза не эффективно транспортировалась к предыдущим листьям-источникам через ксилему, а скорее через флоэму.

Эскулин, гликозид кумарина, подвижный во флоэме, распознаваемый несколькими транспортерами сахарозы, включая загрузчик флоэмы *Beta vulgaris* BvSUT1, загружали на листья-источники, и пути транспортировки эскулина оценивали непосредственно путем обнаружения флуоресценции из эскулина в тонких срезах черешков листьев-источников тех же растений и растений, которые не были загружены эскулином, после переноса на холод или в контролируемых условиях. Было замечено, что флуоресценция синего эскулина обнаруживалась исключительно во флоэме сосудистых пучков листьев-источников растений, перенесенных на холод. Однако флуоресценция была не только

ограничена областью флоэмы, но также была обнаружена в некоторой степени в области пучка с вкраплениями желтой флуоресценцией лигнифицированных сосудов ксилемы (Фигура 4). При температуре 20 °С флуоресценция эскулина во флоэме никогда не обнаруживалась (Фигура. 4).

Чтобы проследить за потоком сахарозы непосредственно из места инокуляции в стержневых корнях, продольные тонкие срезы стержневых корней инокулировали радиоактивно меченной сахарозой и подвергали ткань воздействию планшетов с изображением с фосфором (Фигуры 11 и 12). Эти анализы показали, что радиоактивность в стержневых корнях растений, подвергшихся воздействию температуры 4 °С, была обнаружена и концентрировалась в жилковатых или пятнистых структурах, которые располагались между местом инокуляции и тканью верхушки стержневого корня (кроны). При большем увеличении эти структуры можно было идентифицировать как сосудистые пучки (Фигура 11). В тонких срезах стержневых корней растений, выращенных в контрольных условиях, не наблюдалось такого отчетливого потемнения сосудистых структур, хотя некоторое наблюдаемое почернение ткани кроны указывало на то, что радиоактивность также переносилась вверх в направлении побега (Фигура 12). Однако в большинстве случаев радиоактивность в стержневых корнях при температуре 20 °С была либо просто ограничена паренхиматическими областями около места инокуляции, либо концентрировалась в толстых нитях, которые тянулись от места инокуляции к росту боковых корней. Эти результаты показали, что радиоактивно меченная сахароза и эскулин – последний сначала был транслоцирован к основанию черешка загруженного листа и через (по меньшей мере, через части) стержневой корень – преимущественно транспортировались из стержневых корней в побеги на холоде, но не в контрольных условиях, и было выдвинуто предположение, что сахароза, высвобождаемая из паренхиматической ткани-хранилища, тоже была транспортирована таким же образом.

Пример 6 - Гены и белки импортера и экспортера вакуолярной сахарозы показывают противоположную холодозависимую экспрессию

Мы проверили, может ли транспортировка сахарозы от стержневых корней к побегам на холоде быть опосредована различной активностью импортеров и экспортеров вакуолярной сахарозы. В сахарной свекле гомолог TST1 BvTST2.1 отвечает за накопление вакуолярной сахарозы. Экспрессия TST2.1 в стержневых корнях всех испытанных генотипов значительно превышает таковую в ткани листа, что подтверждает его роль в качестве загрузчика сахарозы вакуолей паренхимы стержневого корня (Фигура 5). Интересно, что содержание как мРНК, так и обилие белка значительно снизилось во всех генотипах в стержневых корнях после обработки холодом (Фигура 5).

Мы идентифицировали Vv5_124860_zpft.t1 как транспортер для экспорта вакуолярной сахарозы и в связи с этим назвали соответствующий транспортер VvSUT4 (Фигура 13). N-концевые слияния кодирующей последовательности VvSUT4 с GFP, временно трансформированным в протопласты мезофилла *Beta vulgaris* или *Arabidopsis*, ясно указывали на то, что VvSUT4 был белком, локализованным в тонопласте. мРНК VvSUT4 показала меньшее обилие в старых растениях по сравнению с молодыми (Фигура 14). Напротив, мРНК TST2.1 увеличивалась по мере развития листа, подтверждая предполагаемую оппозиционную активность транспортных белков TST2;1 и SUT4 (Фигура 14). По данным РНК-seq, полученным от генотипов, обработанных холодом, изученных в этом исследовании, уровни белка SUT4 и мРНК значительно увеличились в стержневых корнях на холоде (Фигура 5B). Эти данные свидетельствовали о том, что импорт вакуолярной сахарозы стержневого корня уменьшался, а высвобождение вакуолярной сахарозы стержневого корня увеличивалось в холодных условиях, и было выдвинуто предположение, что противоположная регуляция VvTST2;1 и VvSUT4 в стержневых корнях была основной движущей силой доставки и накопления сахаров в побегах.

Пример 7 - Экспрессия цветочных генов-регуляторов регулируется на холоде

Было выдвинуто предположение, что наблюдаемая ретранслокация сахарозы из стержневых корней в побеги может представлять собой подготовительную метаболическую и генетическую перестройку для инициации цветения.

Были определены уровни экспрессии генов-регуляторов цветения, и в листьях наблюдалось значительное понижение регуляции цветочного репрессора VvFT1 и повышение регуляции цветочного активатора VvFT2 на холоде (Фигура 6). Проанализированные в настоящем документе генотипы имеют двухлетнюю динамику роста, поэтому VTC1 и BBX19 могут не влиять на экспрессию FT1. Однако эти два гена взаимно регулировались холодом. В то время как регуляция VTC1 была понижена на холоде, регуляция BBX19 была повышена. В отличие от результатов, представленных в работе Пин и соавт. (2012 *Current Biology* 22: 1095-1101), где у яровизированных двухлетних растений уровни мРНК VTC1 были повышены по сравнению с не яровизированными растениями, регуляция VTC1 была понижена на холоде. Однако в упомянутом исследовании экспрессию анализировали после, а не на ранних стадиях яровизации. Мы обнаружили, что VTC1 и BBX19 экспрессировались как в побегах, так и в стержневых корнях, а экспрессия BBX19 в стержневых корнях превышала экспрессию в побегах при температуре 20 °C почти в три раза. Однако потенциальные мишени этих

кодируемых белков с потерей функции, FT1 и FT2, были специфически и исключительно экспрессированы в ткани листа (Фигура 6).

Таким образом, эти данные показали, что процесс яровизации уже был передан на уровень экспрессии цветочных генов-регуляторов, и что изменения транскрипции связанных генов действительно происходили как в побегах, так и в стержневых корнях.

Пример 8 - Конститутивная сверхэкспрессия AtTMT1 улучшает холодостойкость AtTMT1 (геномная ДНК: SEQ ID № 7; кДНК SEQ ID № 8: аминокислотная последовательность SEQ ID № 9) экспрессировалась в растениях сахарной свеклы под контролем промотора CaMV 35S.

Контрольные образцы с нулевой сегрегацией продемонстрировали 6,7% и 20% повреждение после восстановления после обработки холодом, тогда как у одного из двух гибридов вообще не было симптомов повреждения, а у другого - только слабые симптомы у 3,3% растений.

Не желая быть связанными теорией, отметим, что более высокая концентрация сахара или более высокое соотношение гексоз к сахарозе могут лучше защитить растения от холода и мороза, чем контрольные растения.

Ткань стержневого корня анализировали на предмет утечки электролитов после обработки холодом. Сверхэкспрессоры AtTMT1 высвобождают меньше электролитов, чем контрольные растения (Фигура 15). Степень высвобождения электролитов из ткани в таком испытании указывает на повреждение ткани, вызванное обработкой холодом.

Не желая быть связанным теорией, отметим, что более высокая концентрация сахара или более высокое соотношение гексоз к сахарозе могут лучше защитить растения, сверхэкспрессирующие AtTMT, от холода и мороза, чем контрольные растения.

Пример 9 - Конститутивная сверхэкспрессия BvSUT4/SUC4 повышает чувствительность к холоду

BvSUT4/SUC4 был сверхэкспрессирован в растениях *Arabidopsis*. Растения, которые сверхэкспрессировали BvSUT4/SUC4, показали увеличение утечки электролитов и, следовательно, повышенную чувствительность к морозу (Фигуры 16, 17) по сравнению с контрольными растениями после воздействия низких температур.

Не желая быть связанным теорией, отметим, что меньшее количество сахаров в вакуоли из-за усиленного экспорта сахарозы из вакуоли, опосредованного BvSUT4/SUC4, может привести к повышенной чувствительности к холоду. И наоборот, пониженная регуляция/нокаут BvSUT4/SUC4 в сахарной свекле может повысить холодостойкость и морозостойкость, поскольку экспортируется меньшее количество вакуолярной сахарозы, то есть, имеется более высокая концентрация сахарозы.

Пример 10 - Конститутивная сверхэкспрессия VvTST2.1

Специфичная для стержневого корня сверхэкспрессия VvTST2.1 экспрессируется в растениях сахарной свеклы под контролем специфичного для стержневого корня промотора, такого как промотор 2-1-48. Промотор 2-1-48 описан в патенте US 7,767,801 B2, который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

Устойчивость растений к обработке холодом и морозом измеряют относительно соответствующих контрольных показателей.

Сверхэкспрессия TST2.1 под контролем нечувствительного к холоду промотора, используемого в настоящем описании, приводит к высокой активности TST2.1 во время обработки холодом и морозом.

Не желая быть связанным теорией, отметим, что активность TST2.1 стержневого корня может конкурировать с загрузкой флоэмы за опосредованную SUT4/SUC4 сахарозу, высвобождаемую из вакуоли. Следовательно, в стержневом корне может поддерживаться более высокое содержание защитной сахарозы.

Пример 11 - Повышение морозостойкости

Чтобы дополнительно продемонстрировать, что концентрация сахара в стержневых корнях, особенно в запасающих вакуолях, повышает морозостойкость, мы сверхэкспрессировали VvTST2.1 в стержневых корнях и провели эксперимент по морозостойкости, как описано выше.

При сравнении сверхэкспрессирующих VvTST2.1 гибридов с контрольными растениями, выживаемость после обработки морозом была увеличена у трансгенов (29%) по сравнению с контрольными растениями (17%).

Более того, через две недели после восстановления растений при температуре 20 °С, трансгенные гибриды имели большую массу, чем контрольные гибриды. Общая масса трансгенных растений была увеличена на 48%, масса листьев - на 40%, а масса стержневого корня - на 62% по сравнению с контрольными растениями.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ повышения холодостойкости растения или его части и/или предотвращения, или ингибирования стрелкования растения, содержащий дерегулирование потока флоэмы в упомянутом растении или его части.

2. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что поток флоэмы от тканей-поглопителей, в частности стержневых корней к тканям-источникам, в частности побегам уменьшается, ингибируется или обращается вспять, когда упомянутое растение или его часть выращивают в холодных условиях.

3. Способ по пункту 1 или пункту 2, содержащий модификацию упомянутого растения или его части для:

i) повышения активности или экспрессии гена, содержащего:

a) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

b) нуклеотидную последовательность, имеющая кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 2 или 8;

c) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами a) или b) в жестких условиях;

d) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

e) нуклеотидную последовательность, кодирующая гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или

ii) повышения активности или экспрессии полипептида:

a) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

b) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом a) в жестких условиях;

с) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

d) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9.

4. Способ по любому предыдущему пункту, содержащий модификацию упомянутого растения или его части для:

i) снижения активности или экспрессии гена, содержащего:

a) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

b) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 5, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 5, 11, 14 или 17;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или b) в жестких условиях;

d) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

e) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18; или

ii) снижения активности или экспрессии полипептида:

a) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

b) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

с) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

д) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18.

5. Применение гена:

а) содержащего нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 или 11, 13, 14, 16 или 17;

б) содержащего нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17;

с) содержащего нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

д) содержащего нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 3, 6, 9 или 12, 15 или 18.;

е) кодирующего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18; или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18; или

ф) кодирующего гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18;

для регулирования потока флоэмы в растении или его части; и/или повышения холодостойкости растения или его части; и/или предотвращения, или ингибирования стрелкования растения.

6. Способ выбора растения с дерегулированным потоком флоэмы и/или повышенной холодостойкостью, и/или замедленным, или ингибированным стрелкованием

путем выбора аллеля, отличающийся тем, что аллель ассоциирован с дерегулированным потоком флэзмы, при этом, упомянутый аллель представляет собой:

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17,

б) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

д) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18;

е) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18;

ф) аллель по любому из пунктов а), б), с), д) или е); и

упомянутый способ содержит определение присутствия или отсутствия упомянутого аллеля, предпочтительно, при этом, упомянутый аллель идентифицируют путем обнаружения присутствия однонуклеотидных полиморфизмов, полиморфизмов длин, инсерционно-делеционных полиморфизмов.

7. Способ продуцирования холодостойкого растения и/или растения с замедленным, или ингибированным стрелкованием, содержащий скрещивание растения-донора, содержащего аллель, ассоциированный с дерегулированным потоком флэзмы, отличающийся тем, что упомянутый аллель содержит полинуклеотидную последовательность, содержащую:

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

б) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17, или нуклеотидную

последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 2, 5, 8, 11, 14 или 17;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

д) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18;

е) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3, 6, 9, 12, 15 или 18; или

ф) аллель по любому из пунктов а), б), с), д) или е);

с растением-реципиентом, обладающим коммерчески желательными признаками.

8. Растение или его часть, получаемая или полученная способом по любому из пунктов 1-4 или 7, или предназначенное для применения по пункту 5.

9. Материал для размножения растений (такой как семя), получаемый из растения по пункту 8.

10. Модифицированная растительная клетка, отличающаяся тем, что растительная клетка была модифицирована для:

і) повышения активности или экспрессии гена, содержащего:

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

б) нуклеотидную последовательность, имеющая кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 2 или 8;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

д) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9, или

последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

е) нуклеотидную последовательность, кодирующая гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или

ii) повышения активности или экспрессии полипептида:

а) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидной последовательностью, которая, имеет по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

б) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

с) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

д) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9.

iii) снижения активности или экспрессии гена, содержащего:

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

б) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 5, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 5, 11, 14 или 17;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

д) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

е) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18; или

iv) снижения активности или экспрессии полипептида:

a) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

b) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

c) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

d) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18.

11. Модифицированное растение или его часть, содержащее модифицированную растительную клетку по пункту 10.

12. Материал для размножения растений, получаемый или полученный из модифицированного растения по пункту 11.

13. Способ или применение по любому из пунктов 1-6 или 7, растение или его часть, или растительная клетка по любому из пунктов 8, 10, 11, или материал для размножения растений по пункту 9 или 12, отличающийся тем, что растение или его часть, или растительная клетка из семейства *Amaranthaceae*.

14. Способ повышения концентрации сахарозы в органе запасаения сахарозы растения, содержащий модификацию упомянутого растения или его части для:

i) снижения активности или экспрессии гена, содержащего:

a) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

b) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 5, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 5, 11, 14 или 17;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

д) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

е) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18; или

ii) снижения активности или экспрессии полипептида:

а) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

б) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

с) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18; или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

д) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18.

15. Способ выбора растений, их частей или растительных клеток, имеющих дерегулированный поток флоэмы и/или повышенную холодостойкость, и/или замедленное, или ингибирование стрелкование после яровизации, путем скрининга упомянутого растения или его части, или растительной клетки для:

i) снижения активности или экспрессии гена, содержащего:

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

б) нуклеотидную последовательность, имеющая кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 2 или 8, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 2 или 8;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

д) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

е) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; и/или

ii) снижения активности или экспрессии полипептида:

а) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 1, 2, 7 или 8, или нуклеотидной последовательностью, которая, имеет по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 1, 2, 7 или 8;

б) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

с) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 3 или 9;

д) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3 или 9; и/или

iii) повышения активности или экспрессии гена, содержащего:

а) нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

б) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID № 5, 11, 14 или 17, или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 5, 11, 14 или 17;

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктами а) или б) в жестких условиях;

d) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

e) нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18; и/или

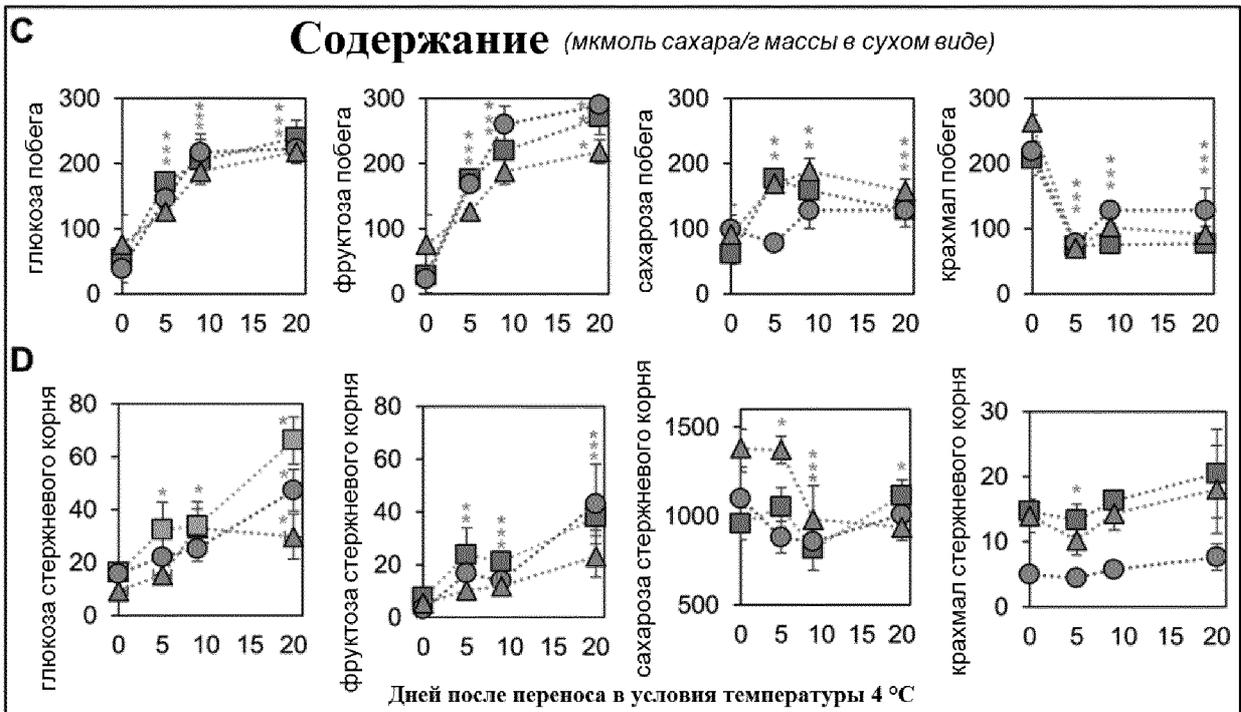
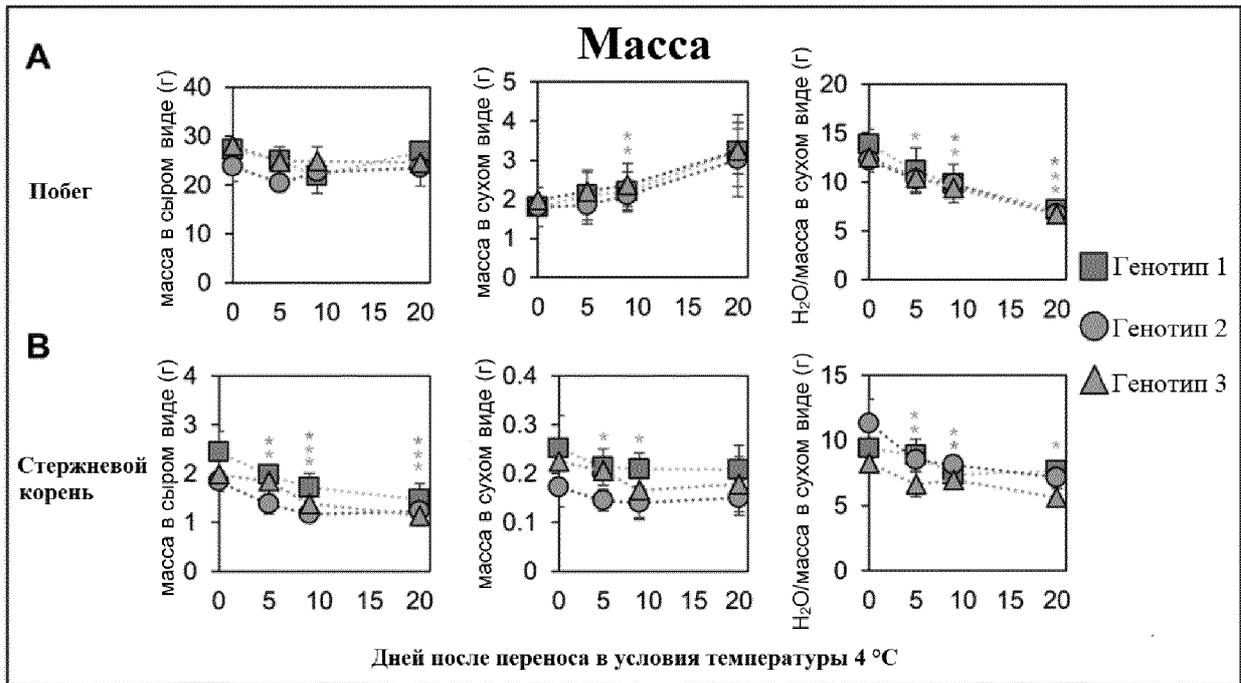
iv) повышения активности или экспрессии полипептида:

a) кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17, или нуклеотидной последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 4, 5, 10, 11, 13, 14, 16 или 17;

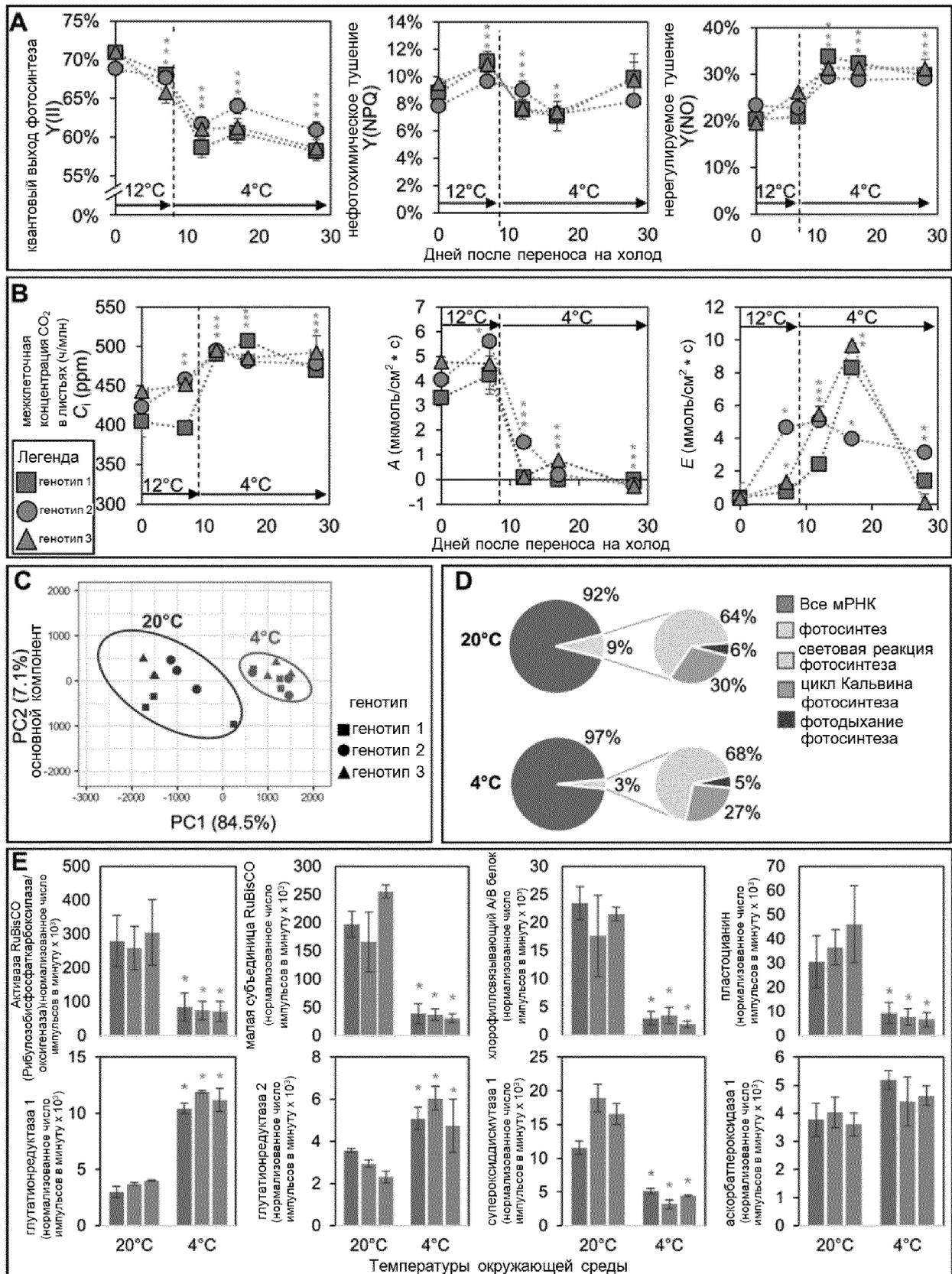
b) кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей в соответствии с пунктом а) в жестких условиях;

c) содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность SEQ ID № 6, 12, 15 или 18;

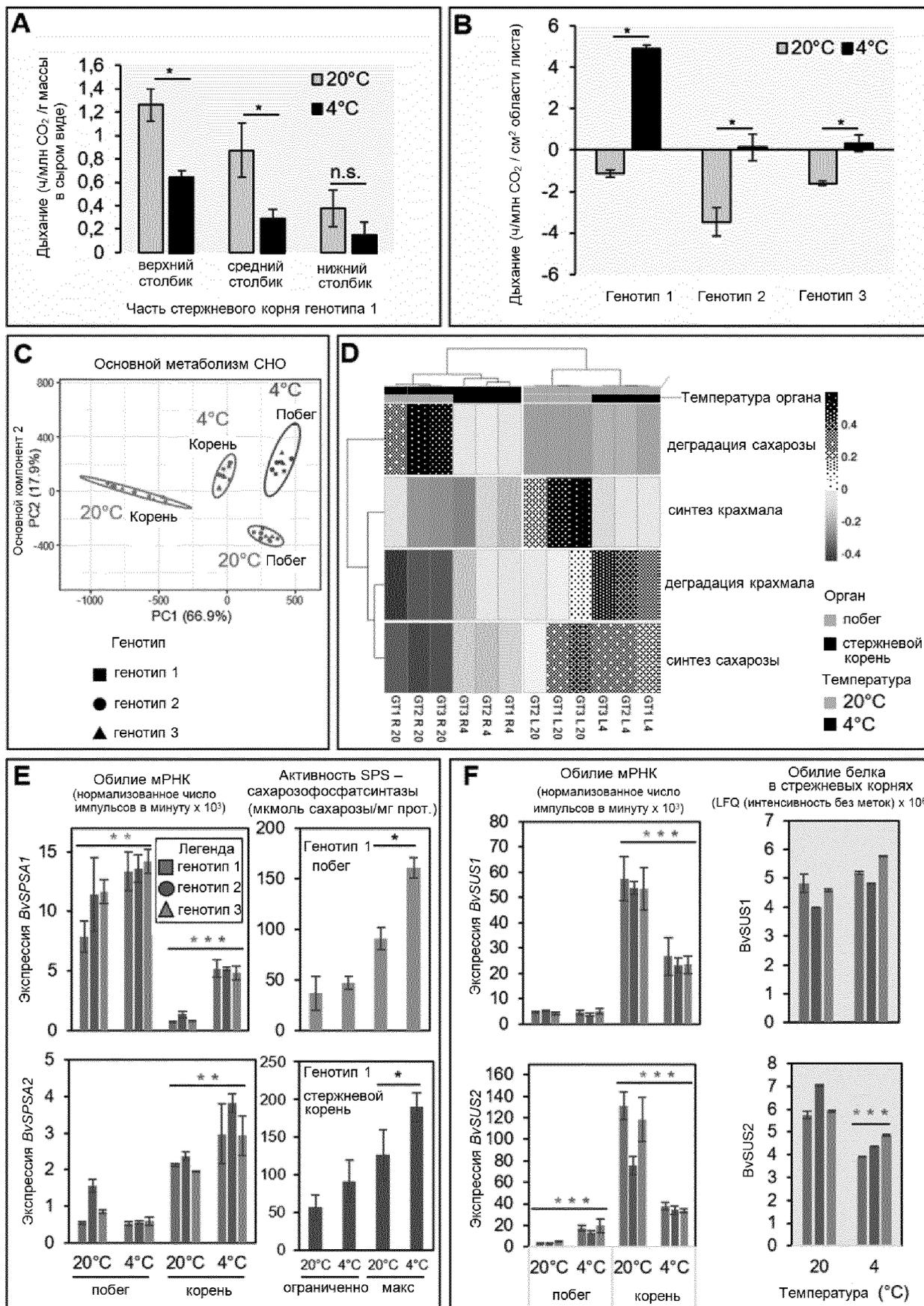
d) который является гомологом, аналогом или ортологом полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 6, 12, 15 или 18.



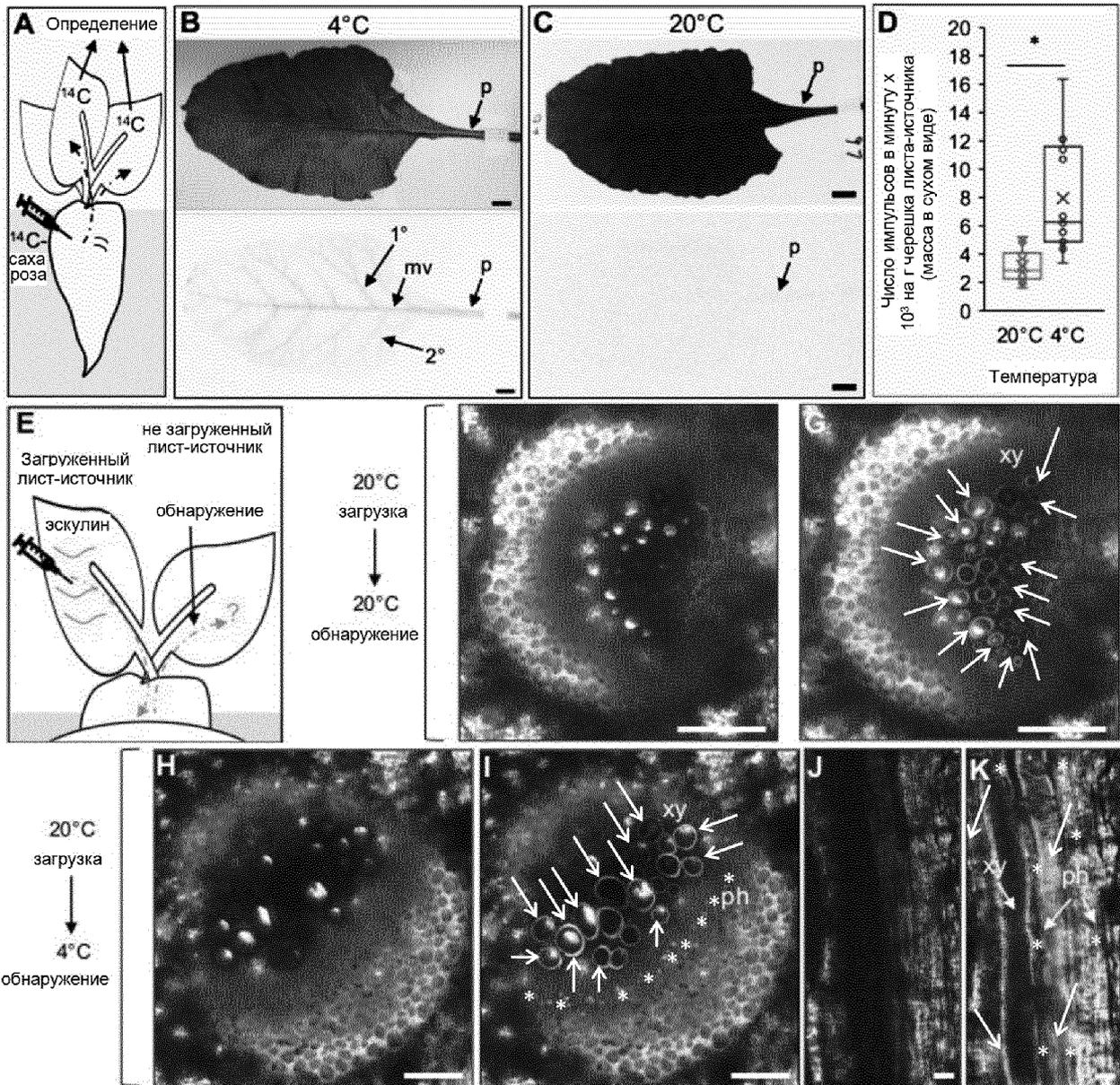
Фиг. 1



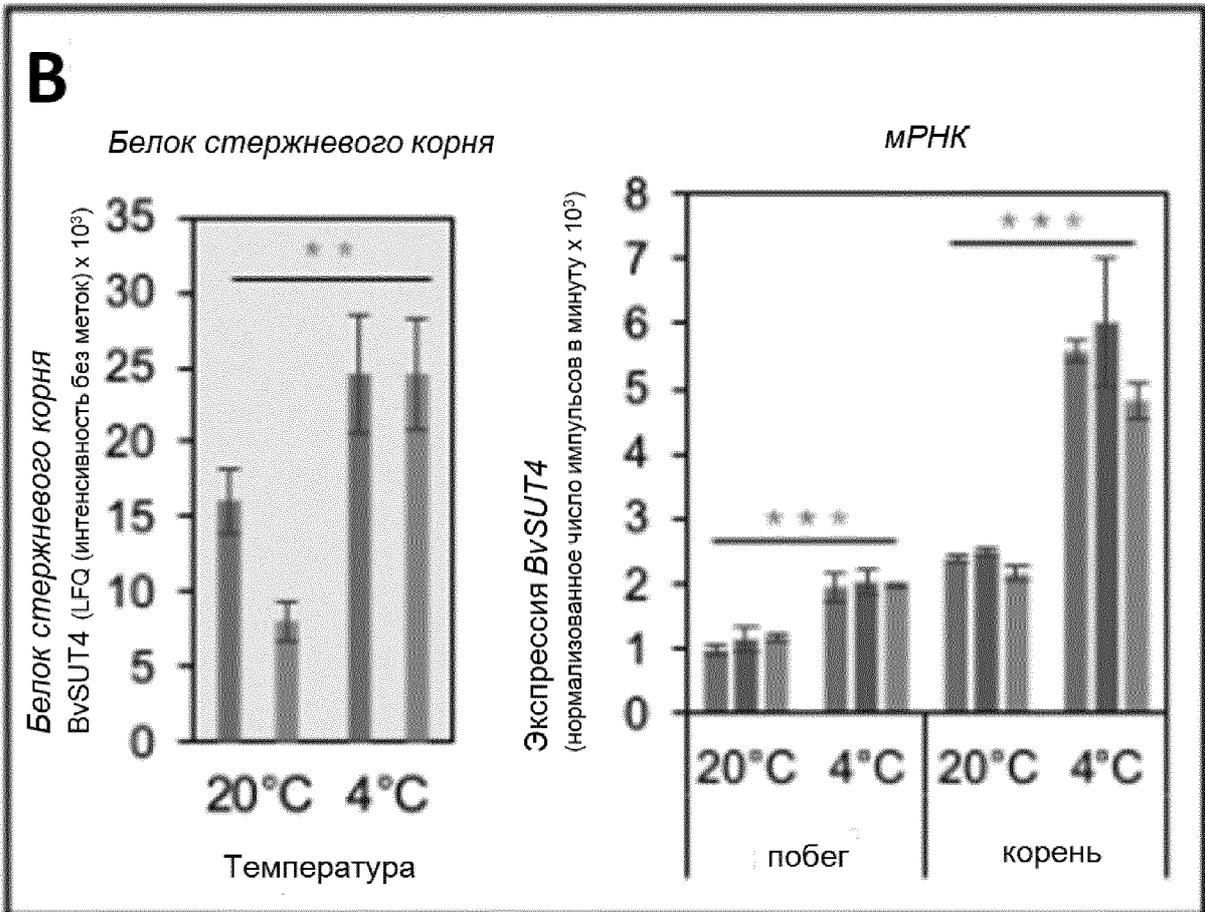
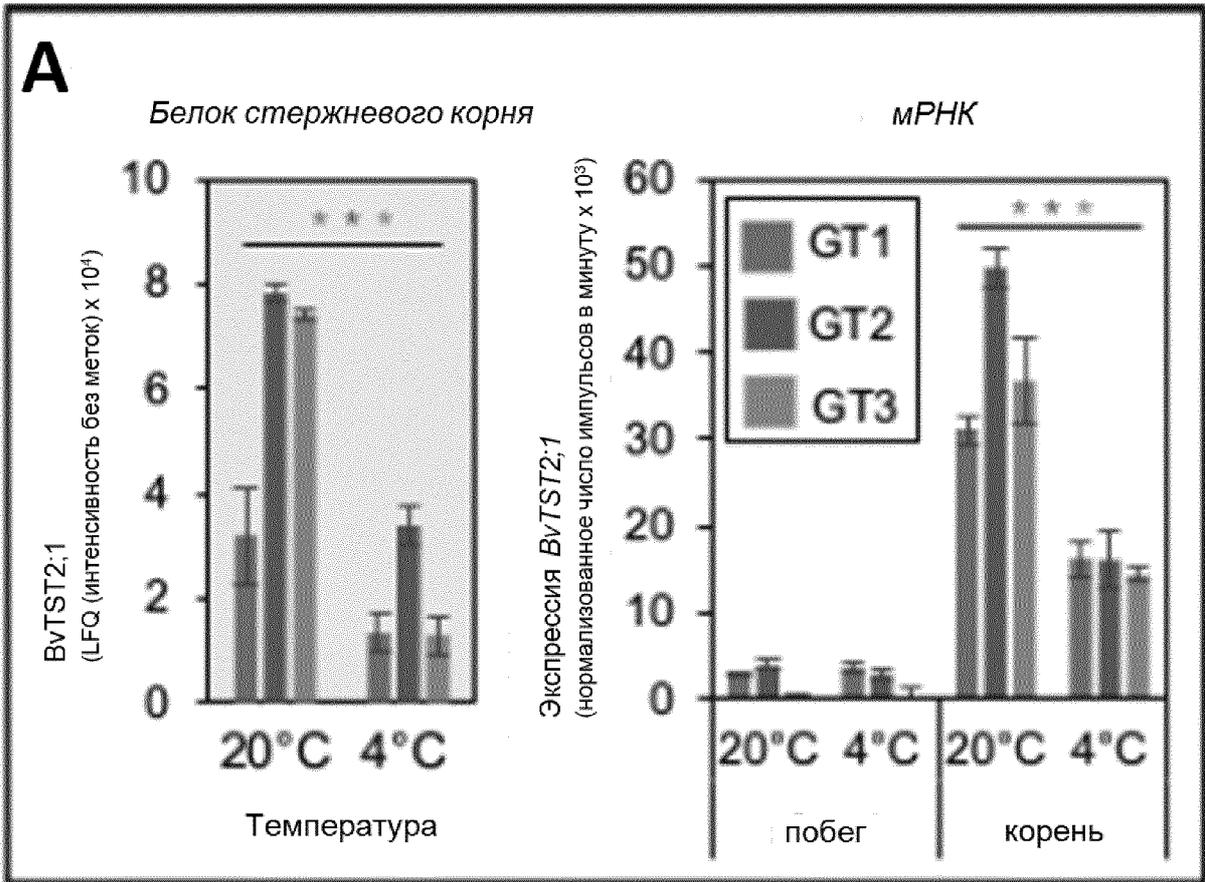
Фиг. 2



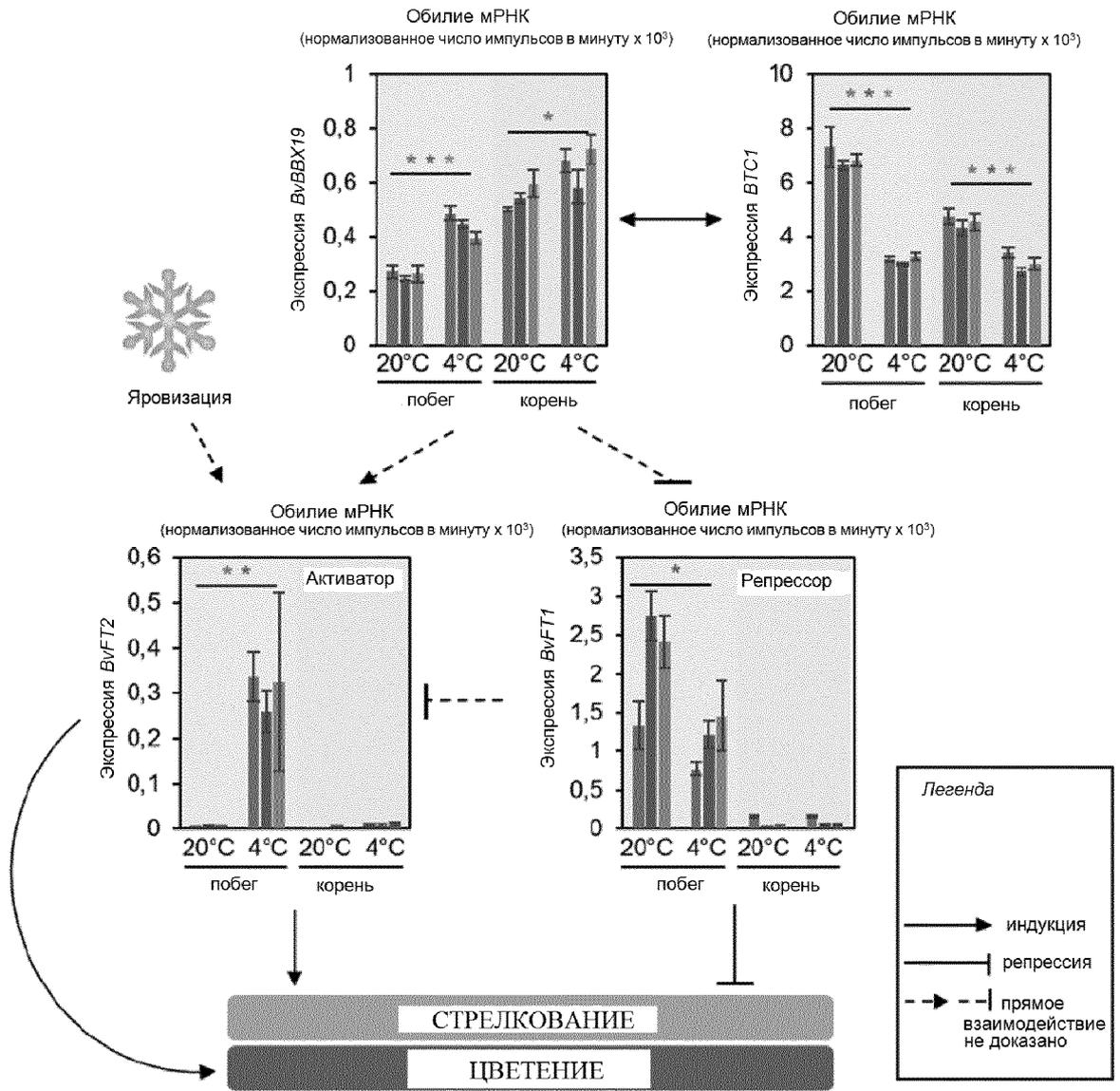
Фиг. 3



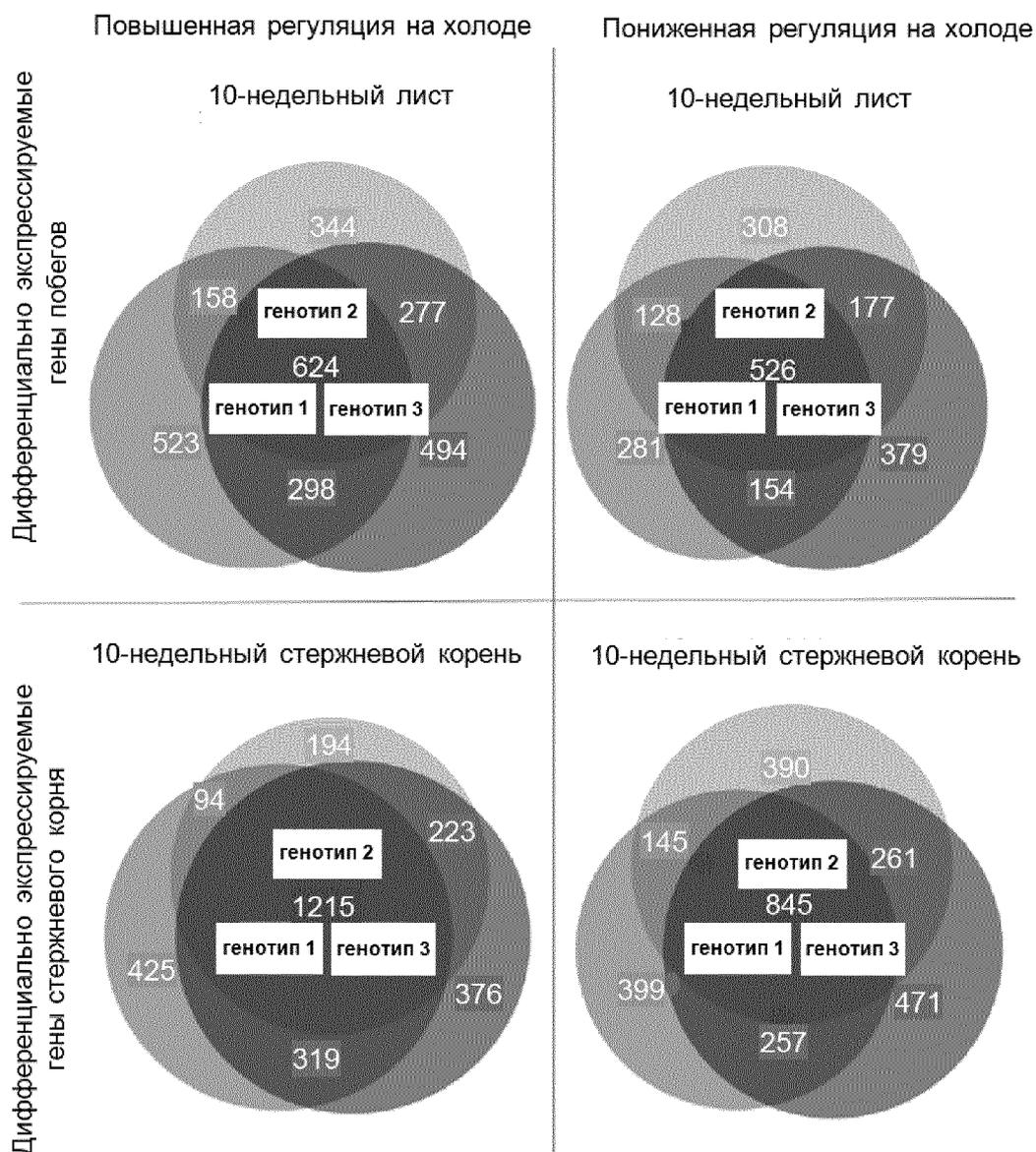
Фиг. 4



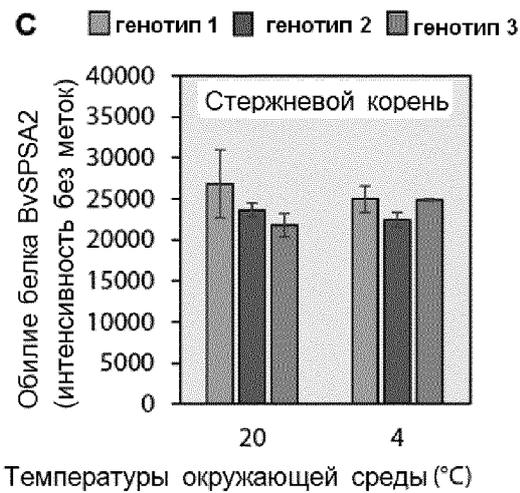
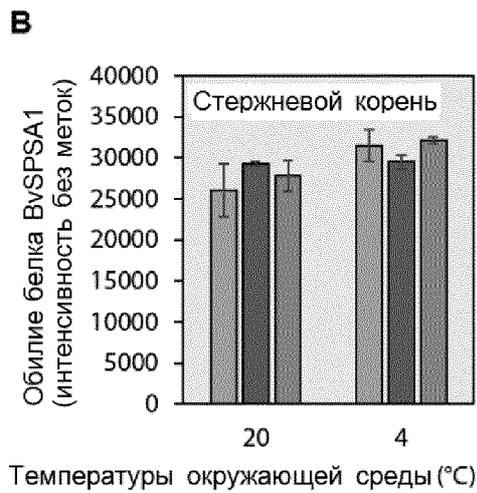
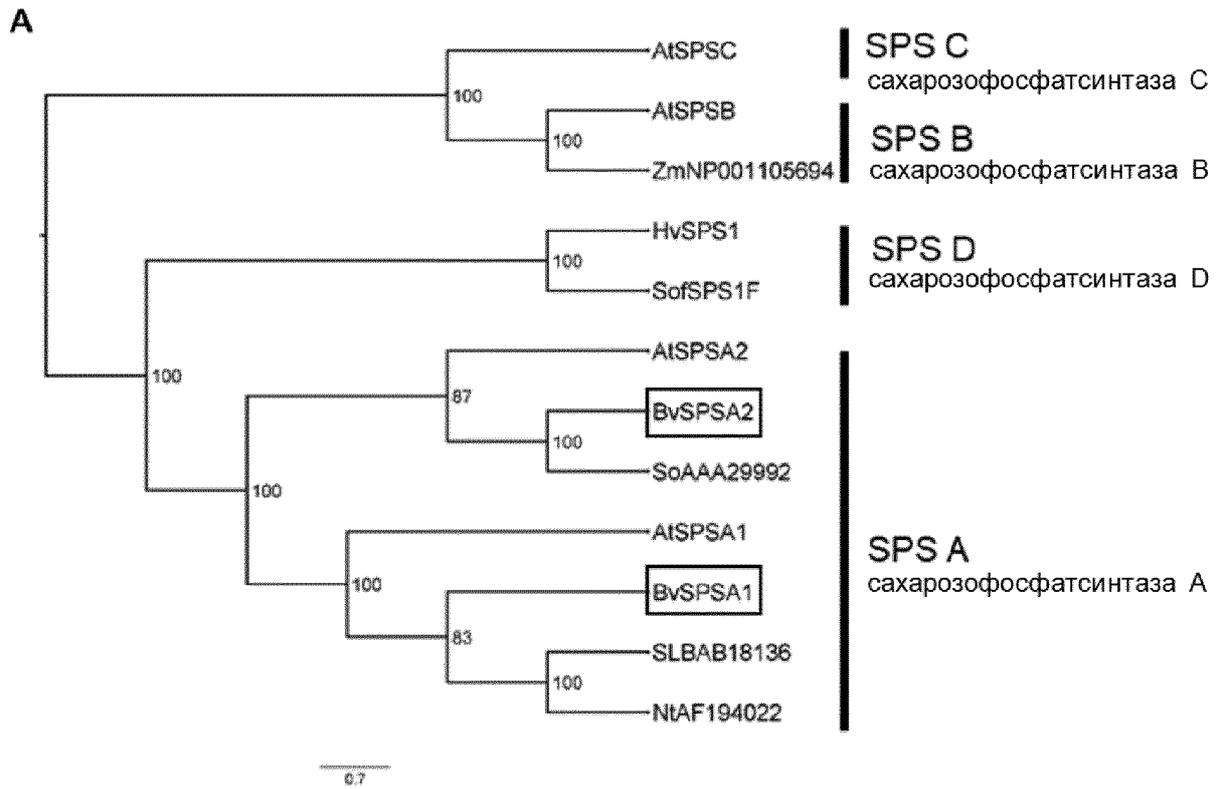
Фиг. 5



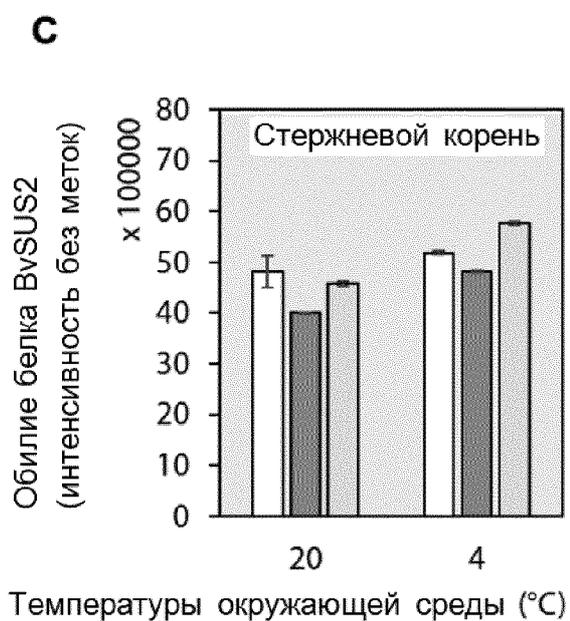
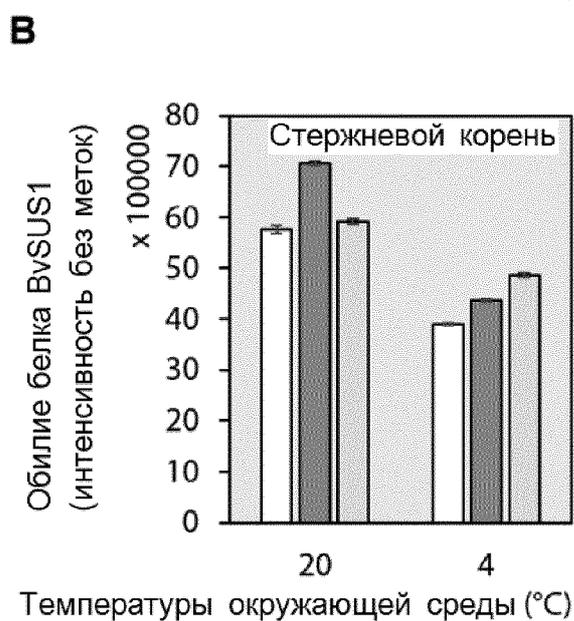
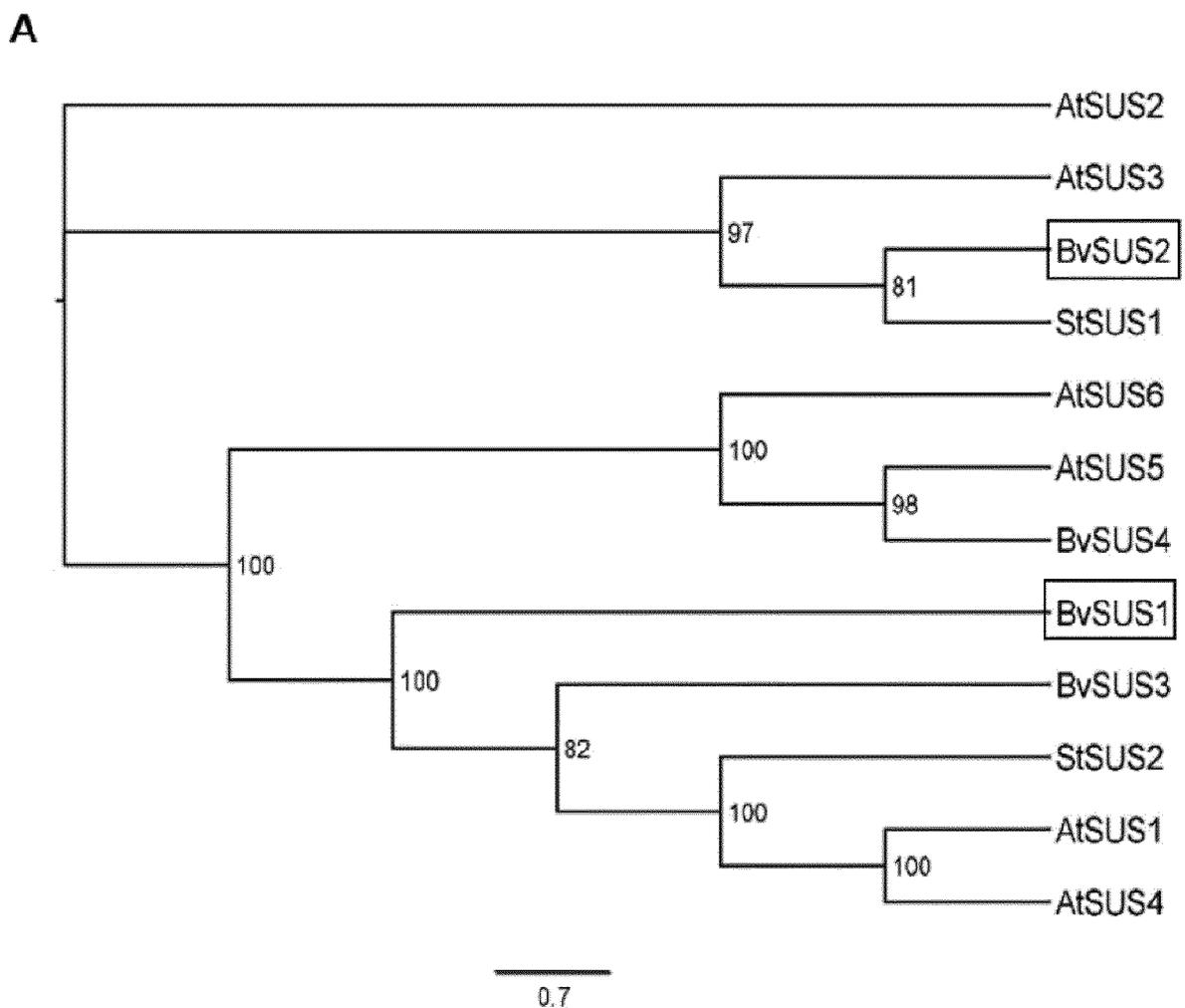
Фиг. 6



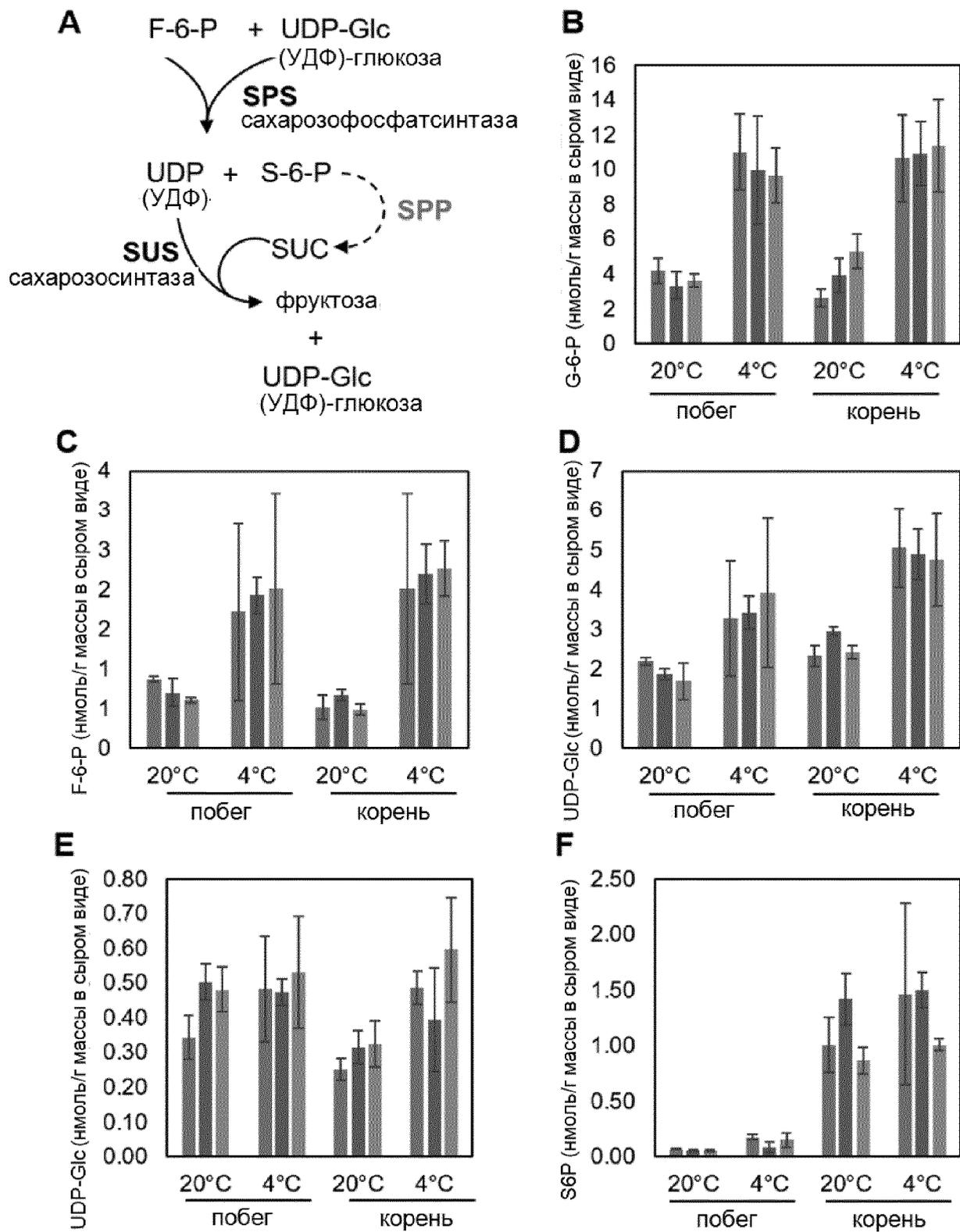
Фиг. 7



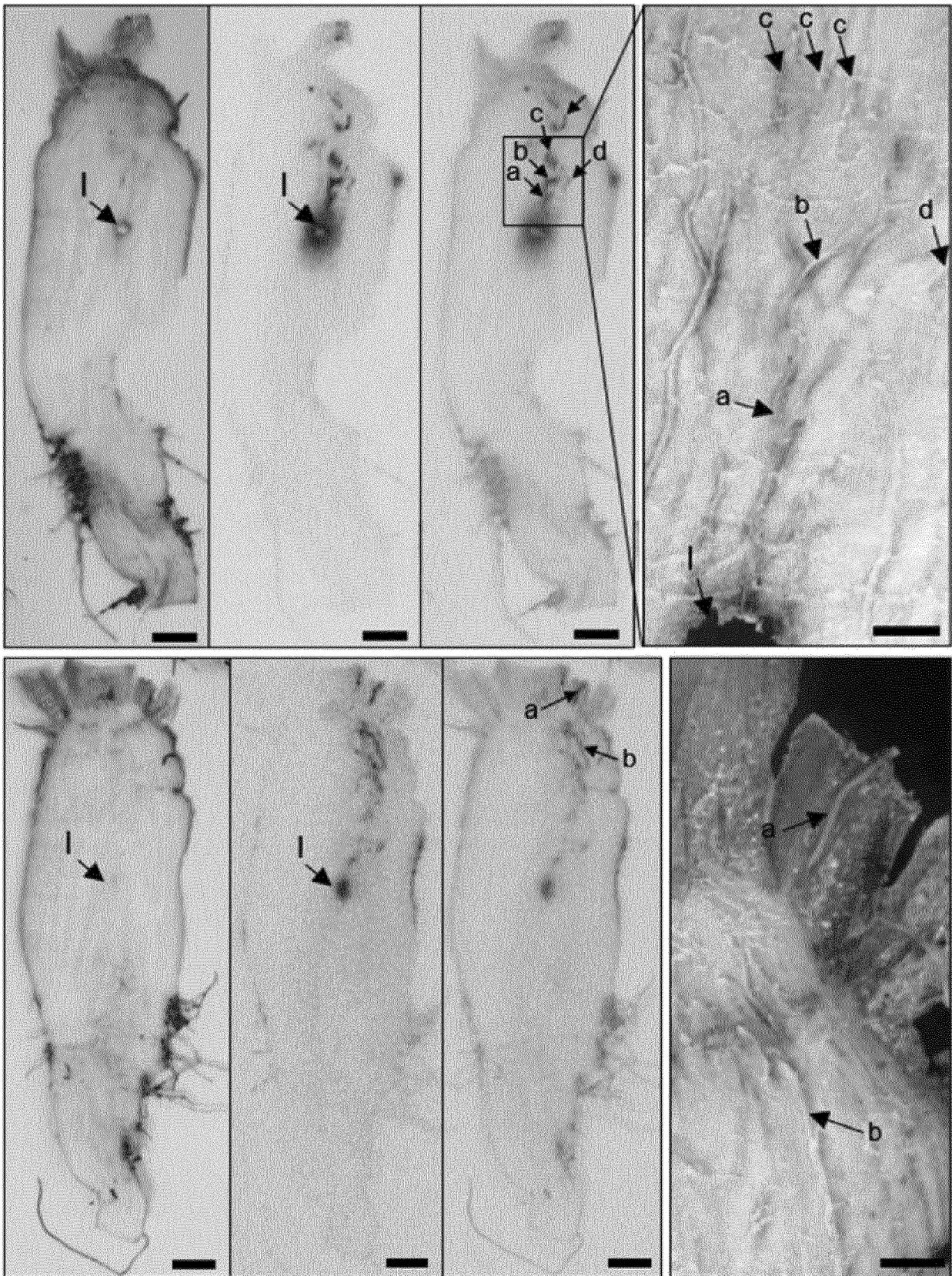
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

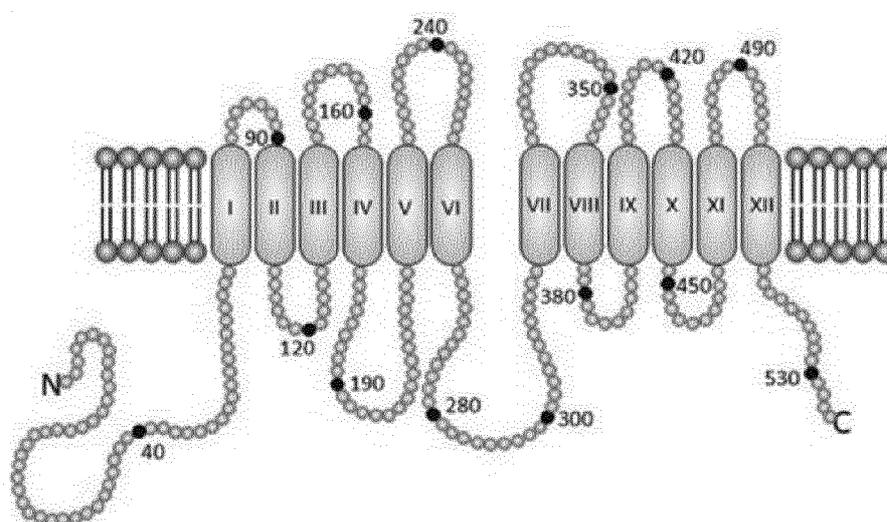


Фиг. 12

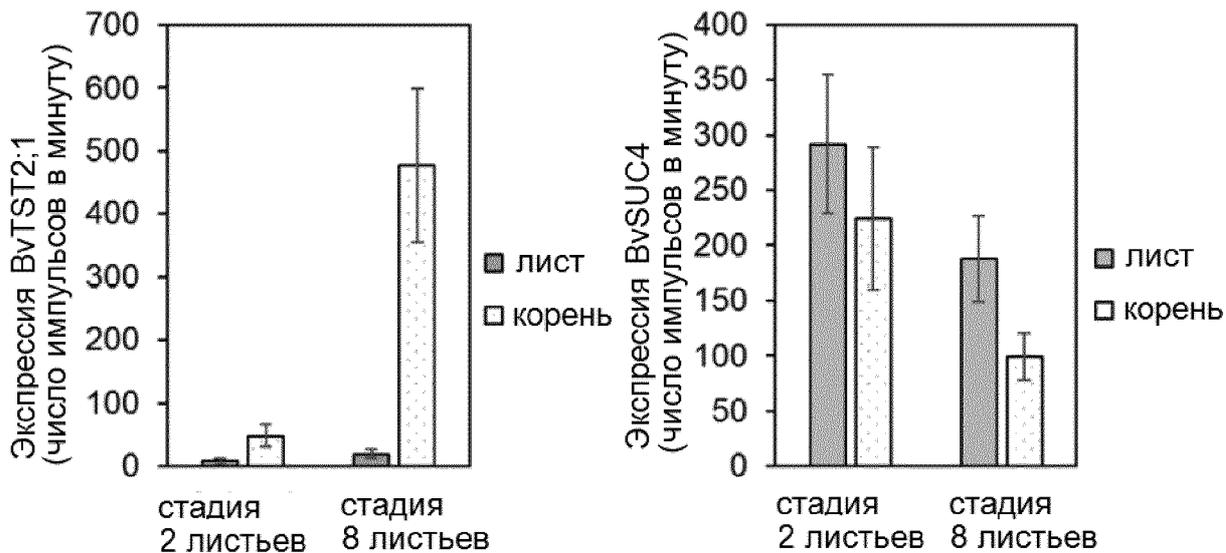


B

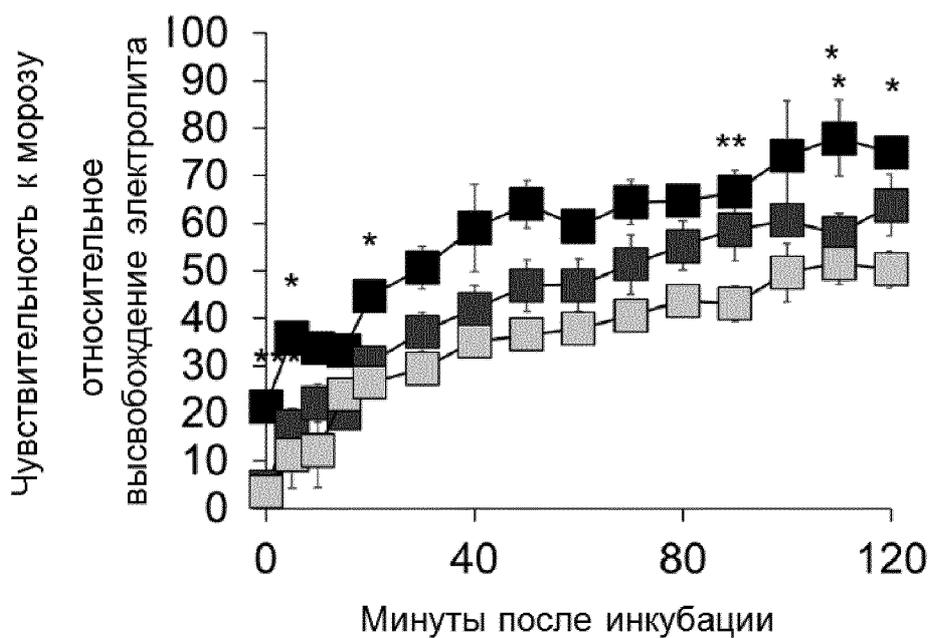
1 MTGQDQNKTEITRETITKPRRQTHSSRQPRPTTRPPPPRFPQPPTRPAR
 51 VPLKLLKVTSVAGGIQFGWALQLSLLTPYVQELGIPHAFASIIWLCGPV
 101 SGFIVQPLVGHISDRSTSRYGRRRPFILAGAAMIIAAVSIVGFSADIGFL
 151 MGDKVDGGERKRPMIAIVVFVIGFWLLDVANNTTQGPCRALLADLTGKDRR
 201 RNRVANAYISLYMAIGNILGFATGSYTSWYITILPFTRTHACSESCANLKS
 251 AFLIDIIFIVITTYISITAAHEVPLNTEGGTGISEGSGQPSGHAEAEFFW
 301 ELFGTFRYLPGPVWIILSVTALTNWIGWFPFLLFDTDWMGREVYGGDPDEG
 351 QIYHRGVSTGALGLMSQSVVLGITSLLMEKLCCKKLGSGILWGISNIINSL
 401 CFVAMLVIAFVLSKADSFSGSGSPNGAVIAAVIVFTILGMPLAVTYSIPY
 451 ALISSRIESLGLGQGLSMGVLNLAIVLPQVIVSLGSGPWDQLFGGGNSPS
 501 IAVAGVASFASGLMAILALPRSRDTSRVHVMHV*



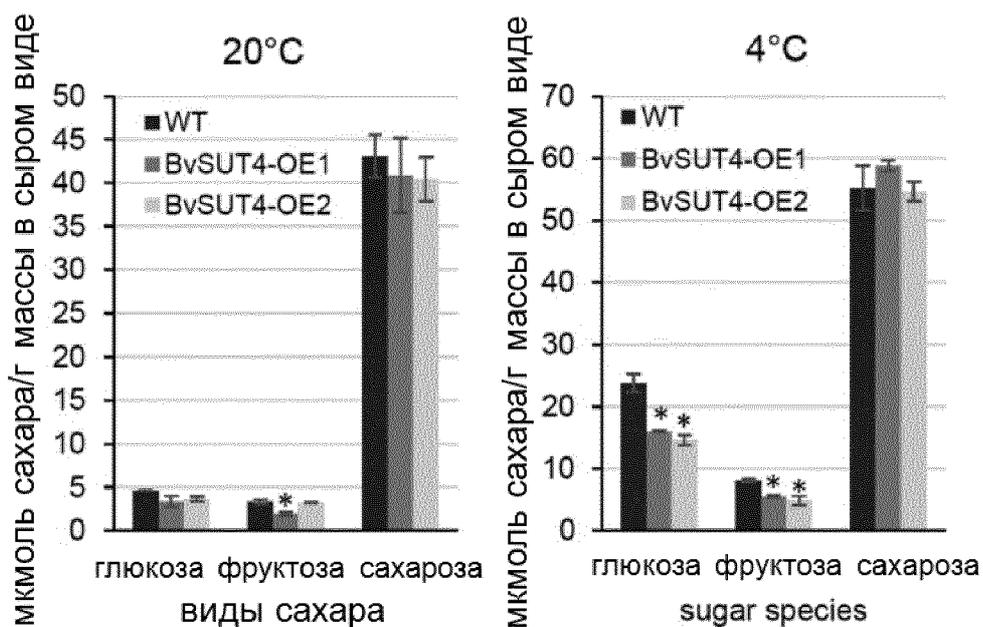
Фиг. 13



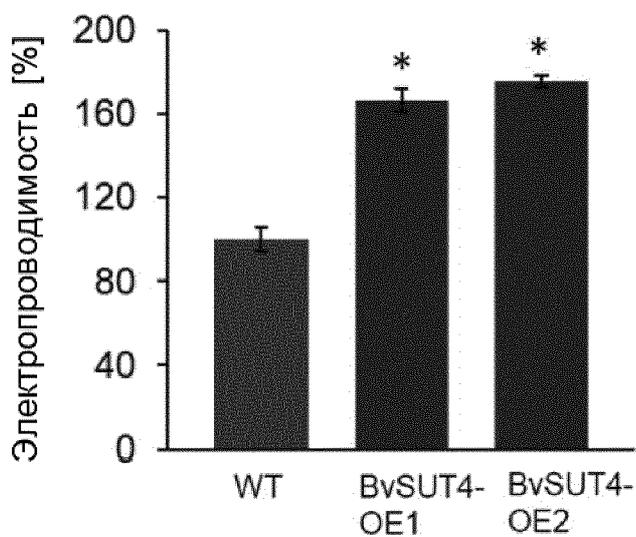
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17