



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.19

(21) Номер заявки
201991711

(22) Дата подачи заявки
2018.01.30

(51) Int. Cl. **C12N 15/82** (2006.01)
A01H 5/10 (2018.01)
C12N 5/04 (2006.01)

(54) ТРАНСГЕННОЕ РАСТЕНИЕ КУКУРУЗЫ, ДЕМОНИСТРИРУЮЩЕЕ ПОВЫШЕННУЮ УРОЖАЙНОСТЬ И ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТЬ

(31) **17153839.0**

(32) **2017.01.30**

(33) **EP**

(43) **2019.12.30**

(86) **PCT/EP2018/052315**

(87) **WO 2018/138386 2018.08.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КВС ЗААТ СЕ & Ко. КГаА (DE)

(72) Изобретатель:
**Пиох Карл, Кох Вольфганг, Мелдау
Штефан (DE)**

(74) Представитель:
Зуйков С.А. (RU)

(56) BEI LI ET AL. "Constitutive expression of cell wall invertase genes increases grain yield and starch content in maize", PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 11, no. 9, 9 August 2013 (2013-08-09), pages 1080-1091, XP055328212, GB ISSN: 1467-7644, DOI: 10.1111/pbi.12102 cited in the application the whole document

ALBACETE ALFONSO ET AL. "Ectopic overexpression of the cell wall invertase gene CIN1 leads to dehydration avoidance in tomato", JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, vol. 66, no. 3, February 2015 (2015-02), pages 863-878, XP002771665, cited in the application the whole document

VON SCHWEINICHEN C ET AL. "Expression of a plant cell wall invertase in roots of Arabidopsis leads to early flowering and an increase in whole plant biomass", PLANT BIOLOGY, WILEY, US, vol. 7, no. 5, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 469-475, XP002568911, ISSN: 1435-8603, DOI: 10.1055/S-2005-865894 [retrieved on 2008-06-28] the whole document

(57) Изобретение касается трансгенного растения кукурузы или его части, содержащего в качестве трансгена нуклеиновую кислоту, способную экспрессировать инвертазу клеточной стенки или ее функциональную часть, предпочтительно инвертазу клеточной стенки вида *Chenopodium rubrum* или ее функциональную часть, и отличающегося тем, что в результате экспрессии инвертазы клеточной стенки или ее функциональной части трансгенное растение кукурузы демонстрирует улучшенную устойчивость к абиотическому стрессу и/или повышенную урожайность; способа получения такого трансгенного растения кукурузы; способа повышения устойчивости растения кукурузы к абиотическому стрессу и/или повышения потенциальной урожайности растения кукурузы; нуклеиновой кислоты, способной экспрессировать инвертазу клеточной стенки или ее функциональную часть, предпочтительно инвертазу клеточной стенки вида *Chenopodium rubrum* или ее функциональную часть; вектора, содержащего такую нуклеиновую кислоту; использования нуклеиновой кислоты или вектора для улучшения устойчивости растения кукурузы к абиотическому стрессу, для повышения потенциальной урожайности растения кукурузы и/или для защиты растения кукурузы от абиотического стресса; а также способа производства этанола или метана из трансгенного растения кукурузы или его части согласно изобретению.

В течение срока жизни растения подвергаются ряду абиотических стрессовых состояний, таких как тепловой стресс, стресс от морозов, стресс при охлаждении, солевой стресс, стресс засухи и т.д. Такие стрессовые условия являются важными ограничивающими факторами для роста и продуктивности растений. Таким образом, воздействие на растения, например, условий жары и/или засухи, как правило, приводит к снижению урожайности растительного материала, такого как листья, семена, плоды и другие съедобные или пригодные для использования продукты. Такое снижение урожайности является важным экономическим фактором для таких значимых с экономической точки зрения растений, как кукуруза, рис или пшеница, а результатом такого снижения урожайности, особенно в слаборазвитых странах, может стать нехватка продовольствия, которая поставит под угрозу снабжение населения продовольствием.

Кукуруза представляет собой культуру, наиболее широко производимую во всем мире. Этот злак выращивается, по меньшей мере, в 164 странах мира с общим объемом производства более 1 миллиарда метрических тонн. Кукуруза выращивается в широтах, охватывающих интервал от экватора до чуть более 50 градусов северной и южной широты, на высотах от уровня моря до более чем 3000 метров, как в прохладном, так и в жарком климате, с циклами выращивания от 3 до 13 месяцев. Следовательно, для обеспечения мирового населения продовольствием важно, чтобы снабжение растениями кукурузы оставалось на высоком уровне. Однако, особенно в регионах с экстремальными погодными условиями, такими как экстремальная жара, экстремальные холода, экстремальная влажность, сильная засуха и т.д., существует опасность того, что не будет обеспечено надлежащее продовольственное снабжение, и эта угроза, с учетом очевидных изменений погоды за последние годы, становится все более критичной. Кроме того, за последние годы возросла важность кукурузы как возобновляемого ресурса, поскольку сжигание таких ресурсов, как нефть, уголь и природный газ способствует потеплению климата на планете, и требуются ресурсы, которые, благодаря их повторному отрастанию, не оказывают неблагоприятного влияния на баланс углекислого газа.

С учетом вышесказанного, существует научная потребность в поставках растений кукурузы и прочих сельскохозяйственных культур, которые выдерживают климатические воздействия во всех формах и прочие абиотические факторы, и способны обеспечивать неизменно высокую урожайность несмотря на жару, похолодание, засуху, засоление, влажность и т.д.

Инвертазы клеточной стенки, также называемые внеклеточными инвертазами, являются важными ферментами, обеспечивающими соответствующий метаболизм, рост и дифференциацию растений. Они действуют путем гидролиза сахарозы в глюкозу и фруктозу за пределами клеток, которые впоследствии импортируются в клетки-мишени моносахаридными транспортерами. Моносахариды служат не только источником углерода и энергии для растений, но также являются ключевыми сигнальными молекулами, которые потенциально регулируют деление клеток, а также рост, дифференциацию, метаболизм и распределение ресурсов у растений. Инвертазы клеточной стенки считаются критически важными для питания акцептирующих тканей углеводами через апопластический путь обмена.

Инвертазы клеточной стенки известны из существующего уровня техники как фактор потенциального увеличения урожайности по зерну и биомассе для определенных растений. Так, например, Li и др. (Li B. et al. *Plant Biotechnology Journal*, 2013, 11, 1080-1091) описывает конститутивную сверхэкспрессию трех генов инвертазы клеточной стенки (AtCWIN1, OsGIF1 и ZmMn1) в растениях трансгенной кукурузы, приводящую к увеличению урожайности по зерну. Schweinichen и Buttner (Schweinichen C. and Buttner M., *Plant Biol. (Stuttg)*, 2005, 7, 469-475) описывает специфичную для корня экспрессию инвертазы клеточной стенки вида *Chenopodium rubrum* в арабидопсис, приводящую к раннему зацветанию и увеличению биомассы всего растения, обусловленных, вероятно, усиленным ростом корня. Albacete A. et al. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66, 863-878 описывает специфичную для плода экспрессию инвертазы клеточной стенки вида *Chenopodium rubrum* в трансгенный помидор, которая может привести к улучшению засухоустойчивости, однако исследователи не наблюдали повышенного веса побегов или площади листьев, т.е. биомассы.

Несмотря на эти успехи по повышению урожайности растений, все еще сохраняется потребность в создании экономически значимых растений, которые дают высокую урожайность по зерну даже в неблагоприятных абиотических условиях.

Для решения этой проблемы авторам настоящего изобретения удалось разработать растения кукурузы, в которых преодолены недостатки предыдущих растений кукурузы в той части, что эти растения кукурузы демонстрируют как повышенную засухоустойчивость, так и увеличенное производство биомассы. Таким образом, авторы настоящего изобретения внедрили инвертазу клеточной стенки вида *Chenopodium rubrum* (CrCIN) в растения кукурузы и обнаружили, что такие растения кукурузы обладают повышенной урожайностью и повышенной засухоустойчивостью.

Данное изобретение описано ниже, со ссылкой на пункты формулы изобретения.

Далее данное изобретение описано подробно. Признаки настоящего изобретения описаны в отдельных абзацах. Это, тем не менее, не означает, что признак, описанный в каком-либо абзаце, существует изолированно от признака или признаков, описанных в других абзацах. Напротив, признак, описанный в абзаце, может быть объединен с признаком или признаками, описанными в других абзацах.

Под термином "содержать/содержащий" в контексте настоящего документа подразумевается

"включать в себя или охватывать" раскрываемые признаки и дополнительные признаки, которые не были упомянуты конкретно. Термин "содержать/содержащий" также подразумевает значение "состоять/состоящий из" указанных признаков, при этом не включая дополнительные признаки, за исключением тех, которые указаны. Таким образом, данный продукт и способ по настоящему изобретению могут характеризоваться дополнительными признаками в дополнение к указанным признакам.

Первый объект изобретения касается трансгенного растения кукурузы, содержащего в качестве трансгена i) нуклеиновую кислоту, способную экспрессировать инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum* (CrCIN) или ее функциональную часть, ii) нуклеиновую кислоту, способную экспрессировать инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum* или ее функциональную часть из поз. i), которая модифицирована путем дегенерации генетического кода, iii) нуклеиновую кислоту, способную экспрессировать инвертазу клеточной стенки или ее функциональную часть, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотную идентичность или, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% аминокислотную гомологичность инвертазе клеточной стенки *Chenopodium rubrum* или ее функциональной части из поз. i), или iv) нуклеиновую кислоту, способную гибридизироваться в строгих условиях с комплементарной последовательностью нуклеиновой кислоты любой из поз. с i) по iii), вследствие чего нуклеиновая кислота из поз. iv) способна экспрессировать инвертазу клеточной стенки, и при этом в результате экспрессии инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональной части, или ее гомолога, трансгенное растение кукурузы демонстрирует улучшенную устойчивость к абиотическому стрессу и/или повышенную урожайность, возможно, в сравнении с эталонным образцом.

В варианте осуществления означенного изобретения такая нуклеиновая кислота получена из нуклеиновой кислоты любой из поз. с i) по iv) путем кодон-оптимизации.

В варианте осуществления означенного выше изобретения нуклеиновая кислота поз. i) содержит последовательность нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 3 или кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

В варианте осуществления означенного выше изобретения трансгенное растение кукурузы содержит в качестве трансгена кассету экспрессии, содержащую нуклеиновую кислоту.

В варианте осуществления означенного выше изобретения нуклеиновая кислота или кассета экспрессии прочно интегрированы в геном растения кукурузы или временно экспрессированы в такое растение кукурузы, например, присутствуют в растении кукурузы в составе какого-либо вектора.

В варианте осуществления означенного выше изобретения экспрессия нуклеиновой кислоты контролируется при помощи промотора, предпочтительно - конститутивного промотора.

В варианте осуществления означенного выше изобретения абиотический стресс выбран из ряда: засуха, засоление, жара или похолодание, и/или урожайность является урожайностью по биомассе или урожайностью по зерну.

Авторы настоящего изобретения неожиданным образом продемонстрировали, что инвертаза клеточной стенки *Chenopodium rubrum* эффективна в повышении устойчивости растения кукурузы к стрессу от засухи и/или увеличении урожайности растения кукурузы. Это неожиданно еще и потому, что авторы настоящего изобретения также продемонстрировали, что тот же самый ген, введенный в растения пшеницы, не был эффективен в увеличении урожайности по биомассе или по зерну. Это показывает, что эффект инвертазы клеточной стенки вообще и инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, в частности, в гетерологичных условиях не предсказуем.

Таким образом, путем введения гена, кодирующего инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, авторам настоящего изобретения удалось повысить устойчивость растения кукурузы к абиотическому стрессу и/или увеличить (по биомассе) урожайность растения кукурузы при нормальных и/или стрессовых условиях. В частности, авторы настоящего изобретения показали, что ген, кодирующий инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, введенный в растение кукурузы, был экспрессирован, и экспрессия гена привела к усиленному образованию листьев, развитию более высоких растений и появлению растений кукурузы с более высокой засухоустойчивостью в сравнении с эталонным образцом.

Трансгенное растение кукурузы по настоящему изобретению экспрессирует инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum* (CrCIN). Ген, кодирующий инвертазу клеточной стенки CIN1 и полученный из вида *Chenopodium rubrum*, известен из уровня техники и, например, характеризуется учетным номером, доступным в базе данных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации; Национальная библиотека медицины - 38А, Бетесда, Мэриленд, 20894, США; www.ncbi.nih.gov): учетный номер X81792.1 (SEQ ID NO: 1), кодирующий белок с учетным номером CAA57389.1 (SEQ ID NO: 2). Инвертаза клеточной стенки *Chenopodium rubrum* и ген, кодирующий инвертазу клеточной стенки, не ограничены последовательностями SEQ ID NO: 1 и 2, а включают в себя любую инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, естественным образом экспрессированную видом *Chenopodium rubrum*, а также ген, кодирующий инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*. Кроме того, трансгенное растение кукурузы по настоящему изобретению содержит нуклеиновую кислоту, которая экспрессирует "гомолог" инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum*. "Гомолог", как определено в настоящем документе, представляет собой инвертазу клеточной стенки, которая имеет аминокислотную идентичность с инвер-

тазой клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, для примера идентифицируемой SEQ ID NO: 2, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или которая имеет аминокислотную гомологичность с инвертазой клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, для примера идентифицируемой SEQ ID NO: 2, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. Соответственно, понятие "аминокислотная гомологичность" относится к идентичным или гомологичным аминокислотам. Гомологичные аминокислотные остатки имеют сходные химико-физические свойства, например, аминокислоты, принадлежащие к одной и той же группе: ароматические (Phe, Trp, Tyr), кислотные (Glu, Asp), полярные (Gln, Asn), основные (Lys, Arg, His), алифатические (Ala, Leu, Ile, Val), с гидроксильной группой (Ser, Thr) или с короткими боковыми цепями (Gly, Ala, Ser, Thr, Met). Предполагается, что замены между такими гомологичными аминокислотами не изменяют фенотип белка (консервативные замены). В качестве альтернативы, "гомолог" представляет собой инвертазу клеточной стенки, которая кодируется нуклеиновой кислотой, способной гибридизоваться в строгих условиях с комплементарной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, такую как идентифицируемая SEQ ID NO: 2, или с комплементарной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей инвертазу клеточной стенки, которая имеет аминокислотную идентичность или аминокислотную гомологичность инвертазе клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, такой как идентифицируемая выше.

Инвертаза клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, такая как идентифицируемая SEQ ID NO: 2, или ее гомолог, придает растению кукурузы повышенную устойчивость к абиотическому стрессу, и/или растение кукурузы, несущее нуклеиновую кислоту, кодирующую инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, такую как идентифицируемая SEQ ID NO: 2, или ее гомолог, имеет повышенную урожайность, как вариант, в сравнении с эталонным образцом. Предпочтительно, инвертаза клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, такая как идентифицируемая SEQ ID NO: 2, или ее гомолог, не способны придать растению пшеницы, в котором она была трансформирована, устойчивость к абиотическим стрессам и/или повышенную урожайность растения пшеницы, а точнее, инвертаза клеточной стенки *Chenopodium rubrum* или ее гомолог могут оказаться неспособными обеспечить увеличение высоты растения пшеницы или урожайности по зерну.

В контексте настоящего документа термин "функциональная часть" инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum* или ее гомолога относится к любой части белка, который имеет такую же активность, как и инвертаза клеточной стенки *Chenopodium rubrum* полной длины, такая как идентифицируемая SEQ ID NO: 2, а именно, функциональная часть гидролиза сахарозы в глюкозу и фруктозу. Кроме того, функциональная часть придает растению кукурузы повышенную устойчивость к абиотическому стрессу и/или растение кукурузы, несущее такую функциональную часть, имеет повышенную урожайность, как вариант, в сравнении с эталонным образцом. Предпочтительно, функциональная часть может оказаться не способной придать растению пшеницы, в котором она была трансформирована, устойчивость к абиотическим стрессам и/или повышенную урожайность растения пшеницы, а точнее, функциональная часть может оказаться неспособной обеспечить увеличение высоты растения пшеницы или урожайности по зерну.

В контексте настоящего документа термин "растение кукурузы" означает любое растение вида *Zea mays*.

В контексте настоящего документа термин "нуклеиновая кислота" может подразумевать любую ДНК или РНК, или гибрид ДНК и РНК. Предпочтительно, ДНК является двухнитевой. Она может являться геномной ДНК, содержащей интронные последовательности и, возможно, регуляторные последовательности в области 5' и/или 3', или кДНК без интронных последовательностей. Термин "нуклеиновая кислота" в контексте настоящего документа включает в себя нуклеиновые кислоты, которые кодируют инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum* или их функциональные части, или их гомологи, в значении термина, приведенном выше. Кроме того, термин "нуклеиновая кислота" включает в себя нуклеиновую кислоту, которая модифицирована дегенерацией генетического кода нуклеиновой кислоты, кодирующую естественно присутствующую инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*.

В контексте настоящего документа термин "нуклеиновая кислота" также включает в себя часть нуклеиновой кислоты, кодирующей инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum* или ее гомолог, вследствие чего такая часть нуклеиновой кислоты кодирует функциональную часть инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum* или ее гомолог, в значении термина, приведенном выше.

Термин "дегенерация генетического кода" относится к вырождению кодонов (термин, известный из уровня техники) и означает избыточность генетического кода, проявляющуюся в виде множественности комбинаций кодонов трехосновных пар, которые определяют данную аминокислоту. Следовательно, такой кодон, кодирующий аминокислоту, может быть специфично изменен без изменения аминокислоты. Результатом этого является множество нуклеиновых кислот, кодирующих одну и ту же инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*.

Процент "идентичности последовательности" или "гомологичности последовательности" в контексте настоящего документа относится к проценту аминокислотных остатков, которые являются, соответственно, идентичными или гомологичными в соответствующих положениях в двух оптимально выров-

ненных последовательностях. Этот процент определяется путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, где фрагмент аминокислотной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (например, выпадения или выступы) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавления или делеции), для оптимального выравнивания двух последовательностей. Такой процент рассчитывается путем определения количества положений, в которых идентичный или гомологичный аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях, для получения числа совпадающих положений, деления такого количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения полученного результата на 100, что на выходе дает процент идентичности последовательности. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено при помощи алгоритма локальной гомологии разработки Smith T.F. и Waterman M.S., Add APL Math, 1981, 2, 482-489, а также при помощи алгоритма выравнивания областей гомологии разработки Needleman S.B. и Wunsch C. D., J. Mol. Biol., 1970, 48, 443-453, способа поиска сходства разработки Pearson W.R. и Lipman D. J., PNAS, 1988, 85, 2444-2448, алгоритма разработки Karlin S. и Altschul S.F., PNAS, 1990, 87, 2264-2268, модифицированного Karlin S. и Altschul S.F., PNAS, 1993, 90, 5873-5877, или при помощи компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA и TFASTA в составе программного пакета Wisconsin Genetics разработки компании Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), или путем обследования. Для определения оптимального выравнивания предпочтительно использовать программные модули GAP и BESTFIT. Как правило, могут использоваться значения по умолчанию: 5,00 для штрафа за делецию и 0,30 для штрафа за продолжение делеции.

В контексте настоящего документа термин "гибридизировать/гибридирующий" относится к образованию гибрида между двумя молекулами нуклеиновой кислоты посредством спаривания оснований комплементарных нуклеотидов. Термин "гибридизировать в строгих условиях" означает гибридизацию в конкретных условиях. Пример таких условий включает в себя условия, при которых комплементарная, по существу, нить, такая как нить, состоящая из нуклеотидной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% комплементарность, гибридизуется с данной нитью, тогда как менее комплементарная нить не гибридизуется. В качестве альтернативы, такие условия относятся к специфичным условиям гибридизации по концентрации натриевой соли, температуры и условиям промывки. В качестве примера, крайне строгие условия включают в себя инкубацию при 42°C, 50% формамид, 5 x SSC (150 ммоль NaCl, 15 ммоль тринатрийцитрата), 50 ммоль фосфата натрия, 5 x раствор Денхардта, 10 x декстрансульфат, 20 мг/мл нуклеиновая кислота семени лосося с разрывами, полученными сдвигом, и промывание 0,2 x SSC при температуре около 65°C (SSC соответствует буферу с 0,15 моль хлорида натрия и 0,015 моль тринатрийцитрата). В качестве альтернативы, такие крайне строгие условия могут означать гибридизацию при температуре 68°C в 0,25 моль фосфата натрия, pH 7,2; 7% SDS, 1 ммоль EDTA и 1% BSA в течение 16 часов и двойное промывание при помощи 2 x SSC и 0,1% SDS при температуре 68°C. В дополнительном альтернативном варианте, крайне строгими условиями гибридизации являются, например: Гибридизация в 4 x SSC при температуре 65°C с последующим многократным промыванием в 0,1 x SSC при температуре 65°C с общей продолжительностью около 1 часа, или гибридизация при температуре 68°C в 0,25 моль фосфата натрия, pH 7,2; 7% SDS, 1 ммоль EDTA и 1% BSA в течение 16 часов и последующее двойное промывание при помощи 2 x SSC и 0,1% SDS при температуре 68°C.

Авторы настоящего изобретения показали, что нуклеиновая кислота, кодирующая инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональную часть, или ее гомолог, может быть экспрессирована в растении кукурузы. Экспрессированная инвертаза клеточной стенки придает растению кукурузы повышенную устойчивость к абиотическому стрессу и/или такое растение кукурузы демонстрирует повышенную урожайность. "Устойчивость к абиотическому стрессу" означает, что введение и экспрессия инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональной части, или ее гомолога в растении кукурузы делает такую кукурузу менее восприимчивой к неблагоприятным абиотическим условиям, в результате чего типичные симптомы стресса из-за неблагоприятных абиотических факторов не возникают, или возникают, но в меньшей степени, чем в эталонном образце. В дополнительном или альтернативном варианте, введение и экспрессия инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональной части, или ее гомолога в растении кукурузы увеличивает урожайность растения кукурузы, как вариант, в сравнении с эталонным образцом. "Повышенная урожайность" в контексте настоящего документа означает, что трансгенное растение кукурузы демонстрирует повышенную скорость роста при нормальных условиях, которые не вызывают стресс у растения, или в условиях абиотического стресса, как вариант, в сравнении с эталонным образцом. В понятие повышенной скорости роста входит увеличение производства массы всего растения или его части, такое как увеличение производства массы надземной части растения, например, стебля, листьев, соцветий, початков и/или зерен и т. д., и/или увеличение производства массы подземной части растения. "Повышенное производство массы" может включать в себя любую часть трансгенного растения кукурузы и относится, в частности, к стеблю, листьям, початкам и/или зернам. "Повышенная урожайность" также включает в себя длительный рост и выживаемость, что также приводит к увеличению производства массы.

В контексте настоящего документа термин "эталонный образец" может относиться к растению кукурузы того же генотипа, что и трансгенное растение кукурузы по настоящему изобретению, причем такой эталонный образец не содержит трансген, кодирующий инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональную часть, или ее гомолог. Эксперименты с эталонным образцом, включающие в себя (а) эталонный образец растения(-й) кукурузы, могут быть проведены параллельно с экспериментами для тестирования свойств трансгенного растения кукурузы по настоящему изобретению. Однако эксперименты с эталонным образцом могут также проводиться в другой момент времени в сопоставимых условиях, а их результаты могут сравниваться после завершения всех экспериментов. В качестве альтернативы, "эталонный образец" может быть конкретным (предварительно) заданным показателем урожайности или какого-либо симптома, таким как процент листьев, продемонстрировавших симптом скручивания в условиях засухи, который характеризует растение кукурузы как растение, имеющее устойчивость к фактору абиотического стресса или как растение, не имеющее устойчивости к фактору абиотического стресса. Например, эталонный показатель может быть уже заданным показателем или общепринятым показателем, который предоставляет квалифицированному специалисту пороговый показатель и помогает ему/ей принять решение о том, что трансгенное растение кукурузы является или не является устойчивым к фактору абиотического стресса, или что оно имеет повышенную урожайность, в зависимости от того, находится ли показатель трансгенного растения кукурузы ниже или выше такого эталонного показателя. Исходя из такого эталонного показателя (например, количества листьев с признаками скручивания), квалифицированный специалист может затем идентифицировать растение кукурузы как устойчивое к фактору стресса, если количество листьев с признаками скручивания у такого растения кукурузы меньше эталонного показателя, или как имеющее повышенную урожайность, если такое растение кукурузы демонстрирует урожайность, превышающую эталонный показатель. Таким образом, растение(-я) кукурузы, используемое для установления эталонного показателя, не обязательно является, но может являться растением кукурузы того же генотипа, что и трансгенное растение кукурузы. Например, эталонным растением(-ями) кукурузы может быть (а) растение(-я) кукурузы, которое имеет степень устойчивости к абиотическому стрессовому фактору, отражающую среднюю степень устойчивости популяции растений кукурузы, адаптированной к конкретной окружающей среде. Специалист, желающий разработать растение кукурузы, лучше адаптированное к конкретной окружающей среде, может использовать этот показатель в качестве эталона и разработать трансгенное растение кукурузы, которое демонстрирует лучший показатель и, следовательно, лучше адаптировано к конкретной окружающей среде. Или эталонным растением(-ями) кукурузы может быть (а) растение(-я) кукурузы с определенной степенью устойчивости к фактору абиотического стресса, и задачей является создание трансгенного растения кукурузы, которое имеет более высокую степень устойчивости к абиотическому фактору. Аналогичным образом, специалист может пожелать разработать трансгенное растение кукурузы с высокой урожайностью в определенных условиях и может использовать сравнение с эталонным показателем, чтобы определить, соответствует ли такое трансгенное растение кукурузы задаче.

Для определения того, демонстрирует ли трансгенное растение кукурузы "устойчивость к абиотическому стрессу" или "повышенную урожайность", согласно способам, известным из уровня техники, может быть определена экспрессия транскрипта CrCIN и/или белка, и/или уровень экспрессии трансгена. Таким образом, определение того, обладает ли трансгенное растение кукурузы, несущее инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональную часть, или ее гомолог, устойчивостью к абиотическому стрессу или повышенной урожайностью, не обязательно требует сравнения с эталонным образцом. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что введение и экспрессия инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum* приводит к повышению урожайности и повышенной устойчивости к факторам абиотического стресса, как показано в иллюстративной части настоящего описания.

Термины "абиотический стресс" или "условия абиотического стресса" относятся к стрессовым условиям для растения кукурузы, возникающим из-за абиотических, то есть не связанных с живой природой, факторов. Такие абиотические факторы включают в себя засуху, засоление (концентрацию соли), жару или похолодание. Хотя и нежелательно ограничиваться нижеследующим, можно предположить, что эффект инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональной части, или ее гомолога в растении кукурузы связан с увеличением углеводного пула, который образуется вследствие повышенной активности инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональной части, или ее гомолога в растении кукурузы, где такой фермент сверхэкспрессирован. Сахара, которые, как общеизвестно, оказывают защитное действие против осмотического стресса, могут приводить к образованию молекулярного клеточного фенотипа в растении кукурузы, который защищает растение кукурузы от стрессовых условий, таких как засуха, засоление и/или тепловой режим, в которых осмотические явления играют некоторую роль. Кроме того, сахара, которые, как общеизвестно, обладают защитным эффектом от воздействия температуры похолодания или замерзания, могут приводить к образованию молекулярного клеточного фенотипа, который защищает растение кукурузы от стрессовых условий, таких как похолодание.

В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения нуклеиновая кислота, содержащаяся в растении кукурузы согласно настоящему изобретению, является кодон-оптимизированной. По-

сле того, как для трансформации растения кукурузы выбрана инвертаза клеточной стенки, кодоны могут быть модифицированы и адаптированы к специфическим требованиям хозяина, чтобы максимально усилить экспрессию. Специалистам в данной области техники известна кодон-оптимизация нуклеиновой кислоты для экспрессии в гетерологичных клетках-хозяевах. Существует множество коммерческих поставщиков, которые разработали алгоритмы, учитывающие соответствующие параметры оптимизации транскрипции и трансляции, и поставляют последовательность нуклеиновой кислоты, приспособленную к требованиям нуклеиновой кислоты и хозяина. Например, кодон-оптимизация может осуществляться с помощью программного обеспечения GeneOptimizer™, GeneArt, ThermoFisher Scientific. Предпочтительной нуклеиновой кислотой, которая входит в объем настоящего изобретения, является кодон-оптимизированная последовательность SEQ ID NO: 3, полученная от SEQ ID NO: 1, кодирующей полипептид SEQ ID NO: 4. Эти кодоны специально адаптированы к использованию кодона в растении кукурузы.

Термин "экспрессия" или "экспрессирование" означает (1) транскрипцию нуклеиновой кислоты, которая входит в объем настоящего изобретения, в РНК или мРНК и/или (2) трансляцию РНК или мРНК в инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональную часть, или ее гомолог.

В контексте настоящего документа термин "кассета экспрессии" означает молекулу нуклеиновой кислоты, которая состоит из одной или нескольких открытых рамок считывания или генетических последовательностей, которые экспрессированы в (а) белок (белки) растения кукурузы, в которое была введена кассета экспрессии, и регуляторный элемент(ы) в положении 5' и, как вариант, 3', контролирующий их экспрессию. Таким образом, кассета экспрессии может содержать регуляторную последовательность промотора, а также назначенный промотор, функционально связанные с открытой рамкой считывания, или другую генетическую последовательность, а также 3' терминаторную регуляторную область, которая может содержать сайт полиаденилирования. Этот промотор направляет механизм клетки на создание РНК и/или белка. Регуляторный элемент(ы) может происходить из нуклеиновой кислоты инвертазы клеточной стенки, которая вводится в растение кукурузы, или может происходить из разных генов, при условии, что такой регуляторный элемент(ы) способен функционировать в растении кукурузы. Кроме того, регуляторный элемент(ы) в положении 5' может быть получен из того же гена, что и регуляторный элемент(ы) в положении 3', или может быть получен из разных генов. В контексте настоящего документа термин "функционально связанный" означает, что экспрессия связанных последовательностей нуклеиновых кислот происходит в растении кукурузы. Кассета экспрессии может быть частью вектора, используемого для клонирования и введения нуклеиновой кислоты в клетку.

Для введения молекулы нуклеиновой кислоты, способной экспрессировать инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее гомолог, или ее функциональную часть, в клетку, молекула нуклеиновой кислоты или кассета экспрессии, несущая нуклеиновую кислоту, может быть вставлена в вектор. Специалистам в данной области техники известны векторы, несущие молекулу нуклеиновой кислоты. В дополнение к молекуле нуклеиновой кислоты вектор может содержать регуляторный элемент(ы) в положении 5' и, как вариант, 3', которые способны функционировать в растении кукурузы. Регуляторный элемент(ы) предпочтительно является гетерологичным по отношению к инвертазе клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональной части, или ее гомологу. Таким образом, вектор может содержать регуляторную последовательность промотора, функционально связанную с молекулой нуклеиновой кислоты, и, как вариант, терминаторную регуляторную последовательность. Предпочтительно, такой вектор является челночным вектором для трансформации в бактериях *Agrobacterium tumefaciens* и последующего переноса молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональной части, или ее гомолога, в клетки растения кукурузы путем инфицирования растения кукурузы трансформированными бактериями *Agrobacterium tumefaciens*. Более предпочтительно, когда вектор представляет собой бинарный вектор, который является стандартным средством трансформации высших растений с промежуточным звеном в виде бактерий *Agrobacterium tumefaciens*. Он состоит из границ Т-нуклеиновой кислоты, множественных сайтов клонирования, функций репликации для *Escherichia coli* и *Agrobacterium tumefaciens*, селективируемых маркерных генов, репортерных генов и других вспомогательных элементов, которые могут повысить эффективность и/или дать системе дополнительные возможности. Другим более предпочтительным вектором является супербинарный вектор, который несет дополнительные гены вирулентности из Ti-плазмиды и демонстрирует очень высокую частоту трансформации, что ценно для эволюционно стабильных растений, таких как злаки. В современном уровне техники известен ряд полезных векторов. Особо предпочтительным является бинарный вектор, который содержит убиквитиновый промотор кукурузы (например, US 5,510,474 A, US 6,020,190 A, US 6,054,574 A, US 6,878,818 B1, US 6,977,325 B2) и терминаторная последовательность нопалин-синтазы *Agrobacterium tumefaciens* или терминаторная последовательность 35S вируса мозаики цветной капусты в качестве регуляторных последовательностей транскрипции, и предпочтительно удлиненный гербицидом ген устойчивости (например, ген *pat* для придания устойчивости к Basta (например, US 7,112,665 B1)) и/или ген устойчивости к спектиномицину в качестве селективируемых маркерных генов.

Согласно данному изобретению, термин "регуляторная последовательность промотора" или "про-

мотор" предназначен для обозначения любого промотора гена, который может быть экспрессирован в растении кукурузы. Такой промотор может представлять собой промотор, который естественным образом экспрессируется в растении кукурузы или имеет грибковое, бактериальное или вирусное происхождение. Этот промотор может включать в себя конститутивный промотор, тканеспецифичный промотор или индуцируемый промотор, вследствие чего предпочтительной является конститутивная экспрессия. В современном уровне техники известен ряд подходящих промоторов. Например, конститутивный промотор, используемый в данном изобретении, представляет собой промотор убиквитин из кукурузы. Другим промотором является промотор Act-1 из риса (например, US 5,641,876 A). Промотор NCR из вируса хлоротической крапчатости сои (SoyCMV) (Hasegawa, A., et al. "Полная последовательность ДНК вируса хлоротической крапчатости сои и идентификация нового промотора" *Nucleic acids research* 17.23 (1989): 9993-10013.) также показал, что он может быть полезен для однодольных растений. Другими полезными промоторами являются промотор 35S CaMV (Franck A. et al., 1980, *Cell* 21:285-294) и промотор 19S CaMV из вируса мозаики цветной капусты (US 5,352,605; WO 84/02913) или растительные промоторы, как те, что были получены из малой субъединицы Rubisco (US 4,962,028).

Промотор, используемый в способе по данному изобретению, может быть индуцируемым промотором. Индуцируемый промотор представляет собой промотор, который способен прямо или косвенно активировать транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты в ответ на индуктор. В отсутствие индуктора последовательность нуклеиновой кислоты транскрибироваться не будет. Может быть желательной индуцируемая экспрессия. Стимулы для индуцируемых промоторов имеют различный вид и включают в себя условия окружающей среды, такие как свет, температура и/или условия абиотического стресса, такие как водный стресс, стресс засоления, стресс холода или стресс жары. Другими типами стимулов для индуцируемых промоторов являются гормоны (например, гиббереллин, абсцизовая кислота, жасмоновая кислота, салициловая кислота, этилен, ауксин) или химические вещества (тетрациклин, дексаметазон, эстрадиол, медь, этанол и бензотиадиазол). Таким образом, экспрессия инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функционального фрагмента, или ее гомолога в конкретных индуктивных условиях, предпочтительно в условиях абиотического стресса, приводит к защите растения кукурузы путем предотвращения симптомов стресса и создания возможности для формирования массы. Индуцируемыми промоторами являются, например, промоторы, индуцируемые бензилсульфонамидом (EP 0 388 186), индуцируемые тетрациклином Gatz C. et al., *Plant J.* 2, 1992: 397-404), индуцируемые абсцизовой кислотой (EP 0 335 528) либо этанолом или циклогексенолом (WO 93/21334).

В дополнение к последовательности промотора, кассета экспрессии или вектор также могут содержать терминатор позади структурного гена для обеспечения эффективной терминации. По данному изобретению термин "терминатор" или "регуляторная последовательность терминатора" предназначен для обозначения любой такой последовательности, которая является функциональной для терминации экспрессии нуклеиновой кислоты в растении кукурузы, а также, как вариант, содержащей последовательности полиаденилирования. Терминатор может быть получен из того же гена, что и последовательность промотора, или же он может быть получен из другого гена. Таким образом, он может иметь вирусное происхождение, такое как терминатор октопинсинтазы или терминатор нопалинсинтазы из бактерий *Agrobacterium tumefaciens*, или растительного происхождения, такой как терминатор гистон.

Последовательности полиаденилирования включают в себя, не ограничиваясь только этим, сигнальную октопинсинтазу *Agrobacterium*.

Термин "введение" или "внесение" в контексте настоящего документа означает вставку нуклеиновой кислоты в растение кукурузы любым способом, известным в данной области техники, таким как "трансформация" с использованием невирусных способов введения или "трансдукция" с использованием для переноса гена промежуточного звена в виде вируса. Для введения молекулы нуклеиновой кислоты в растение кукурузы в данной области техники известны многочисленные способы (см., например, Miki et al., "Procedures for Introducing Foreign nucleic acid into Plants" in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. and Thompson, J. E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), pages 67-88). Кроме того, для трансформации растительных клеток или тканей и регенерации растений доступны векторы экспрессии и методы культивирования *in vitro* (см., например, Gruber et al., "Vectors for Plant Transformation" in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. and Thompson, J. E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), pages 89-119).

Предпочтительным способом, применяемым в настоящем изобретении, является трансформация молекулы нуклеиновой кислоты, кассеты экспрессии или вектора, несущего молекулу нуклеиновой кислоты, путем использования бактерий рода *Agrobacterium*, предпочтительно путем инфицирования клеток или тканей растения кукурузы бактериями *A. tumefaciens* (Knopf U.C, 1979, *Subcell. Biochem.* 6: 143-173; Shaw C.H. et al., 1983, *Annu. Rev. Genet.* 16: 357-384; Tepfer M. and Casse-Delbart F., 1987, *Microbiol. Sci.* 4(1): 24-28). Например, трансформация клеток или тканей растений кукурузы с помощью бактерии *Agrobacterium tumefaciens* осуществляется в соответствии с протоколом, описанным Hiei Y. et al. (1994, *Plant J.* 6(2): 271-282).

Другим способом введения нуклеиновой кислоты в растение кукурузы является способ биолисти-

ческой трансформации, отличающийся тем, что клетки или ткани бомбардируют частицами, на которые адсорбируются нуклеиновая кислота, кассета экспрессии или вектор, которые входят в объем настоящего изобретения (Brace W.B. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(24): 9692- 9696; Klein T.M. et al., 1992, Biotechnology 10(3): 286-291; US Patent No. 4,945,050). Еще одним методом является широко используемая трансформация протопластов. Следовательно, растительные клетки отделяются пектиназами, и, впоследствии, клеточная стенка расщепляется с образованием протопластов. Для трансформации может быть добавлен полиэтиленгликоль или применена электропорация. В других способах клетки или ткани растения приводятся в контакт с полиэтиленгликолем (ПЭГ) и нуклеиновой кислотой, кассетой экспрессии или вектором по данному изобретению (Chang S. and Cohen S.N., 1979, Mol. Gen. Genet. 168(1): 111-115; Mercenier A. and Chassy B.M., 1988, Biochimie 70(4): 503-517). Электропорация представляет собой еще один способ, который заключается в том, что клетки или ткани, подлежащие трансформации, и нуклеиновая кислота, кассета экспрессии или вектор, которые входят в объем настоящего изобретения, подвергаются воздействию электрического поля (Andreason G.L. and Evans G.A., 1988, Biotechniques 6(7): 650-660; Shigekawa K. and Dower W.J., 1989, Aust. J. Biotechnol. 3(1): 56-62). Другой способ состоит в прямом введении нуклеиновой кислоты, кассеты экспрессии или вектора, которые входят в объем настоящего изобретения, в клетки или ткани путем микроинъекции (Gordon and Ruddle, 1985, Gene 33(2): 121-136). Другим методом физической доставки нуклеиновой кислоты в растения является обработка клеток-мишеней ультразвуком (Zhang et al., Bio/Technology 9: 996 (1991)). В качестве альтернативы, для введения в растения нуклеиновой кислоты, кассеты экспрессии или вектора, которые входят в объем настоящего изобретения, может быть использовано слияние липосом или сферопластов (Deshayes et al., EMBO J., 4: 2731 (1985), Christou et al., Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 3962 (1987)). Также сообщалось о прямом захвате нуклеиновой кислоты в протопластах с использованием осаждения CaCl_2 , поливинилового спирта или поли-L-орнитина (Hain et al., Mol. Gen. Genet. 199: 161 (1985); Draper et al., Plant Cell Physiol. 23: 451 (1982)).

Этап отбора для идентификации трансгенного растения кукурузы, содержащего нуклеиновую кислоту, может быть осуществлен с помощью селективируемого гена, присутствующего в векторе, как указано выше. Селективируемый ген может содержать функционально связанную регуляторную последовательность промотора и, возможно, регуляторную последовательность терминатора, которые являются функциональными в клетках кукурузы. Среди селективируемых маркеров, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, упоминаются гены резистентности к антибиотикам, такие как ген резистентности к спектиномицину, ген гигромицинофосфотрансферазы, ген неомицинофосфотрансферазы II, индуцирующий резистентность к канамицину, или ген аминогликозид 3'-аденилтрансферазы, *bar*-ген (White J. et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18: 1062) для устойчивости к биалафосу, ген EPSPS (US 5,188,642) для устойчивости к глифосату или ген HPPD (WO 96/38567) для устойчивости к изоксазолу, гены, кодирующие идентифицируемые ферменты, такие как фермент GUS, белок GFP или гены, кодирующие пигменты или ферменты, регулирующие выработку пигмента в трансформированных клетках. Такие селективируемые маркерные гены, в частности, описаны в патентных заявках WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567 и WO 97/04103. В предпочтительном варианте осуществления, в данном изобретении в качестве селективируемых генов бинарного вектора используются ген резистентности к спектиномицину и *pat* ген.

Трансформация без маркерных генов является другой альтернативой для переноса нуклеиновой кислоты, кассеты экспрессии или вектора, как упоминалось выше, в растение кукурузы.

В одном варианте осуществления такая нуклеиновая кислота или кассета экспрессии стабильно интегрированы в геном трансгенного растения кукурузы, предпочтительно в хромосому растения, такую как ядерная, пластидная и/или митохондриальная хромосома. Однако интеграция также может происходить во внехромосомный элемент. Благодаря стабильной интеграции в геном растения последовательности нуклеиновой кислоты могут передаваться последующим поколениям трансгенного растения. Стабильная интеграция и передача следующим поколениям растений кукурузы в настоящем изобретении является предпочтительной. При использовании метода трансформации растений с промежуточным звеном в виде бактерии *Agrobacterium tumefaciens* в качестве предпочтительного метода трансформации, нуклеиновая кислота инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum* стабильно интегрируется в геном растения кукурузы. В качестве альтернативы, нуклеиновая кислота, или кассета экспрессии, или вектор, несущий нуклеиновую кислоту или кассету экспрессии, могут быть преобразованы в автономный репликон. В качестве альтернативы, молекула нуклеиновой кислоты или кассета экспрессии присутствуют в клетке растения на векторе, используемом для введения молекулы нуклеиновой кислоты, и интегрированы в геном растения не стабильно, или нуклеиновая кислота экспрессируется временно, например, как трансформированная мРНК. Следовательно, последовательности нуклеиновых кислот не могут передаваться последующим поколениям растения кукурузы.

Термин "гетерологичный" в контексте настоящего документа относится к условиям, в которых молекулы присутствуют в средах, в которых они не присутствуют в природе. Например, молекула нуклеиновой кислоты, которая экспрессирована в клетку-хозяина, в которую она не экспрессируется естественным путем, представляет собой гетерологичную нуклеиновую кислоту. Следовательно, клетка-хозяин является гетерологичной клеткой-хозяином. Гетерологичными регуляторными элементами являются те,

которые связаны с молекулами нуклеиновых кислот, с которыми они не связываются естественным образом.

Термин "трансгенное растение кукурузы" в контексте настоящего документа относится к растению кукурузы, которое содержит нуклеиновую кислоту, способную экспрессировать инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональную часть, или ее гомолог, интегрированную в ее геном ядра или геном органелл, или присутствующую на автономном репликоне или на векторе, используемом для введения нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, или присутствующую в виде простой кодирующей последовательности без других элементов. Этот термин также включает в себя следующие поколения потомства, такие как T1, T2 или последующие поколения, а также их скрещивание с нетрансгенными или другими трансгенными растениями. Трансгенное растение кукурузы предпочтительно содержит по меньшей мере одну копию нуклеиновой кислоты, которая входит в объем настоящего изобретения.

Экспрессия инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональной части, или ее гомолога в растение кукурузы улучшает устойчивость к абиотическим стрессовым условиям. Предпочтительно, "абиотический стресс", против которого трансгенное растение кукурузы по настоящему изобретению проявляет повышенную устойчивость, включает в себя засуху, засоление (концентрацию соли), жару и/или похолодание.

"Засуха" или "условия засухи" означают условия дефицита воды, возникающие в результате длительного периода недостаточного водоснабжения или полного его отсутствия (условия водяного стресса), особенно условия, которые неблагоприятно влияют на условия роста и/или жизни растения кукурузы. В условиях засухи растение будет проявлять симптомы травмирования, такие как увядание, потемнение и/или скручивание листьев, рост его будет затруднен, и, в конечном итоге, растение гибнет. Условия засухи могут быть образованы выращиванием растения кукурузы на стадиях V2, V3, V4, V5, V6, V7 или V8 (согласно методу листовых узлов, который описан ниже) в течение одной недели в растворе Хогланда крепостью 1/4, с последующей выдержкой в течение суток в 25%-ном растворе PEG6000. Термин "засухоустойчивость" в контексте настоящего документа может означать, что трансгенное растение кукурузы демонстрирует значительно уменьшенные симптомы скручивания листьев в условиях засухи, создаваемых путем обработки растений раствором Хогланда и 25%-ным раствором PEG6000. Термин "значительно уменьшенные" означает, что процент листьев, демонстрирующих симптом скручивания, снижен по сравнению с эталонным образцом, по меньшей мере, на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 100%. В качестве альтернативы, растение кукурузы является засухоустойчивым, если самое большее 60, 50, 40, 30, 20, 10 или 5 или менее % листьев растения кукурузы на стадиях V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 и/или VT (полностью зрелое растение с соцветием) демонстрируют симптомы скручивания при выдержке в условиях засухи.

Термины "засоление" или "условия засоления" означают условия высокой концентрации соли, такие как 100 ммоль раствор NaCl для орошения, особенно в воздухе и/или в почве, особенно условия, которые неблагоприятно влияют на условия роста и/или жизни растения кукурузы. Способность растений выдерживать наличие соли определяется несколькими биохимическими реакциями, которые способствуют удержанию и/или поглощению воды, защищают функции хлоропластов и обеспечивают ионный гомеостаз. Основные реакции включают в себя те, которые приводят к синтезу осмотически активных метаболитов, специфических белков или определенных ферментов, поглощающих свободные радикалы, которые контролируют поток ионов и воды, и поддерживают удаление кислородных радикалов или шаперонов. Причиной, по которой инвертазы клеточной стенки защищают растения кукурузы от неблагоприятного воздействия засоления, может быть их способность синтезировать осмотически активные соединения. В условиях засоления урожай растения кукурузы будет ниже, чем в условиях отсутствия засоления. В условиях длительного и/или очень высокого засоления растение кукурузы, в конечном итоге, погибнет. "Устойчивость к засолению" может означать, что трансгенное растение на стадиях V2, V3, V4, V5, V6, V7 или V8 выживает и/или растет в условиях засоления по сравнению с эталонным образцом, который прекращает рост или растет в меньшей степени, при этом в условиях очень высокого засоления и/или в течение длительного периода засоления растение кукурузы, в конечном итоге, погибнет. Под "выживанием" подразумевается, что такое трансгенное растение кукурузы выживает в течение более длительного периода времени, такого, который по меньшей мере на 10, 11, 12, 13 или более дней превышает период выживания эталонного образца. Под "ростом" подразумевается, что увеличение урожайности всего растения кукурузы или его частей, таких как стебель, листья, початки или зерна, составляет по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с урожайностью эталонного образца.

"Жара" или "условия жары" означают условия при высокой температуре, составляющей около 33-40°C на уровне початков в течение 15-дневного периода, предшествующего цветению, а особенно условия, которые неблагоприятно влияют на условия роста и/или жизни растения кукурузы. Скорость роста и развития растений зависит от температуры окружающей среды. Экстремальные тепловые явления, происходящие в течение вегетационного периода, вероятно, оказывают наиболее существенное влияние на продуктивность растений, в результате чего сильная жара может привести к снижению урожайности по зерну. В целом, экстремально высокие температуры во время репродуктивной стадии могут повлиять на

жизнеспособность пыльцы, оплодотворение и формирование зерна. Длительное воздействие экстремальных температур на стадии опыления исходного набора зерна снижает потенциальную урожайность по зерну. Сильное кратковременное воздействие экстремальных явлений может быть наиболее вредным на репродуктивной стадии развития (Hatfield J.L. and Praeger J.H., 2015, *Weather and Climate Extremes*, 10: 4-10). Учитывая, что из-за потепления мирового климата ожидается повышение температуры и учащение экстремальных температурных явлений, разработка растений кукурузы с повышенной устойчивостью к условиям теплового стресса представляется насущной необходимостью. "Устойчивость к жаре" в контексте настоящего документа может означать, что трансгенное растение на стадиях V2, V3, V4, V5, V6, V7 или V8 или на стадии опыления выживает и/или растет в условиях жары по сравнению с эталонным образцом, рост которого прекращается или происходит в меньшей степени. Под "выживанием" подразумевается, что такое трансгенное растение кукурузы выживает в течение более длительного периода времени, такого, который по меньшей мере на 10, 11, 12, 13 или более дней превышает период выживания эталонного образца. Под "ростом" подразумевается, что увеличение урожайности всего растения кукурузы или его частей, таких как стебель, листья, початки или зерна, составляет по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с урожайностью эталонного образца.

"Похолодание" или "условия похолодания" означают условия при пониженной температуре, составляющей меньше 10°C, но выше точки замерзания, а особенно условия, которые неблагоприятно влияют на условия роста и/или жизни растения кукурузы. Похолодание может нанести ущерб (хлороз) и прервать тракты протекания питательных веществ и воды. В условиях похолодания растение демонстрирует уменьшенную урожайность. "Устойчивость к похолоданию" может означать, что трансгенное растение на стадиях V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 выживает и/или растет в условиях похолодания по сравнению с эталонным образцом, рост которого прекращается или происходит в меньшей степени. Под "выживанием" подразумевается, что такое трансгенное растение кукурузы выживает в течение более длительного периода времени, чем эталонный образец. Под "ростом" подразумевается, что увеличение урожайности всего растения кукурузы или его частей, таких как стебель, листья, початки или зерна, составляет по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с урожайностью эталонного образца.

Для специалистов в данной области техники будет понятно, что из-за большого количества различных сортов кукурузы, выращиваемых в широком спектре климатических и других абиотических условий, трудно указать конкретные значения, характеризующие условия засухи, засоления, жары или похолодания, такие как длительность засухи, степень засоления или величина температуры, которые указали бы специалисту, при каких условиях следует проверять устойчивость к абиотическому фактору. Например, чтобы оценить, проявляет ли соответствующая трансгенная кукуруза более высокую устойчивость или будет ли она иметь более высокую урожайность, растения кукурузы с высокой устойчивостью к засухе будут нуждаться в условиях более сильной засухи, чем растения кукурузы с более низкой засухоустойчивостью. Поэтому условия испытаний будут зависеть от растения кукурузы, использованного для введения трансгена, и/или от цели, для которой будет использоваться такое трансгенное растение кукурузы.

В связи с тем, что введение и экспрессия инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum* приводит к увеличению урожайности трансгенного растения кукурузы при нормальных условиях и в условиях засухи, а также к образованию засухоустойчивого фенотипа, необязательно сравнивать трансгенное растение кукурузы, которое экспрессирует инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональную часть, или ее гомолог, с эталонным образцом, как указано в настоящем документе, для определения того, обладает ли такое трансгенное растение кукурузы устойчивостью к абиотическому стрессу, такому как засуха, засоление, жара и/или похолодание. Может быть достаточно определить экспрессию инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональной части, или ее гомолога, например, путем определения количества транскрипта или белка, чтобы обнаружить, что существует устойчивость к абиотическим стрессовым факторам, таким как засуха, засоление, жара и/или похолодание.

Устойчивость к фактору абиотического стресса может быть определена путем воздействия на трансгенное растение кукурузы фактора абиотического стресса и определения степени проявления симптомов фактора стресса и/или урожайности. Полученные показатели можно сравнить с эталонным образцом. Устойчивость также может быть выявлена путем определения экспрессии или уровня экспрессии транскрипта, экспрессируемого из трансгена, который входит в объем настоящего изобретения.

Второй объект настоящего изобретения касается клетки растения, ткани, части, пригодной для сбора или семян трансгенного растения кукурузы по настоящему изобретению, отличающихся тем, что клетка растения, ткань, часть или семя содержат трансген, который входит в объем настоящего изобретения.

В принципе, любая часть, ткань или орган растения кукурузы, которые входят в объем настоящего изобретения, содержат в качестве трансгена нуклеиновую кислоту, кодирующую инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональную часть, или ее гомолог. Таким образом, в объем настоящего изобретения входят вегетативные органы/структуры побегов, например листья, стебли, корни,

цветы или цветочные органы/структуры, например прицветники, чашелистики, лепестки, тычинки, плодники, пыльники или семяпочки; семя, включая зародыш, эндосперм или семенную оболочку; зерно или зрелая завязь; растительная ткань, например сосудистая ткань или покровная ткань; или клетки, например защитные клетки, яйцеклетки или трихомы; или потомство вышеперечисленного. Термин "клетка" относится к клетке или скоплению клеток в растении, а также к изолированной клетке или изолированному скоплению клеток. Клетка может иметь клеточную стенку или может являться протопластом. Настоящее изобретение также касается семени, которое содержит нуклеиновую кислоту, кассету экспрессии или вектор, которые входят в объем настоящего изобретения. Предпочтительно, нуклеиновую кислоту, кассету экспрессии или вектор, которые входят в объем настоящего изобретения, содержат семена трансгенного растения кукурузы, поэтому новые растения, полученные из семени, продолжают содержать такие нуклеиновую кислоту, кассету экспрессии или вектор.

"Частью, пригодной для сбора" является любая часть растения, которая может быть собрана и использована человеком. Предпочтительно, часть, пригодная для сбора, может представлять собой всю надземную часть растения кукурузы, которая может быть измельчена, возможно, подвергнута ферментации и использована в животноводстве как корм для животных, или может быть использована в биогазовых установках в качестве источника для выработки веществ, обеспечивающих получение энергии, таких как биотопливо, например этанол или метан. Предпочтительно, частью, пригодной для сбора, может быть початок, особенно зерна, которые используются для питания человека и животных.

Третий объект настоящего изобретения касается способа получения трансгенного растения кукурузы, содержащего стадии введения, по меньшей мере, в клетку растения кукурузы нуклеиновой кислоты, или кассеты экспрессии, или вектора, входящих в объем настоящего изобретения, а также регенерации трансгенного растения кукурузы из по меньшей мере одной клетки.

В контексте настоящего документа термины "регенерация" или "регенерирование" означают процесс выращивания всего растения кукурузы из одной клетки, группы клеток, части растения кукурузы или ткани растения кукурузы. Специалисту в данной области известны способы введения нуклеиновой кислоты в, по меньшей мере, клетку растения кукурузы с последующим выращиванием из нее растения кукурузы. Выражение "в, по меньшей мере, клетку" означает одну клетку, группу клеток, часть растения кукурузы или ткань растения кукурузы.

Четвертый объект настоящего изобретения касается способа повышения устойчивости растения кукурузы к абиотическому стрессу и/или увеличения потенциальной урожайности растения кукурузы, содержащего стадии введения в, по меньшей мере, клетку растения кукурузы нуклеиновой кислоты, или кассеты экспрессии, или вектора, которые входят в объем настоящего изобретения, и вызывания экспрессии нуклеиновой кислоты, кассеты экспрессии или вектора.

В контексте настоящего документа термин "вызывание экспрессии" означает, что в условиях, при которых такое растение хранится и/или культивируется, происходит транскрипция нуклеиновой кислоты, введенной в растение кукурузы. Например, если промотор является конститутивным промотором, экспрессия происходит последовательно, тогда как в случае, если промотор является индуцируемым промотором, активность такого промотора может быть индуцирована присутствием или отсутствием конкретных биотических или абиотических факторов.

В контексте настоящего документа термин "потенциальная урожайность" означает способность трансгенного растения кукурузы к увеличению урожайности. Путем экспрессии инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональной части, или ее гомолога может быть обеспечена способность растения кукурузы к увеличению его урожайности.

Пятый объект настоящего изобретения касается применения нуклеиновой кислоты, или кассеты экспрессии, или вектора, которые входят в объем настоящего изобретения, для повышения устойчивости растения кукурузы к абиотическому стрессу, для увеличения потенциальной урожайности растения кукурузы и/или для защиты растения кукурузы от абиотического стресса.

В контексте настоящего документа выражение "защита растения кукурузы от абиотического стресса" означает придание растению кукурузы резистентности к абиотическому стрессу. Резистентное растение кукурузы не повреждается факторами абиотического стресса или повреждается, но в меньшей степени по сравнению с эталонным образцом. Резистентность может быть определена как устойчивость к абиотическому стрессу. Это включает в себя то, что резистентность может быть определена путем оценки экспрессии транскрипта и/или белка, или уровня экспрессии из трансгена.

В варианте осуществления изобретения, в способе по четвертому объекту или для использования по пятому объекту абиотический стресс выбран из ряда: засуха, засоление, жара или похолодание, и/или потенциальная урожайность является потенциальной урожайностью по биомассе или потенциальной урожайностью по зерну.

Термины "потенциальная урожайность по биомассе" или "потенциальная урожайность по зерну" имеют значения, указанные выше в отношении "потенциальной урожайности", и означают, соответственно, урожайность по биомассе и урожайность по зерну.

Термин "биомасса" обычно относится к органическому материалу, полученному из растения. Термин "биомасса" может быть использован для обозначения источника энергии и не должен применяться к

продуктам питания или кормам. Таким образом, в контексте настоящего документа, термин "биомасса" относится к частям растения кукурузы, обычно надземным частям, таким как все надземное растение кукурузы, которые могут быть использованы в качестве источника энергии после его преобразования в различные виды биотоплива, такие как этанол или метан.

Шестой объект настоящего изобретения касается нуклеиновой кислоты, которая получена из нуклеиновой кислоты, кодирующей инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее функциональную часть, или ее гомолога, которые входят в объем настоящего изобретения, путем кодон-оптимизации, и, предпочтительно, отличающейся тем, что такая нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3 или кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. Данное изобретение также касается кассеты экспрессии, содержащей указанную нуклеиновую кислоту, или вектора, содержащего указанную нуклеиновую кислоту или кассету экспрессии.

Седьмой объект настоящего изобретения касается вектора, содержащего нуклеиновую кислоту или кассету экспрессии, как определено в настоящем изобретении.

Восьмой объект настоящего изобретения касается способа производства этанола или метана, содержащего следующие этапы: измельчение растения трансгенной кукурузы или его части, пригодной для сбора, по настоящему изобретению, как вариант, обработку измельченного растения кукурузы или его части при помощи агента силосования, как вариант, хранение измельченного растения кукурузы или измельченной его части, пригодной для сбора, возможно, обработанной при помощи агента силосования, и получение этанола или метана из измельченного растения кукурузы или его измельченной части, пригодной для сбора, путем анаэробного сбраживания.

Восьмой объект служит для предоставления способа, которым трансгенное растение кукурузы используется в качестве источника энергии для изготовления биотоплива, такого как этанол или метан, которые используются в составе моторного топлива, для отопления, для получения электроэнергии и т. д. Процессы получения энергии из растений кукурузы известны в области техники, связанной с получением биогаза, в которых измельченная кукуруза или другой растительный материал хранятся и ферментируются с помощью анаэробных бактерий в процессе, называемом силосованием.

Обработка измельченной биомассы агентом силосования служит для улучшения результатов силосования. При добавлении сильных молочнокислых бактерий или других бактерий, полезных для анаэробного сбраживания биомассы и/или химических веществ, нежелательные бактерии, такие как бактерии, генерирующие масляную кислоту, подавляются. Химическими веществами для уменьшения количества нежелательных бактерий, таких как бактерии, генерирующие масляную кислоту, могут быть нитрит натрия или гексамин, или для предотвращения роста дрожжей и плесени можно использовать бензоат натрия или сорбат калия. Таким образом, можно устранить помехи для процесса анаэробного сбраживания и/или процесса последующего нагревания, а также обеспечить контроль процесса анаэробного сбраживания.

"Хранение измельченного растения кукурузы или измельченной его части, пригодной для сбора" означает помещение в контейнер, хранилище или колодец с последующим сжатием таким образом, чтобы оставить как можно меньше кислорода или поддерживать хранение в анаэробных условиях, которые препятствуют росту аэробных бактерий. Чтобы обеспечить анаэробное сбраживание, хранение предпочтительно должно осуществляться в соответствующих условиях, касающихся подходящей температуры, влажности, низкого содержания кислорода или его отсутствия и т.д. Специалисту в данной области известны условия и устройства, которые должны использоваться для хранения и анаэробного сбраживания.

Настоящее изобретение раскрывает способ придания растению кукурузы устойчивости к абиотическому стрессу, содержащий следующие этапы: введение в, по меньшей мере, клетку растения кукурузы нуклеиновой кислоты, способной экспрессировать инвертазу клеточной стенки, или ее функциональную часть, или ее гомолог, кассеты экспрессии, содержащей нуклеиновую кислоту, или вектора, содержащего нуклеиновую кислоту или кассету экспрессии, и инициирование экспрессии нуклеиновой кислоты, кассеты экспрессии или вектора.

Настоящее изобретение раскрывает применение нуклеиновой кислоты, способной экспрессировать инвертазу клеточной стенки, или ее функциональную часть, или ее гомолог, кассеты экспрессии, содержащей нуклеиновую кислоту, или вектора, содержащего нуклеиновую кислоту или кассету экспрессии, для придания растению кукурузы устойчивости к абиотическому стрессу или для защиты растения кукурузы от абиотического стресса.

Вышеуказанный способ или применение могут содержать в качестве абиотического стресса засуху, засоление, жару и/или похолодание.

Инвертаза клеточной стенки, как указано в вышеупомянутом способе и применении, может представлять собой любую инвертазу клеточной стенки, не ограничиваясь инвертазой клеточной стенки *Chenopodium rubrum*, или ее гомологом, или ее функциональной частью, с функцией гидролиза сахарозы в глюкозу и фруктозу снаружи клетки, которые затем транспортируются в клетки и придают растениям кукурузы устойчивость к абиотическому стрессу. Эти функции также применимы к "части" и "гомологу", которые иным образом определены, как указано выше. Определения других признаков, содержащихся в способе или применении, такие как устойчивость, абиотический стресс, кассета экспрессии, век-

тор и т. д., содержатся в настоящем описании.

Данное изобретение дополнительно разъясняется на последующих иллюстрациях и примерах, которые включены в документ в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения данного изобретения.

Фигуры.

Фиг. 1А-С: Векторы, используемые для клонирования CrCIN: Для клонирования CrCIN были использованы три вектора. А: Первый вектор был получен из GeneArt (ThermoScientific), содержащий синтезированный кодон-оптимизированный ген CrCIN (SEQ ID NO: 3). В: Этот ген был отделен с использованием рестрикционных ферментов BamHI и HindIII, и клонирован в челночный вектор pABM, содержащий каскету клонирования (ubi-промотор и терминатор NosT). С: Эта целая генная каскета была отделена с использованием меченого фермента SfiI и клонирована в бинарный вектор pZFNmcherb для трансформации в *Agrobacterium* и, наконец, в кукурузу.

Фиг. 2: Уровни экспрессии гомозиготных растений T1 CrCIN: RT-qPCR отображает относительную экспрессию выбранных событий CrCIN к эндогенному контрольному гену ZmEF1. Как нетрансформированный A188, так и контроль трансформации (A188, трансформированный пустым вектором) не показали экспрессии, тогда как линии A188, содержащие CrCIN в качестве трансгена, продемонстрировали экспрессию CrCIN.

Фиг. 3: Растения T1 CrCIN зима 2015 (А) и растения T2 CrCIN зима 2016 (В): Фотографии трансгенных растений CrCIN, выбранные события: Событие 1, Событие 5, Событие 8 и Событие 9 (E1, E5, E8 и E9) выровнены с 2 контрольными образцами, A188 WT (дикий тип) и TC (контроль трансформации) во время 2 периодов роста на Неделе 9. Событие 1 отсутствует в эксперименте 2016 года. Все показанные здесь события продемонстрировали значительное увеличение урожайности (по биомассе).

Фиг. 4: Физиологические измерения растения T1 CrCIN на неделе 8: Сравнение урожайности трансгенных растений T1 CrCIN события E9, E5 и E8 по сравнению с A188 и растениями контроля трансформации (n=5) с использованием метода подсчета листьев на стадии вегетации Университета штата Айова через 8 недель после посева. Растения, которые значительно отличались (t-критерий Стьюдента) по сравнению с A188, были отмечены "звездочкой", тогда как растения, значительно отличающиеся от контроля трансформации, были помечены "решеткой".

Фиг. 5: Физиологические измерения растения T1 CrCIN на неделе 8: Сравнение высоты трансгенных растений T1 CrCIN события E9, E5 и E8 по сравнению с A188 и растениями контроля трансформации (n=5) через 8 недель после посева. Растения, которые значительно отличались (t-критерий Стьюдента) по сравнению с A188, были отмечены "звездочкой", тогда как растения, значительно отличающиеся от контроля трансформации, были помечены "решеткой".

Фиг. 6: Физиологические измерения растения T2 на неделе 8: Сравнение урожайности трансгенных растений T2 CrCIN события E9, E5 и E8 (n=20) по сравнению с A188 и растениями контроля трансформации (n=40) с использованием метода подсчета листьев на стадии вегетации Университета штата Айова через 8 недель после посева. Растения, которые значительно отличались (t-критерий Стьюдента) по сравнению с A188, были отмечены "звездочкой", тогда как растения, значительно отличающиеся от контроля трансформации, были помечены "решеткой".

Фиг. 7: Эксперимент 1: Рассада кукурузы CrCIN в условиях имитированного стресса от засухи: Диаграмма, отображающая процент листьев, обработанных 25%-ным раствором PEG6000 в сравнении с необработанными растениями (n=10), которые продемонстрировали симптомы скручивания листьев. Все растения выращивали в течение 1 недели в растворе Хогланда крепостью 1/4, а затем в течение 1 дня обрабатывали в добавленном 25%-ном растворе PEG6000. Оба контрольных события показали высокий уровень скручивания листьев. Событие 5 показало снижение симптома скручивания листьев. События 8 и 9 показали значительное снижение симптомов скручивания листьев.

Фиг. 8: Эксперимент 1: Рассада кукурузы CrCIN в условиях имитированного стресса от засухи: Фотография События 8 рассады CrCIN в растворе Хогланда крепостью 1/4 через 1 неделю после прорастания с последующей 2-дневной обработкой в 25%-ном растворе PEG6000. Здесь можно увидеть, что листья События 8 показывают меньше симптомов скручивания листьев, чем в образце WT.

Фиг. 9: Эксперимент 1: Рассада кукурузы CrCIN в условиях имитированного стресса от засухи: Фотография репрезентативных растений CrCIN после 2-дневной обработки 25% PEG6000 в сравнении с контрольным растением, выращиваемым в растворе Хогланда крепостью 1/4. Вначале после прорастания все растения выращивали в течение 1 недели в растворе Хогланда крепостью 1/4, а затем перенесли в 25%-ный раствор PEG6000.

Фиг. 10: Эксперимент 2: Рассада кукурузы CrCIN в условиях имитированного стресса от засухи: Диаграмма, отображающая процент листьев, обработанных 25%-ным раствором PEG6000 в сравнении с необработанными растениями (n=10), которые продемонстрировали симптомы скручивания листьев. Все растения после прорастания выращивали в течение 1 недели в растворе Хогланда крепостью 1/4, а затем в течение 1 дня обрабатывали в добавленном 25%-ном растворе PEG6000. Оба контрольных события показали высокий уровень скручивания листьев. События 5 и 9 показали снижение уровня скручивания листьев, а Событие 8 показало значительное снижение симптомов скручивания листьев.

Фиг. 11: Эксперимент 2: Рассада кукурузы CrCIN в условиях имитированного стресса от засухи: Фотография события 8 растений CrCIN после 2-дневной обработки 25%-ным раствором PEG6000. Здесь можно увидеть, что листья События 8 показывают меньше симптомов скручивания листьев, чем в образце WT. Вначале после прорастания все растения выращивали в течение 1 недели в растворе Хогланда крепостью 1/4, а затем перенесли в 25%-ный раствор PEG6000.

Фиг. 12: Эксперимент 2: Рассада кукурузы CrCIN в условиях имитированного стресса от засухи: Фотография трех репрезентативных растений CrCIN после 2-дневной обработки 25%-ным раствором PEG6000. Самым большим отличием является развитие 3-го листа у растений События 8 и События 9 в сравнении с контрольными образцами. Вначале после прорастания все растения выращивали в течение 1 недели в растворе Хогланда крепостью 1/4, а затем перенесли в 25%-ный раствор PEG6000.

Фиг. 13: Данные по трансгенным растениям пшеницы CrCIN: А: Карта плазмид пшеницы pABM-ubi-CrCIN (Ara^r Резистентность к ампициллину) и В: Карта плазмид пшеницы pLNAB-ubi-CrCIN (aadA: Резистентность к спектиномицину, ColE1 ori: начало репликации для E. coli, pVS1 REP: начало репликации для Agrobacterium).

Фиг. 14: Пшеница: CrCIN T1 скрининг, CrCIN экспрессия: Среднее $\pm$ SE. Было использовано пять биологических реплик. Экспрессия CrCIN была проанализирована из листьев 4-недельных растений, выращенных в теплице. В качестве внутреннего контроля была использована экспрессия TaEF. Все растения в теплице были полностью рандомизированы.

Фиг. 15: Сверхэкспрессия CrCIN не увеличивает урожайность или связанные с урожайностью параметры пшеницы, выращенной в теплице. (А) Длина колоса, (В) Количество зерна на колос, (С) Масса зерна на колос и (D) Масса зерна была измерена на 4 первых зрелых побегах парниковых растений. Показаны Средние значения $\pm$ Стандартная погрешность, $N \geq 10$ биологических реплик. Статистический анализ был сделан методом двухфакторного дисперсионного анализа. Другие параметры роста (например, высота растения) также не показали существенных отличий.

Фиг. 16: Сверхэкспрессия CrCIN не увеличивает урожайность в полевых условиях. Числа представляют урожайность в процентах от контрольных растений (нетрансгенные TAIFUN) в разных местах. Дисперсионный анализ, проведенный для одного и нескольких мест, не показал никаких существенных отличий между линиями трансгенных CrCIN и контрольными растениями.

Фиг. 17: Сверхэкспрессия CrCIN в пшенице (TAIFUN) не приводит к обнаруживаемому фенотипу устойчивости к засухе ни по сухой массе листьев (вверху), ни по сухой массе корней (внизу), столбец черного цвета: контрольное растение без стресса засухи; столбец белого цвета: со стрессом засухи, смоделированным применением 10% ПЭГ; 1, 2, 3: трансгенные линии CrCIN с избыточной экспрессией CrCIN; 5 и 6: линии без избыточной экспрессии CrCIN (контроль).

Примеры.

Результаты с трансгенными растениями кукурузы.

Сначала мы синтезировали ген инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum* (CrCIN), а затем трансформировали его в челночную векторную кассету, содержащую промотор убиквитин (содержащий интрон) из кукурузы и терминаторную последовательность 35S, чтобы вызвать конститутивную сверхэкспрессию гена в растении кукурузы (фигура 1А и В). Затем эта кассета была трансформирована в биарный вектор, содержащий, например, ген гербицида (например: резистентность к BASTA, резистентность к глифосату или резистентность к ингибитору ALS) и ген резистентности к спектиномицину для последующей трансформации в бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, посредством которых выполняется трансформация в кукурузу (*Zea mays*) генотипа A188 (фиг. 1С).

Эти последовательно трансформированные зародыши кукурузы затем были селекционированы путем обработки гербицидами и регенерированы в растения для получения семян в условиях теплицы. Из партии этих семян T1 были выращены гомозиготные растения. Уровни экспрессии регенерированных гомозиготных растений T1 CrCIN были определены с помощью RT-qPCR, отображающей относительную экспрессию выбранных событий CrCIN к эндогенному контрольному гену ZmEF1 (фиг. 2). Как нетрансформированный A188, так и контроль трансформации (A 188, трансформированный пустым вектором) не показали экспрессии, тогда как линии A188, содержащие CrCIN в качестве трансгена, продемонстрировали экспрессию CrCIN разных уровней.

Кроме того, гомозиготные растения T1 были проанализированы в теплице на предмет общих физиологических изменений с использованием, главным образом, протокола фиксации изменений в листьях, содержащий подсчет всех листьев, включая погибшие, начиная от основания растения до первого раскрытого листа согласно протоколу Университета штата Айова, который также известен как метод листовых узлов (Abendroth et al., 2011, Corn Growth and Development, Iowa State University, Available Inventory: 9182).

Метод листовых узлов определяет стадию формирования листьев кукурузы путем подсчета количества листьев на растении с видимыми листовыми узлами, начиная с самого нижнего, короткого, настоящего листа с закругленным концом, и заканчивая самым верхним листом с видимым листовым узлом. Листовой узел-это похожая на кольцо "полоса", окрашенная в более светлый цвет и расположенная у

основания открытой листовой пластины, возле места, в котором листовая пластина вступает в контакт со стеблем растения. Завитые листья, а также листья, не полностью раскрывшиеся и не имеющие видимого листового узла, не учитываются в этом методе фиксации изменений в листьях. Исключением из этого правила могут быть листья с едва видимыми листовыми узлами, которые можно включить в подсчет, когда изменения в растениях фиксируются в начале дня, и можно предполагать, что листовые узлы могут стать полностью видимыми к концу дня. Стадии изменения листьев обычно описываются как стадии "V", например, V2=два листа с видимыми листовыми узлами. Метод листовых узлов, в целом, наиболее широко используется университетскими и промышленными агрономами в США. Согласно наблюдениям, по сравнению с контрольными растениями накопление массы в растениях CrCIN возрастало от стадии роста V8 до репродуктивной стадии во всех событиях, которые демонстрировали экспрессию (фиг. 3А). Это измерялось путем подсчета у растений V стадий, при этом у трансгенных растений листьев было значительно больше, чем у контрольных растений A188 (фиг. 4).

В одном эксперименте также измеряли высоту растения путем собирания листьев в пучок и вытягивания его вверх, после чего высота растения измерялась от почвы/основания стебля растения до кончика самого высокого листа (фиг. 5).

Гомозиготные семена T2, собранные у этих растений, затем были выращены второй раз, и этот фенотип биомассы был подтвержден путем определения V-стадий после 8 недель роста в тепличных и полевых условиях (фиг. 6). Высота растений T2 повторно не измерялась, поскольку все было ясно при визуальной оценке (см. Фиг. 3В).

Рассада T2 была протестирована в гидропонном эксперименте с 25%-ным раствором PEG6000 в 0,25-кратном растворе Хогланда для имитации стресса от засухи (осмотического стресса). В условиях стресса, вызванного засухой, у рассады кукурузы обычно развивается сильное обезвоживание листьев и проявляется симптом их скручивания. Таким образом, скручивание листьев в таких растениях, как кукуруза, можно использовать как оценку очевидных последствий дефицита воды (O'Toole, John C, Rolando T. Cruz. "Response of leaf water potential, stomatal resistance, and leaf rolling to water stress." *Plant physiology* 65.3 (1980): 428-432.). Исследование уровней скручивания листьев рассады с помощью событий CrCIN E5, E8 и E9 показало повышенную устойчивость к воздействию PEG6000 по сравнению с контрольными растениями A188 и контролем трансформации в экспериментах с повторением (эксперимент 1: Фиг. 7-9; эксперимент 2: Фиг. 10-12) саженцы T2 (фиг. 7-12). В этих экспериментах, по-видимому, наблюдается эффект дозирования, при этом наиболее выраженные события демонстрируют наиболее сильный фенотип. Как видно из экспериментов, все растения кукурузы, в которые была введена нуклеиновая кислота CrCIN и которые экспрессируют CrCIN, демонстрируют повышенную урожайность в нормальных условиях и в условиях засухи, а также имеют устойчивый к засухе фенотип.

Отрицательные результаты с трансгенными растениями пшеницы.

CrCIN был сверхэкспрессирован в пшенице с использованием промотора убиквитин (pABM-ubi-CrCIN и pLHAB-ubi-CrCIN; Фиг. 13А и В). Гомозиготные растения T1 прошли скрининг в теплице. Экспрессия CrCIN была проанализирована из листьев 4-недельных растений, выращенных в теплице. В качестве внутреннего контроля была использована экспрессия TaEF. Все растения в теплице были полностью рандомизированы. Не трансгенные контрольные растения (TAIFUN, трансформированный пустым вектором) не показали экспрессии, тогда как линии TAIFUN, содержащие CrCIN в качестве трансгена, продемонстрировали экспрессию CrCIN разных уровней. Однако, в отличие от результатов, наблюдаемых у кукурузы, в теплице сверхэкспрессия CrCIN в пшенице неожиданно не увеличивает урожайность или связанные с ней параметры. Несмотря на то, что были выполнены различные типы измерений урожайности, например, измерение высоты растения (данные не показаны), длины колоса (фиг. 15А), подсчет количества зерен в колосе (фиг. 15В), измерение веса зерна в колосе (фиг. 15С) и вес зерна, измеренные на 4 первых зрелых побегах парниковых растений, значительных отличий выявлено не было. Измерения были выполнены повторно с линиями T2 и T3 в теплице и полевых условиях. Полевые испытания были проведены в 5 различных местах по рандомизированному полноблочному плану (RCBD) в 4 повторениях, однако даже эти испытания не выявили значительных различий в урожайности по сравнению с нетрансгенным предшественником TAIFUN (фиг. 16).

Кроме того, сверхэкспрессия CrCIN в пшенице не показывает существенного влияния на потенциальную засухоустойчивость пшеницы. Отсутствует заметная разница в сухой массе листа или сухой массе корня между линиями сверхэкспрессии CrCIN и контрольными линиями без сверхэкспрессии CrCIN в ответ на стресс засухи, вызванный применением PEG (фиг. 17).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Трансгенное растение кукурузы, содержащее в качестве трансгена
 - i) нуклеиновую кислоту, способную экспрессировать инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum* согласно SEQ ID NO: 2,
 - ii) нуклеиновую кислоту, способную экспрессировать инвертазу клеточной стенки *Chenopodium rubrum* согласно SEQ ID NO: 2 из поз. i), которая модифицирована в результате вырожденности генетического кода,
 - iii) нуклеиновую кислоту, способную экспрессировать инвертазу клеточной стенки, имеющую по меньшей мере 90% аминокислотную идентичность инвертазы клеточной стенки *Chenopodium rubrum* согласно SEQ ID NO: 2 или
 - iv) нуклеиновую кислоту, способную гибридизироваться в строгих условиях с комплементарной последовательностью нуклеиновой кислоты любой из поз. с i) по iii), причем такая нуклеиновая кислота способна экспрессировать инвертазу клеточной стенки, причем в результате экспрессии инвертазы клеточной стенки трансгенное растение кукурузы демонстрирует улучшенную устойчивость к абиотическому стрессу и/или повышенную урожайность по сравнению с растением кукурузы того же генотипа, что и трансгенное растение кукурузы, не содержащим трансген.
2. Трансгенное растение кукурузы по п.1, отличающееся тем, что нуклеиновая кислота получена из нуклеиновой кислоты любой из поз. с i) по iv) путем кодон-оптимизации.
3. Трансгенное растение кукурузы по пп.1, 2, отличающееся тем, что такая нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3 или кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.
4. Трансгенное растение кукурузы по любому из пп.1-3, содержащее в качестве трансгена кассету экспрессии, содержащую нуклеиновую кислоту.
5. Трансгенное растение кукурузы по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что нуклеиновая кислота или кассета экспрессии прочно интегрированы в геном растения кукурузы или временно экспрессированы в такое растение кукурузы, например присутствуют в растении кукурузы в составе какого-либо вектора.
6. Трансгенное растение кукурузы по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что экспрессия нуклеиновой кислоты контролируется при помощи промотора, предпочтительно конститутивного промотора.
7. Трансгенное растение кукурузы по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что абиотический стресс выбран из ряда: засуха, засоление, жара или похолодание, и/или урожайность является урожайностью по биомассе или урожайностью по зерну.
8. Клетка растения трансгенного растения кукурузы по любому из пп.1-7, отличающаяся тем, что клетка растения содержит трансген, который определен по любому из пп.1-6.
9. Ткань трансгенного растения кукурузы по любому из пп.1-7, где ткань содержит трансген, определенный по любому из пп.1-6.
10. Часть, пригодная для сбора, трансгенного растения кукурузы по любому из пп.1-7, где часть содержит трансген, определенный по любому из пп.1-6.
11. Семена трансгенного растения кукурузы по любому из пп.1-7, где семена содержат трансген, определенный по любому из пп.1-6.
12. Способ получения трансгенного растения кукурузы по любому из пп.1-7, содержащий следующие этапы: введение в, по меньшей мере, клетку растения кукурузы нуклеиновой кислоты, как определено по любому из пп.1-3 или 6, или кассеты экспрессии, как определено по п.4 или 6, или вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, как определено по любому из пп.1-3 или 6, или кассету экспрессии, как определено по п.4 или 6, и регенерация трансгенного растения кукурузы из по меньшей мере одной клетки.
13. Способ повышения устойчивости растения кукурузы к абиотическому стрессу и/или увеличения потенциальной урожайности растения кукурузы, содержащий следующие этапы: введение в, по меньшей мере, клетку растения кукурузы нуклеиновой кислоты, как определено по любому из пп.1-3 или 6, или кассеты экспрессии, как определено по п.4 или 6, или вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, как определено по любому из пп.1-3 или 6, или кассету экспрессии, как определено по п.4 или 6, и вызывание экспрессии нуклеиновой кислоты, кассеты экспрессии или вектора.
14. Способ по п.13, отличающийся тем, что абиотический стресс выбран из ряда: засуха, засоление, жара или похолодание, и/или потенциальная урожайность является потенциальной урожайностью по биомассе или потенциальной урожайностью по зерну.
15. Применение нуклеиновой кислоты, как определено по любому из пп.1-3 или 6, или кассеты экспрессии, как определено по п.4 или 6, или вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, как определено по любому из пп.1-3 или 6, или кассету экспрессии, как определено по п.4 или 6, для повышения устойчивости растения кукурузы к абиотическому стрессу.
16. Применение по п.15, отличающееся тем, что абиотический стресс выбран из ряда: засуха, засо-

ление, жара или похолодание.

17. Применение нуклеиновой кислоты, как определено по любому из пп.1-3 или 6, или кассеты экспрессии, как определено по п.4 или 6, или вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, как определено по любому из пп.1-3 или 6, или кассету экспрессии, как определено по п.4 или 6 для увеличения потенциальной урожайности растения кукурузы.

18. Применение по п.17, отличающееся тем, что потенциальная урожайность является потенциальной урожайностью по биомассе или потенциальной урожайностью по зерну.

19. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3 или кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

20. Кассета экспрессии, содержащая нуклеиновую кислоту по п.19.

21. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.19 или кассету экспрессии по п.20.

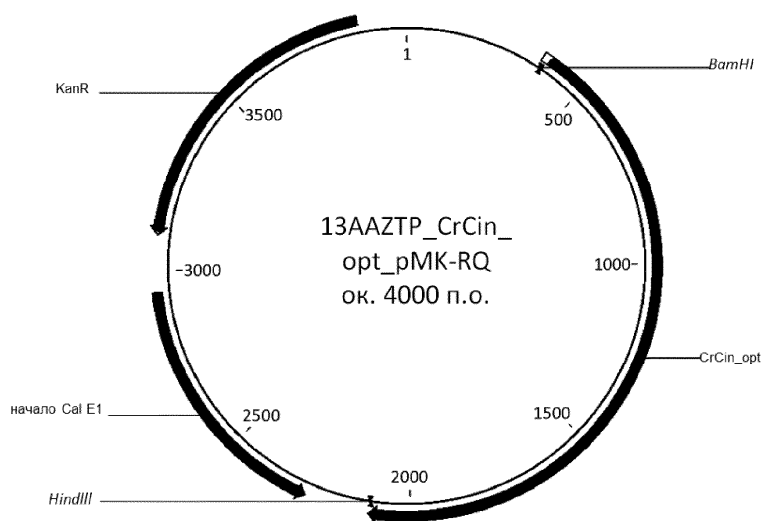
22. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, как определено по любому из пп.1-3 или 6, или кассету экспрессии, как определено по п.4 или 6.

23. Способ производства этанола, содержащий следующие этапы: измельчение растения трансгенной кукурузы по любому из пп.1-7 или его части, пригодной для сбора, по п.10, и получение этанола из измельченного растения кукурузы или его измельченной части, пригодной для сбора, путем анаэробного сбраживания.

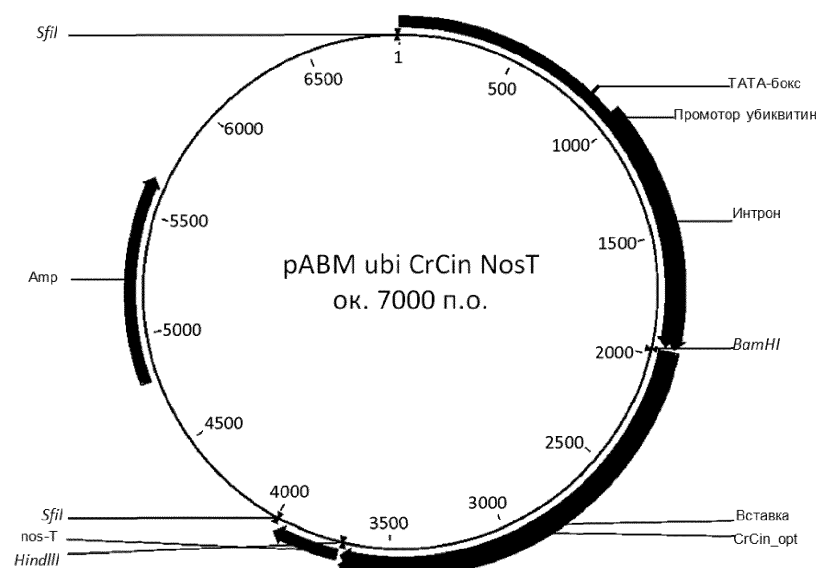
24. Способ по п.23, содержащий один из дополнительных этапов: хранение измельченного растения кукурузы или измельченной его части, пригодной для сбора перед получением этанола из измельченного растения кукурузы или его измельченной части, пригодной для сбора, посредством анаэробного сбраживания, или обработка измельченного растения кукурузы или его части, пригодной для сбора, при помощи агента силосования перед получением этанола из измельченного растения кукурузы или его измельченной части, пригодной для сбора, посредством анаэробного сбраживания, или обработка измельченного растения кукурузы или его части, пригодной для сбора, при помощи агента силосования и хранение измельченного растения кукурузы или измельченной его части, пригодной для сбора, перед получением этанола из измельченного растения кукурузы или его измельченной части, пригодной для сбора, посредством анаэробного сбраживания.

25. Способ производства метана, содержащий следующие этапы: измельчение растения трансгенной кукурузы по любому из пп.1-7 или его части, пригодной для сбора, по п.10, и получение метана из измельченного растения кукурузы или его измельченной части, пригодной для сбора, путем анаэробного сбраживания.

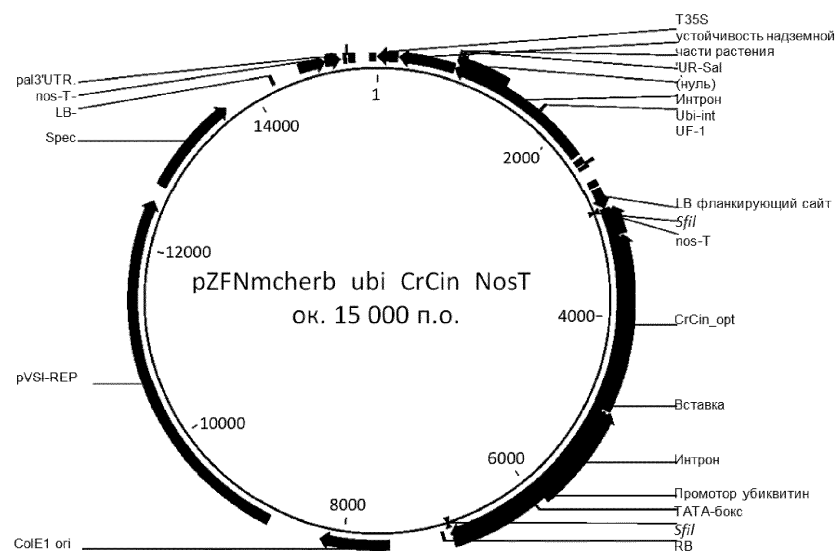
26. Способ по п.25, содержащий один из дополнительных этапов: хранение измельченного растения кукурузы или измельченной его части, пригодной для сбора перед получением метана из измельченного растения кукурузы или его измельченной части, пригодной для сбора, посредством анаэробного сбраживания, или обработка измельченного растения кукурузы или его части, пригодной для сбора, при помощи агента силосования перед получением метана из измельченного растения кукурузы или его измельченной части, пригодной для сбора, посредством анаэробного сбраживания, или обработка измельченного растения кукурузы или его части, пригодной для сбора, при помощи агента силосования и хранение измельченного растения кукурузы или измельченной его части, пригодной для сбора, перед получением метана из измельченного растения кукурузы или его измельченной части, пригодной для сбора, посредством анаэробного сбраживания.



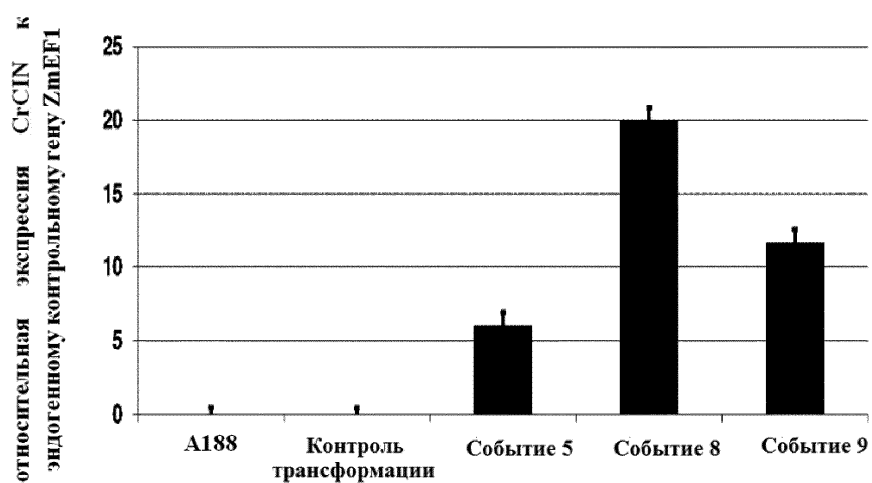
Фиг. 1А



Фиг. 1В



Фиг. 1С



Фиг. 2



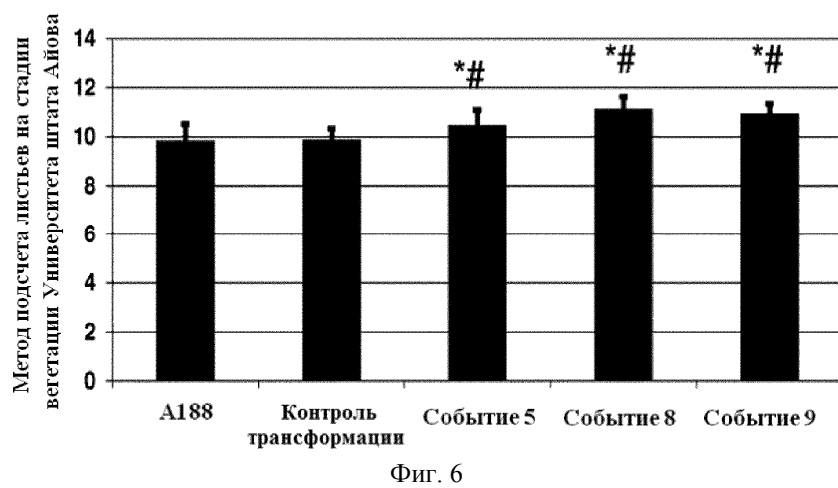
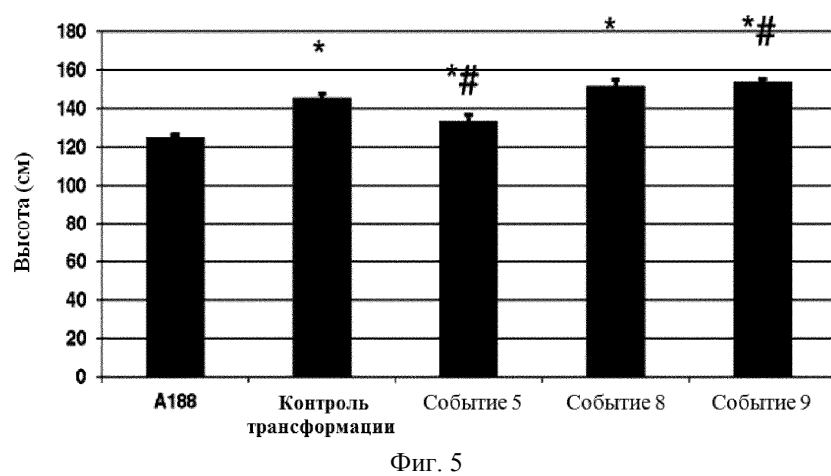
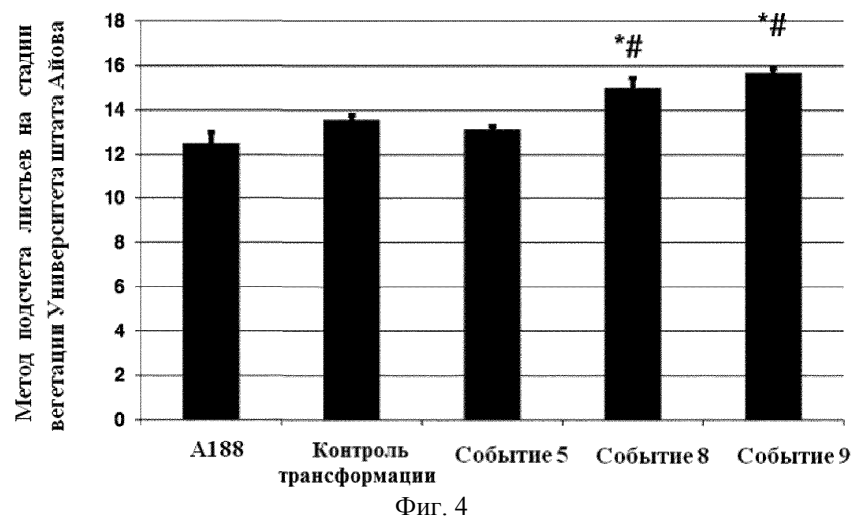
Контрольные растения CrCIN

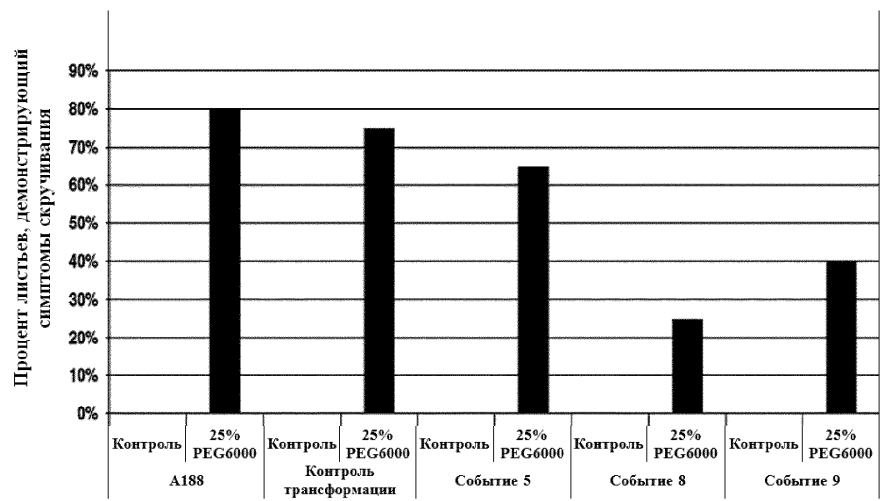
Фиг. 3А



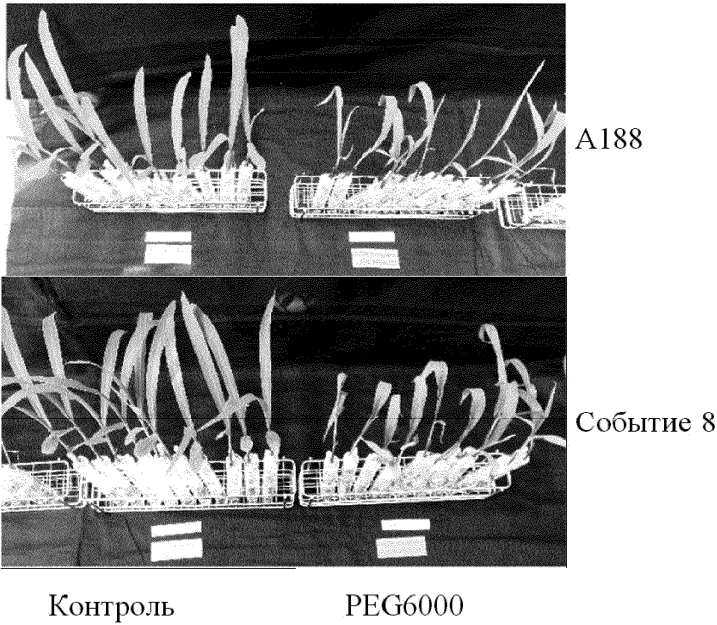
Контрольные растения CrCIN

Фиг. 3В

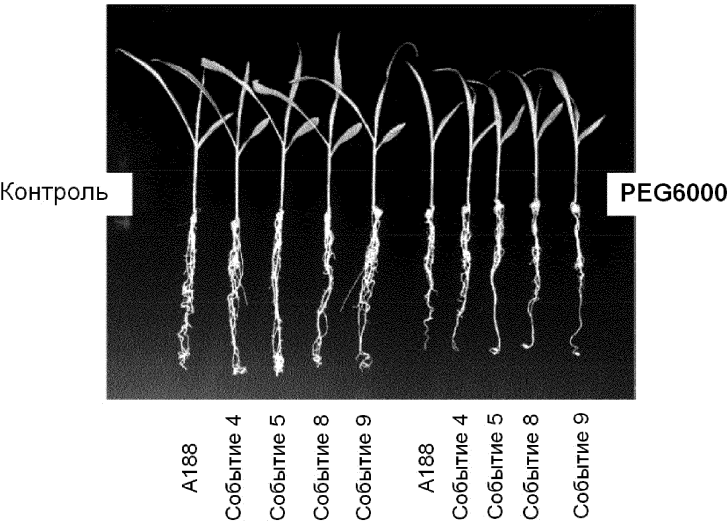




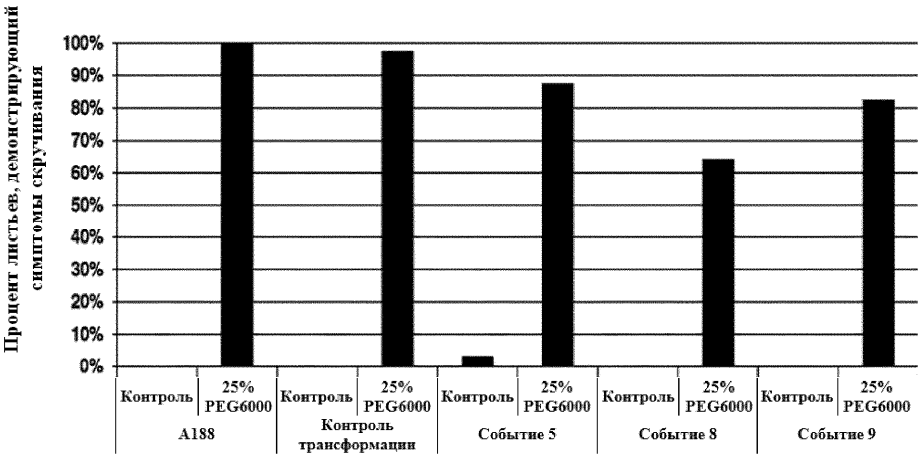
Фиг. 7



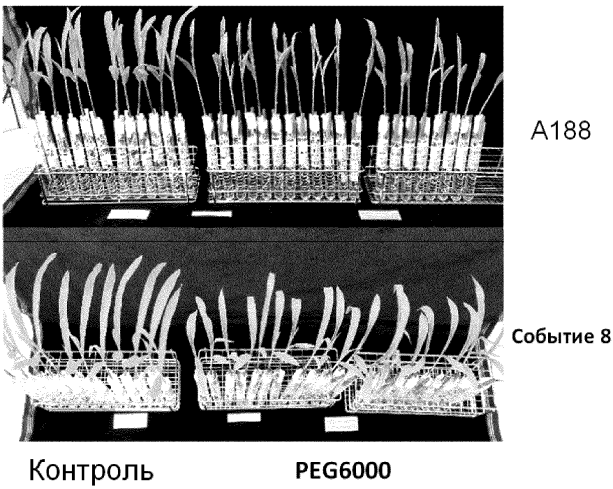
Фиг. 8



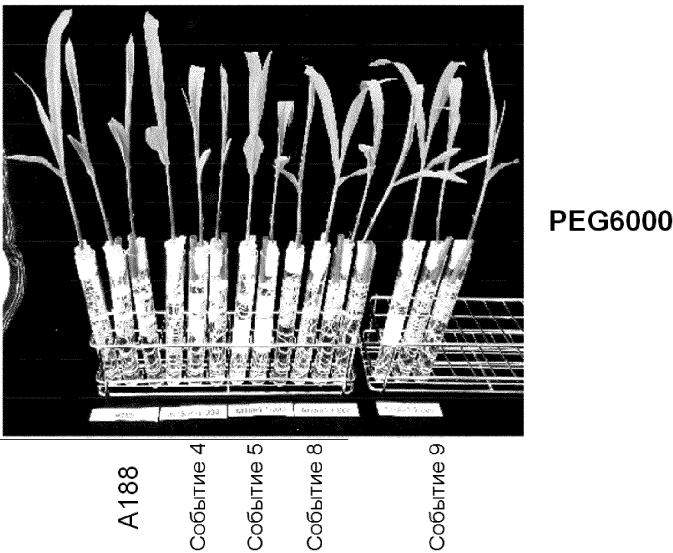
Фиг. 9



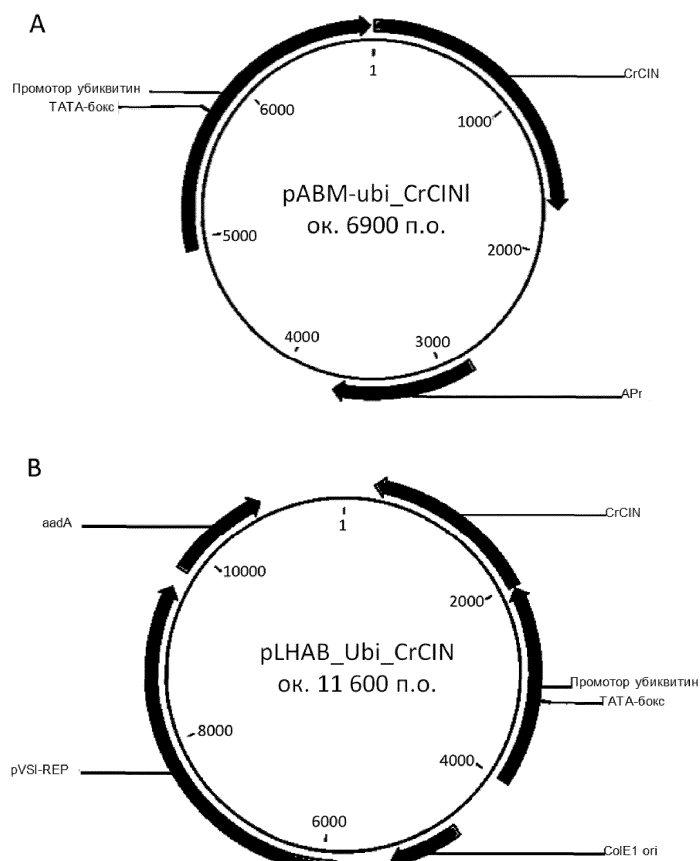
Фиг. 10



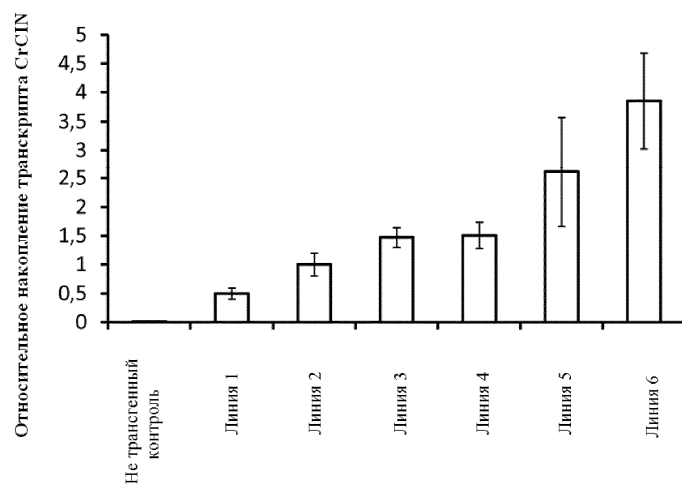
Фиг. 11



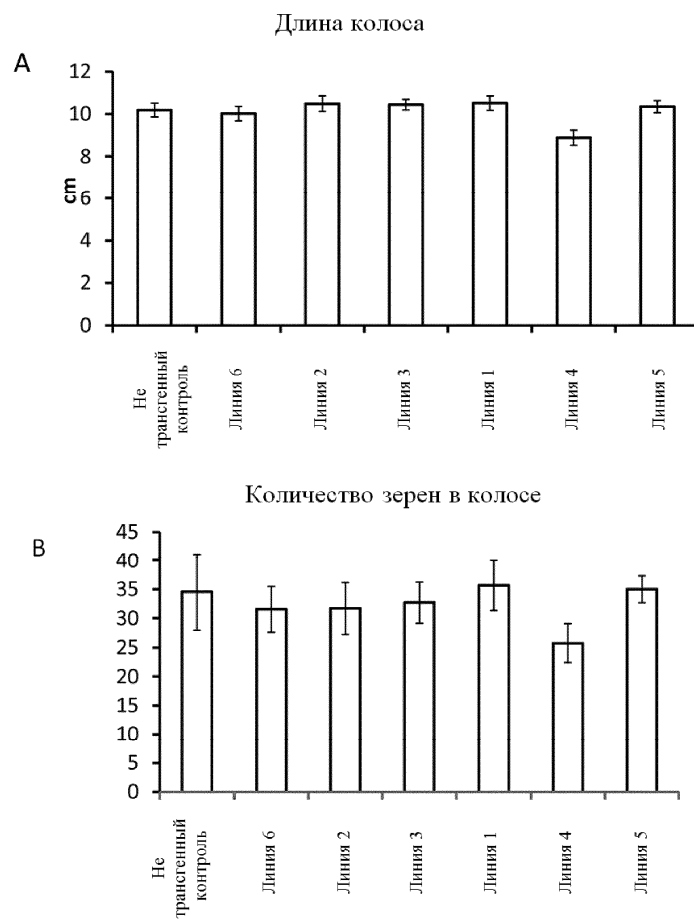
Фиг. 12



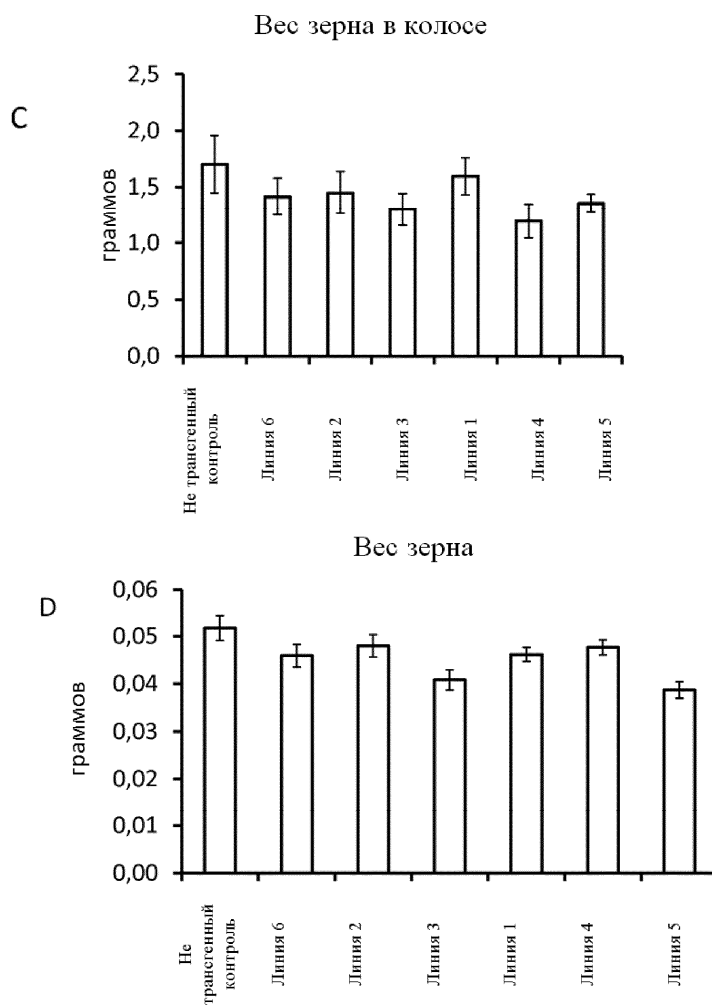
Фиг. 13



Фиг. 14



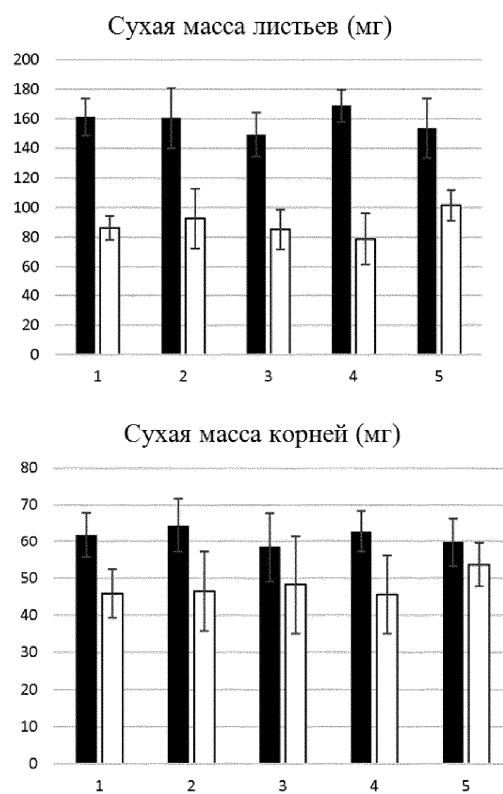
Фиг. 15



Фиг. 15

Место	Место 1	Место 2	Место 3	Место 4	Место 5	Все места
Линия 4	91,1	98,3	106,5	77,6	73,09	89,3
Линия 5	82,4	94,03	84,1	74,5	73,17	82,03
Линия 1	89,08	86,12	77,7	74,006	66,01	79,75
Линия 3	75,39	79,79	84,6	80,8	74,73	78,91
Линия 6	78,9	83,5	87,2	95,4	103,9	88,7
Линия 2	61,5	88,2	74,7	85,15	92,48	79,4

Фиг. 16



Фиг. 17

