



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.07

(21) Номер заявки
201891707

(22) Дата подачи заявки
2017.01.27

(51) Int. Cl. *A01H 5/12* (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A24B 15/10 (2006.01)

(54) УМЕНЬШЕНИЕ НАКОПЛЕНИЯ КАДМИЯ В ВЫРАЩЕННЫХ В ПОЛЕ РАСТЕНИЯХ
ТАБАКА

(31) 16153529.9

(32) 2016.01.29

(33) EP

(43) 2018.12.28

(86) PCT/EP2017/051761

(87) WO 2017/129739 2017.08.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФИЛИП MORRIS ПРОДАКТС С.А.
(CH)

(72) Изобретатель:
Бове Люсьен, Лидшульте Верена (CH)

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

(56) WO-A1-2012041913
VICTOR HERMAND ET AL.: "Inactivation of two newly identified tobacco heavy metal ATPases leads to reduced Zn and Cd accumulation in shoots and reduced pollen germination", METALLOMICS, vol. 6, no. 8, 1 January 2014

(2014-01-01), page 1427, XP055284445, GB, ISSN: 1756-5901, DOI: 10.1039/C4MT00071D, cited in the application abstract; pages 1428, 1430, 1431, 1434-1436 -& Victor Hermand ET AL.: "Electronic Supplementary Material (ESI) for Metallomics", Metallomics, 2014, 6, 1427-1440, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 1-9, XP055284472, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.rsc.org/supdat/a/mt/c4/c4mt00071d/c4mt00071d1.pdf> [retrieved on 2016-06-29] the whole document

Victor Hermand: "Analyse fonctionnelle de deux Heavy Metal ATPases de Nicotiana tabacum", 25 June 2012 (2012-06-25), XP055284057, Retrieved from the Internet: URL: http://www.supagro.fr/theses/extranet/12-0010_HERMAND_diffusion.pdf [retrieved on 2016-06-28] pages 15, 19, 22, 23, 60-69, 77-81, 89; Figures 18, 23, 33, 34, 38

WO-A1-2013119541

VERENA LIEDSCHULTE ET AL.: "Impairing both HMA4 homeologs is required for cadmium reduction in tobacco", PLANT CELL AND ENVIRONMENT, vol. 40, no. 3, 27 January 2017 (2017-01-27), pages 364-377, XP055358879, GB, ISSN: 0140-7791, DOI: 10.1111/pce.12870

(57) В данном изобретении описано мутантное растение или его часть, которые характеризуются, по меньшей мере, частично уменьшенной экспрессией или активностью по меньшей мере двух АТФаз тяжелого металла (НМА), причем указанные две НМА предусматривают, состоят из или состоят по существу из: (i) полипептидов, которые характеризуются по меньшей мере 65% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2; (ii) полинуклеотидов, кодирующих полипептиды, изложенные в (i); или (iii) полинуклеотидов, которые характеризуются по меньшей мере 65% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, кодирующими НМА; при этом экспрессия или активность одного из НМА, изложенных в (i), или (ii), или (iii), являются частично уменьшенными или утраченными, и экспрессия или активность одного из НМА, изложенных в (i), или (ii), или (iii), являются утраченными по сравнению с контрольным растением; и при этом мутантное растение или его часть характеризуются по меньшей мере 27% уменьшением, по сравнению с контрольным растением, накопления кадмия в листе, когда мутантное растение выращивают в поле в присутствии встречающегося в природе или не встречающегося в природе кадмия.

Предпосылки изобретения

Много тяжелых металлов естественным образом присутствуют в почве и поглощаются растениями в разной степени. Некоторые тяжелые металлы, такие как марганец или цинк, являются незаменимыми для растений, поскольку они представляют собой кофакторы, необходимые для ферментативной активности. Другие тяжелые металлы не являются незаменимыми для растений, и в некоторых случаях уменьшение концентрации тяжелых металлов было бы выгодно. Кадмий (Cd) представляет собой один из металлов, для которых нет сведений о выгодных эффектах на развитие растения или человека. Он классифицируется как известный человеческий канцероген. Если Cd накапливается в растении в избытке, это может спровоцировать различные вредные эффекты, такие как уменьшение поверхности листа, уменьшение сухого веса, уменьшение содержания воды, уменьшение содержания хлорофилла и уменьшение содержания каротиноидов. Табак представляет собой вид растений, отличающийся способностью накапливать в четыре раза больший уровень Cd в побегах, чем в корнях. Желательно иметь возможность уменьшать накопление Cd в растениях, таких как табак. В частности, желательно иметь возможность уменьшать накопление Cd в растениях, таких как табак, когда они растут вне помещения, в открытом поле, в большом масштабе для коммерческого производства.

Степень накопления Cd в растениях может быть различной, в зависимости от нескольких параметров, которые объясняются сложностью генотипа+и условиями роста. Например, концентрации Cd в листьях выращенного в поле табака могут различаться в зависимости от таких факторов, как агроклимат, параметры почвы и сорта. В среднем концентрации Cd, измеренные в листьях выращенного в поле табака (включая стебли и жилки), могут быть в диапазоне от приблизительно 0,5 до 5 ч./млн (частей на миллион, или мкг/г сухого веса листьев табака). Более низкие и более высокие значения были обнаружены в диапазоне от 0 до 6,78 ч./млн (Lugon-Moulin et al., 2006).

Было сделано несколько различных попыток уменьшить накопление Cd в листьях табака. Один способ включал уменьшение накопления Cd в побегах с помощью изолирования Cd в вакуолях корня. Это было выполнено с помощью сверхэкспрессирования кальциевых и марганцевых вакуольных транспортеров SAХ2 и SAХ4 A. thaliana в корнях табака (Korenkov et al., 2009).

Может быть желательным разработать генетически не модифицированный организм (не являющийся ГМО), подходя к уменьшению накопления Cd в листьях растения за счет применения инактивации гена. Из-за трудностей выращивания и извлечения прибыли с генетически модифицированных сельскохозяйственных культур в странах, включая европейские, может быть желательным работать с мутантами с наличием однонуклеотидных полиморфизмов, полученных с помощью обработки этилметансульфонатом (EMS) или тому подобным, а не за счет использования методик геной инженерии. Мутанты не рассматриваются как ГМО, даже когда мутации вызваны искусственно. В странах ЕС, например, отсутствуют специальные постановления для растений, полученных вследствие мутационной селекции.

В WO 2012/041913 описываются растения табака с уменьшенным содержанием тяжелого металла в листьях. Это достигается за счет использования растений табака, которые содержат по меньшей мере одну мутацию в гене HMA. Мутации приводят к замене, или делеции, или вставке по меньшей мере одной аминокислоты в полипептиде, который кодируется нуклеотидной последовательностью и уменьшает количество тяжелого металла, поглощенного листьями растения. Различные точечные мутации были идентифицированы в WO 2012/041913, как обобщено в табл. 1 в данном документе. Данная ссылка представляет данные о небольших проростках, выращенных в водной культуре. В данной системе, присутствовали очень большие концентрации Cd и Zn, которые не отображают состояния в системах открытых полей. Концентрации Cd, измеренные в листьях контрольных растений в таких системах, имеют значения в 30-300 раз более высокие по сравнению с концентрациями, обнаруженными в условиях грунта.

Hernand et al. (2014) описывают эффекты инактивации ортологов табака HMA2 и HMA4 *Arabidopsis thaliana* с применением мутации, полученной с помощью EMS-обработки. AtHMA2 и AtHMA4 кодируют АТФазы (HMA), которые транспортируют такие тяжелые металлы, как цинк (Zn) и Cd, от корней к побегам. Два ортолога генов AtHMA2 и AtHMA4 были идентифицированы в геноме *N. tabacum* и названы NtHMA α и NtHMA β соответственно. Экспрессия была изменена с целью определения возможности использования данного подхода получения линий табака с уменьшенными уровнями Cd в листьях. С целью изучения роли данных генов NtHMA в табаке линии табака, содержащие мутацию в каком либо из генов NtHMA, идентифицировали с помощью скрининга группы мутантов, подвергнутой мутагенезу с помощью EMS. Миссенс-мутации (P249S, E387K и G515R) и нонсенс-мутации (W265* и R529*) были идентифицированы или в NtHMA α (P294S, E387K и W265*), или в NtHMA β (G515R, R520*). Данные мутации приводили к изменению аминокислот или вводили преждевременные стоп-кодоны во вторую (P294S и W265*) и третью (E387K, G515R и R520*) цитозольные петли белка HMA. Гомозиготные одиночные мутантные линии, разработанные Hernand et al. (2014), выращивали в искусственно стерильных условиях на агаровых пластинках, содержащих среду Мусариге-Скуга. Результаты, полученные с одиночными мутантами, как отмечено на фигурах 4a и b Hernand et al. (2014), обобщены в табл. 2 в данном документе. Было отмечено, что одиночные мутанты демонстрируют уменьшение накопления Cd и Zn в побегах. Было отмечено, что одиночные мутантные растения имеют параметры роста и развития, срав-

нимые с диким типом. Растения, содержащие нонсенс-мутацию в обоих генах NtHMA, демонстрировали сильную задержку роста и не производили семян. Примечательно, что данные, отмеченные на фиг. 4a и 4b, получены с применением небольших проростков, выращенных в стерильной культуре, в которой применялись искусственно завышенные концентрации Cd и Zn. Данные искусственно завышенные концентрации Cd и Zn не отображают естественные условия, которые присутствуют в открытых полевых условиях. Концентрации Cd, измеренные в побегах контрольных растений на фиг. 4a, составляют приблизительно 135 ч./млн. Данные концентрации имеют значения в приблизительно 30-300 раз более высокие по сравнению с концентрациями Cd, которые наблюдали в растениях, выращенных в полевых условиях. На основании результатов работы с применением мутантов, содержащих однонуклеотидные полиморфизмы, полученные с помощью обработки EMS, Hermand et al. (2014) сделали вывод, что функция NtHMA α/β должна сохраняться по меньшей мере частично для нормального роста и развития и что конструирование коммерчески доступных растений табака без наличия Cd в побегах не может быть достигнуто только посредством инактивации двух генов NtHMA. Обсуждается, что инактивация только одного из генов NtHMA может привести к получению коммерчески доступных растений, которые демонстрируют уменьшение концентрации Cd в побегах. Для дополнительного уменьшения способности растений накапливать Cd в листьях Hermand et al. (2014) рассмотрели объединение разных мутаций в генах NtHMA - такие как комбинация нонсенс-мутации в одном гене NtHMA с ликовой мутацией в другом гене NtHMA. Liedschulte et al. на 12-й конференции по Solanaceae (SOL2015), Бордо, Франция, с 25 по 29 октября 2015 г. описывает, что миссенс- или нонсенс-мутации или в HMA4.1, или в HMA4.2 (которые соответствуют NtHMA α и NtHMA β соответственно) не снижают содержания кадмия в листьях растений табака, выращенных в полевых условиях, в существенной мере. В данном исследовании описаны растения табака с RNAi HMA4, которые проявляют уменьшение содержания Cd в около 10 раз по сравнению с контролем, представляющим собой дикий тип. Однако фенотип был в значительной мере подвержен снижению роста, утолщению листьев и некротическим поражениям. Аналогичный фенотип был отмечен для мутантов табака с двойным нокаутом по HMA4 у Hermand et al., 2014. 19 гомозиготных линий с миссенс-мутацией по HMA4 и четыре гомозиготных линии с нонсенс-мутацией по HMA4 тестировали смежно с нуль-сегрегантами контрольными растениями в поле. Фенотипических различий в мутантных по HMA4 растениях не наблюдали. Статистически значимого (парный Т-критерий по соотношениям; $p < 0,05$) уменьшения уровня Cd и Zn выше неоднозначного измерения (20%) не наблюдали ни в одной из тестовых мутантных линий, содержащих или гомозиготную миссенс-мутацию, или нонсенс-мутацию в одном из генов HMA4. Liedschulte et al. (2015) в своем исследовании сделали вывод, что полный нокаут по HMA4 приводит к сильному уменьшению уровня Cd и Zn и фенотипическим изменениям, включая карликовость и некротические поражения. Также был сделан вывод, что в отличие от Hermand et al. (2014), вредные мутации в NtHMA4.1 или NtHMA4.2 не уменьшают уровни Cd в существенной мере в растениях, выращенных в полевых условиях. Подход Hermand et al. (2014), согласно сделанному выводу, не является применимым в полевых условиях.

Существует постоянная потребность в данной области в разработке подходов, таких как подходы без ГМО, для уменьшения накопления Cd в растениях, таких как табак, когда они растут вне помещения, в открытом поле, в большом масштабе для коммерческого производства. Настоящее изобретение направлено на удовлетворение этой потребности.

Краткое описание изобретения

В WO 2012/041913 и у Hermand et al. (2014) описываются полученные с помощью EMS мутантные линии табака, которые демонстрируют уменьшение накопления Zn и Cd в побегах при исключительно стерильных искусственных условиях или при гидропонных условиях роста. В отличие от идей WO 2012/041913 и Hermand et al. (2014) настоящее изобретение связано с уменьшением уровня Cd в растениях, когда они растут вне помещения в открытой среде (например, в поле) где уровни Cd являются в 30-300 раз более низкими, чем уровни Cd, использованные в WO 2012/041913 и Hermand et al. (2014). Понимается, что растения, описанные в настоящем изобретении, используются для коммерческого производства, что требует от растений быть выращенными в полевых условиях на открытом воздухе в очень больших количествах, нежели быть выращенными в искусственных условиях. Выращивать растения в искусственных условиях было бы коммерчески невыгодно. Настоящее изобретение направлено на обеспечение мутантными растениями такими как мутантные растения, не являющиеся ГМО, в которых уровень накопления Cd уменьшается, если они выращены в открытых полевых условиях.

Условия, использованные Hermand et al. (2014), не отображают естественные условия в открытых полевых условиях, которые представляют интерес в настоящем изобретении. Результаты, отмеченные Hermand et al. (2014), ограничены в использовании для специалиста в данной области, заинтересованного в уменьшении уровня Cd в растениях, выращенных в открытых полевых условиях, поскольку уровни Cd в открытых полевых условиях и в искусственных условиях, использованных Hermand et al. (2014), не сопоставимы. Кроме того, Liedschulte et al. (2015) делают вывод, что вредные мутации в NtHMA4.1 или NtHMA4.2 не уменьшают уровни Cd в существенной мере в растениях, выращенных в полевых условиях выше уровня неоднозначного измерения (приблизительно 20%). Подход Hermand et al. (2014), согласно

сделанному выводу, не является применимым в полевых условиях.

Авторы настоящего изобретения создали различных полученных с помощью EMS гомозиготных одиночных мутантов по НМА4, включая одиночную нонсенс-мутацию по W265*, отмеченную Hermand et al. (2014), и тестируемую ими в открытых полевых условиях. Результаты данного эксперимента отмечены в табл. 3 в данном документе. Результаты демонстрируют, что ни один из тестируемых одиночных мутантов, включая одиночную мутацию по W265* согласно Hermand et al. (2014), не показал снижения уровня Cd в открытых полевых условиях. Как можно видеть в табл. 3, четвертой колонке, % уменьшения уровня Cd по сравнению с контролем для каждого из тестируемых одиночных мутантов в открытых полевых условиях был равен 0%. Данные результаты согласуются с результатами, отмеченными Liedschulte et al. (2015).

На основании знаний, что ни один из одиночных мутантов, тестируемых и отмеченных в табл. 3 в данном документе, не показал какого-либо снижения уровня Cd в открытых полевых условиях, ожидания авторов настоящего изобретения заключались в том, что объединение двух или более из данных одиночных мутаций, которые неактивны в открытых полевых условиях, не будет иметь влияния или будет иметь незначительное влияние на уменьшение уровня Cd в открытых полевых условиях. Однако, и в противоположность данному ожиданию, авторы настоящего изобретения определили, что если различные одиночные мутации, как отмечено в табл. 3, объединить вместе в разных комбинациях с целью образовать двойных гомозиготных мутантов, то можно достигнуть высокого уровня уменьшения Cd в листе (например, 20% или больше) в открытых полевых условиях. В некоторых случаях уровень уменьшения Cd в листе, который был достигнут в открытых полевых условиях, составлял по меньшей мере приблизительно 27%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80% или даже приблизительно 90% или больше, как обобщено в табл. 4, 5 и 6 в данном документе. Данный высокий уровень уменьшения Cd является весьма выгодным в уменьшении уровня Cd в растениях, выращенных в открытых полевых условиях. Неожиданно, растения с двойной мутацией с уменьшенным уровнем Cd в листе, как описано в данном документе, не испытывают вредного влияния фенотипа такого как уменьшение количества роста/карликовости/биомассы. Выгодные результаты, отмеченные для двойных мутантов, описанные в данном документе, которые были обнаружены, не ожидалось и не предсказывались авторами настоящего изобретения. Основываясь на этих данных, настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на обнаружении того факта, что растения могут проявлять уменьшение накопления Cd в листе при выращивании в открытых полевых условиях, при уменьшении, по меньшей мере частично, экспрессии или активности NtHMA4.1 и NtHMA4.2. Соответствующим образом, растения, не являющиеся ГМО, могут быть получены за счет использования мутагенеза и, соответствующим образом, не испытывать вредного влияния фенотипа. NtHMA4.1 и NtHMA4.2 соответствуют NtHMA α и NtHMA β , соответственно, как отмечено Hermand et al. (2014). Преимущественно разные комбинации мутантов могут быть использованы как набор инструментов для выведения различных разновидностей с уменьшенным уровнем кадмия и без дефектного фенотипа и/или урожая.

Аспекты и варианты осуществления изобретения

В первом аспекте, описаны мутантное растение или его часть, которые характеризуются по меньшей мере частично уменьшенной экспрессией или активностью по меньшей мере двух АТФаз тяжелых металлов (НМА), при этом указанные две НМА предусматривают, состоят из или состоят, по сути, из (i) полипептидов, которые характеризуются по меньшей мере 65% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2; (ii) полинуклеотидов, кодирующих полипептиды, изложенные в (i); или (iii) полинуклеотидов, которые характеризуются по меньшей мере 65% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, кодирующими НМА; где мутантное растение или его часть проявляют уменьшение по меньшей мере 27% по сравнению с контрольным растением, накопления кадмия в листе, если мутантное растение выращено в поле в присутствии встречающегося в природе или не встречающегося в природе кадмия.

Соответствующим образом, экспрессия или активность одного из НМА, изложенных в (i), или (ii), или (iii), являются частично уменьшенными или утраченными, и экспрессия или активность одного из НМА, изложенных в (i), или (ii), или (iii), являются утраченными по сравнению с контрольным растением.

Соответствующим образом фенотип мутантного растения или его части во время сбора является таким же, как у контрольного растения в такое же время сбора, соответствующим образом, при этом мутантное растение или его часть не демонстрируют уменьшения биомассы (например, веса листа) во время сбора по сравнению с контрольным растением в такое же время сбора.

Соответствующим образом мутантное растение или его часть содержат по меньшей мере одно генетическое изменение в регуляторном участке или в кодирующей последовательности каждой из полинуклеотидных последовательностей, изложенных в (ii) или (iii), соответствующим образом, при этом мутация представляет собой миссенс-мутацию или нонсенс-мутацию. Соответствующим образом мутантное растение или его часть содержат одну или более следующих мутаций: по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению в петле А-домена полипептида НМА, кодируемого немутированной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 3, и по меньшей

аминокислотному положению 265 в SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой G251D и W265*, при этом * указывает на стоп-кодон; миссенс-мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 251 в SEQ ID NO: 2 и миссенс-мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 223 в SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой G251D и L223F; миссенс-мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 251 в SEQ ID NO: 2 и миссенс-мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 234 в SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой G251D и D234N; миссенс-мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 251 в SEQ ID NO: 2 и миссенс-мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 235 в SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой G251D и G235E; миссенс-мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 438 в SEQ ID NO: 2 и нонсенс-мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 в SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой H438Y и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; миссенс-мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 438 в SEQ ID NO: 2 и миссенс-мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 223 в SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой H438Y и L223F, при этом * указывает на стоп-кодон; миссенс-мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 438 в SEQ ID NO: 2 и миссенс-мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 234 в SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой H438Y и D234N, при этом * указывает на стоп-кодон; и миссенс-мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 438 в SEQ ID NO: 2 и миссенс-мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 235 в SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой H438Y и G235E, при этом * указывает на стоп-кодон.

В дополнительном аспекте раскрыт способ уменьшения уровня кадмия в листе выращенного в поле растения, предусматривающий стадии: (а) уменьшения экспрессии или активности двух АТФаз тяжелого металла (НМА), при этом указанные две НМА предусматривают, состоят из или состоят, по сути, из: (i) полипептидов, которые характеризуются по меньшей мере 65% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2; (ii) полинуклеотидов, кодирующих полипептиды, изложенные в (i); или (iii) полинуклеотидов, которые характеризуются по меньшей мере 65% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, кодирующими НМА, соответствующим образом, при этом экспрессия или активность (НМА) уменьшены с помощью мутагенеза или редактирования генома; (b) растений, растущих в поле; (c) необязательно измерений содержания кадмия в растениях, полученных на стадии (b); и (d) идентификации растения, в котором содержание кадмия, находящегося в нем, уменьшено по сравнению с контрольным растением, в котором экспрессия или активность НМА не были уменьшены, соответствующим образом, при этом растение или его часть проявляют по меньшей мере 27% уменьшение по сравнению с контрольным растением в накоплении кадмия в листе, когда растение выращено в поле в присутствии встречающегося в природе или не встречающегося в природе кадмия; при этом соответствующим образом, фенотип мутантного растения или его части во время сбора является таким же, как у контрольного растения в такое же время сбора, соответствующим образом, при этом мутантное растение или его часть не демонстрируют уменьшения биомассы (например, веса листа) во время сбора по сравнению с контрольным растением в такое же время сбора.

В дополнительном аспекте раскрыт способ идентификации одного или более генетических изменений в выращенных в поле растениях, который коррелирует с уменьшенными уровнями кадмия в листе по сравнению с выращенным в поле контрольным растением, которое не содержит одного или более генетических изменений, при этом указанный способ предусматривает стадии (а) идентификации растения с уменьшенными уровнями кадмия в листьях при выращивании в поле по сравнению с контрольным растением, которое выращено в поле, при этом необязательно фенотип растения или его части во время сбора является таким же, как у контрольного растения в такое же время сбора, соответствующим образом, при этом растение или его часть не демонстрируют уменьшения биомассы (например, веса листа) во время сбора по сравнению с контрольным растением в такое же время сбора; (b) обеспечения образца нуклеиновой кислоты из растения, идентифицированного на стадии (а); и (c) идентификации в образце нуклеиновой кислоты из стадии (b) одного или более генетических изменений в полинуклеотидных последовательностях, кодирующих НМА, которые характеризуются по меньшей мере 65% идентичностью последовательности с немутированными последовательностями, изложенными под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, или в полинуклеотидной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 65% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

В дополнительном аспекте раскрыт растительный материал, полученный из мутантного растения или его части, как описано в данном документе, соответствующим образом, при этом растительный материал является подсушенным или высушенным растительным материалом, соответствующим образом, при этом фенотип мутантного растения или его части во время сбора является таким же, как у контрольного растения в такое же время сбора, соответствующим образом, при этом мутантное растение или его часть не демонстрируют уменьшения биомассы (например, веса листа) во время сбора по сравнению с

контрольным растением в такое же время сбора.

В дополнительном аспекте раскрыт способ получения растительного материала с уменьшенным накоплением кадмия в листе, когда растение выращено в поле, по сравнению с выращенным в поле контрольным растением, при этом указанный способ предусматривает стадии: (a) обеспечения мутантного растения или его части, как описано в данном документе; (b) выращивания растения в поле и (c) сбора растительного материала из растения, соответствующим образом, при этом фенотип мутантного растения или его части во время сбора является таким же, как у контрольного растения в такое же время сбора, соответствующим образом, при этом мутантное растение или его часть не демонстрируют уменьшения биомассы (например, веса листа) во время сбора по сравнению с контрольным растением в такое же время сбора.

В дополнительном аспекте раскрыто мутантное растение или его часть или растительный материал, полученный или получаемый из них, который получен или получаемый можно получить с помощью способа по п.7, соответствующим образом, при этом фенотип мутантного растения или его части во время сбора является таким же, как у контрольного растения в такое же время сбора, соответствующим образом, при этом мутантное растение или его часть не демонстрируют уменьшения биомассы (например, веса листа) во время сбора по сравнению с контрольным растением в такое же время сбора.

В дополнительном аспекте раскрыт растительный продукт, содержащий по меньшей мере часть мутантного растения или его часть или растительный материал, описанные в данном документе.

В дополнительном аспекте раскрыт табачный продукт, или курительное изделие, или потребительский продукт, содержащие мутантное растение или часть, или растительный материал, или растительный продукт, описанные в данном документе.

Соответствующим образом, по меньшей мере одно генетическое изменение введено с помощью (i) нецелевой обработки семенного материала мутагенным средством или (ii) подвергнуто воздействию системы редактирования генома, такой как сконструированная система на основе CRISPR/Cas, сконструированная эффекторная нуклеаза, подобная активаторам транскрипции, сконструированная нуклеаза с "цинковыми пальцами" или сконструированная мегануклеаза.

В дополнительном аспекте раскрыт выделенный полипептид, кодирующий полипептид АТФазы металла (НМА), характеризующийся по меньшей мере 60% идентичностью последовательности с немутированной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 1, и содержащий одну или более мутаций, описанных в данном документе.

В дополнительном аспекте раскрыт выделенный полипептид, кодирующий полипептид АТФазы металла (НМА), характеризующийся по меньшей мере 60% идентичностью последовательности с немутированной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 2, и содержащей одну или более мутаций, описанных в данном документе.

В дополнительном аспекте раскрыта комбинация из выделенных полипептидов, содержащая выделенные полипептиды, описанные в данном документе.

В дополнительном аспекте раскрыта выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид (полипептиды), описанный (описанные) в данном документе.

В дополнительном аспекте раскрыта конструкция, вектор или вектор экспрессии, содержащие выделенный полинуклеотид (полинуклеотиды), описанный (описанные) в данном документе.

В дополнительном аспекте раскрыта клетка мутантного растения из мутантного растения или его части или растительного материала, как описано в данном документе.

В дополнительном аспекте раскрыт подсушенный или высушенный растительный материал, содержащий клетку мутантного растения, как описано в данном документе.

Соответствующим образом, мутантное растение, описанное в данном документе, получено с помощью мутагенеза (например, мутагенез с помощью EMS) или редактирования генома (например, применение системы на основе CRISPR/Cas, сконструированной эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции, сконструированной нуклеазы с "цинковыми пальцами" или сконструированной мегануклеазы).

Некоторые преимущества

Получение растений согласно с настоящим изобретением обеспечивает ряд преимуществ.

Растения, описанные в данном документе, могут представлять собой растения, не являющиеся ГМО, которые преодолевают трудности выращивания и коммерческого использования генетически модифицированных сельскохозяйственных культур.

Растения, описанные в данном документе, могут быть выращены на почвах, содержащих различные концентрации Cd. Данные растения и производные от них семена могут обеспечить больше вариантов для культивирования в более широком спектре условий почвенной среды, которые могут увеличить количество пригодной для обработки почвы, доступной для практикующих специалистов. Это также может увеличить диапазон потенциально приемлемых фосфатных удобрений, которые могут содержать более высокие уровни Cd в качестве загрязняющего элемента. Таким образом, недорогие фосфатные удобрения могут стать приемлемыми для продукции растениеводства.

Курение продуктов, полученных с данных растений, и потребление продовольственных культур, к

которым можно применить настоящее изобретение, может быть более полезным вариантом из-за более низких уровней Cd. % уменьшения уровня Cd в мутантных растениях, и в частности в надземной части мутантных растений, включая мембрану листовой пластинки, может быть приблизительно по меньшей мере от 20, 27, 30, 33, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% или больше, если сравнивать с аналогом дикого типа.

Фенотип мутантных растений, описанный в данном документе, может быть аналогичным или таким же как у аналогов дикого типа, в частности во время сбора, что означает, что количество биомассы, полученное для продукции, является коммерчески приемлемым. В частности, мутантные растения не испытывают пагубного влияния от уменьшения роста/карликовости, в частности во время сбора.

Комбинации мутаций, которые приводят к низкому возможному содержанию Cd в сочетании с коммерчески приемлемыми уровнями биомассы, могут быть выбраны согласно с видом растений и интересующим сортом табака.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Уровни экспрессии генов для HMA4.1 и HMA4.2 у TN90 и K326 в 8 тканях. Соотношение экспрессии генов между корнями и листьями является аналогичным для обоих HMA4.1 и HMA4.2. Растения, использованные в эксперименте, представляют собой зрелые растения, выращенные в поле. Столбцы и ошибки представляют собой средние и верхние доверительные интервалы трех параллелей растений.

Фиг. 2. Уровни экспрессии генов HMA4.1 и HMA4.2 в линиях с RNAi HMA4 TN90 и K326 и их соответствующих контролях WT. Все корни собирали у растений, выращенных на агаре, измельчали и экстрагировали. Столбцы и ошибки представляют собой среднее значение и стандартное отклонение (SD) 4 параллелей растений; *, **, и *** указывают на уровни значимости при $P < 0,05$, $P < 0,01$ и $P < 0,001$ соответственно по сравнению с контрольными растениями WT.

Фиг. 3. (a) Растения табака K326 и TN90 с RNAi HMA4 и их соответствующие фоновые растения WT, выращенные в течение пяти недель при режиме внесения удобрений с низким содержанием N в теплице. Определены (b, c) уровни Cd/Zn в сухом весе, (d) высота, (e) вес листа, (f) толщина листа и (g) содержание воды (сравнение между свежим и сухим весом). Столбцы и ошибки представляют собой среднее значение \pm SD для пяти растений; *, **, и *** указывают уровни значимости при $P < 0,05$, $P < 0,01$ и $P < 0,001$ соответственно по сравнению с необработанными контрольными растениями. Точечная пунктирная линия указывает на $LOQ = 0,05$ ч./млн для измерения уровня Cd.

Фиг. 4. (a) Фенотип, (b) вес свежего листа и уровни (c) Cd в листе и (d) Zn в листе в сухом весе мутантных растений, содержащих уменьшенные значения функциональных аллелей HMA4 после пяти (левый) и одиннадцати (правый) недель роста в теплице. Генотип указан под панелями: A и a представляют собой мутантные аллели и аллели дикого типа для HMA4.1, B и b представляют собой мутантные аллели и аллели дикого типа для HMA4.2. Столбцы и ошибки представляют собой среднее значение \pm SD для восьми растений; *, **, и *** указывают на уровни значимости при $P < 0,05$, $P < 0,01$ и $P < 0,001$ соответственно по сравнению с контрольными растениями WT. Точечные пунктирные линии указывают на $LOQ = 0,05$ ч./млн для измерения уровня Cd.

Фиг. 5. Анализ уровня (a) Cd и (b) Zn в листе и (c) веса свежего листа в разных двойных мутантных растениях и их соответствующих нуль-сегрегантных по HMA4 контрольных растениях WT, выращенных в течение пяти и одиннадцати недель на почве в теплице. Черные столбцы указывают на нуль-сегрегантные контрольные растения, серые столбцы на соответствующих гомозиготных по HMA4 двойных мутантов; *, **, и *** указывают на уровни значимости при $P < 0,05$, $P < 0,01$ и $P < 0,001$ соответственно по сравнению с контрольными растениями WT. Точечные пунктирные линии указывают на $LOQ = 0,05$ ч./млн для измерения уровня Cd.

Фиг. 6. Данные (a) уровня Cd в листе и (b) веса свежего листа мутантов по HMA4, выращенных в поле на участке, где присутствует умеренное содержание Cd. Указан генотип: A и a представляют собой мутантные аллели и аллели дикого типа для HMA4.1, B и b представляют собой мутантные аллели и аллели дикого типа для HMA4.2. Объединенные образцы листьев собирали при нижнем положении стебля на шести (для некоторых генотипов 3) повторяющихся опытных участках. Столбцы и ошибки представляют собой среднее значение и стандартное отклонение от 3-6 измерений дублируемых опытных участков; *, **, и *** указывают на уровни значимости при $P < 0,05$, $P < 0,01$ и $P < 0,001$ соответственно по сравнению с контрольными растениями WT. Точечные пунктирные линии указывают на $LOQ = 0,05$ ч./млн для измерения уровня Cd.

Фиг. 7. Данные (a) уровня Cd в листе и (b) сухого веса листа для мутантов по HMA4, выращенных в поле на участке, где присутствует умеренное содержание Cd. Черные столбцы указывают на нуль-сегрегантные контрольные растения, серые столбцы на соответствующих гомозиготных по HMA4 двойных мутантов. Объединенные образцы листьев собирали при нижнем положении стебля на шести (для Q293*/W265* и Q293*/D234N четырех) повторяющихся опытных участках. Столбцы и ошибки представляют собой среднее значение и стандартное отклонение.

Фиг. 8. Данные (a, b) уровня Cd в листе и (c, d) веса подсушенного листа мутантов по HMA4, выра-

щенных в поле на двух участках, где присутствует высокое содержание Cd; (a) и (c) соответствуют данным уровня Cd и веса подсушенного листа из поля 3 и b и d соответствуют Cd и данным веса подсушенного листа с поля 4. Черные столбцы указывают на нуль-сегрегантные контрольные растения, серые столбцы на соответствующих гомозиготных по HMA4 двойных мутантов. Объединенные образцы листьев собирали при нижнем положении стебля в пяти повторяющихся опытных участках. Столбцы и ошибки представляют собой среднее значение и стандартное отклонение.

Фиг. 9. Схема белков HMA4 *N. tabacum*. Три функциональных домена выполняют реализацию каталитических функций: фосфорилирующий домен (P), домен нуклеотидного связывания (N) и исполнительный домен (A), которые расположены во второй и третьей цитоплазматических петлях белка. Миссенс-мутации, которые, как оказалось, имеют влияние на функцию белка и уменьшают уровень Cd в сочетании с нонсенс-мутацией, выделены символами подчеркивания. Все остальные миссенс-мутации, проанализированные в данном исследовании, не имели влияния на уменьшение уровня Cd в сочетании с нонсенс-мутацией. Нонсенс-мутации выделены черным цветом. (Данная модель предназначена для иллюстративных целей и не отображает сворачивание домена.)

Определения

Техническим терминам и выражениям, используемым в пределах объема данного изобретения, следует придавать значение, которое обычно применяется к ним в данной области биологии растений и молекулярной биологии. Все нижеследующие определения терминов применяют ко всему содержанию данного изобретения. Слово "содержащий" не исключает другие элементы или стадии, а формы единственного числа не исключают множественное. Одна стадия может выполнять функции нескольких признаков, изложенных в формуле изобретения. Термины "приблизительно", "главным образом" и "примерно" в контексте данного цифрового значения или диапазона относятся к значению или диапазону, которые находятся в пределах 20%, в пределах 10%, или в пределах 5, 4, 3, 2 или 1% от данного значения или диапазона.

Термин "выделенный" относится к любому объекту, который взят из его естественной среды, но этот термин не подразумевает какой-либо степени очистки.

"Вектор экспрессии" представляет собой средство доставки нуклеиновой кислоты, которое содержит комбинацию компонентов нуклеиновой кислоты для обеспечения экспрессии нуклеиновой кислоты. Подходящие векторы экспрессии включают в себя эписомы, способные к внехромосомной репликации, такие как кольцевые плазмиды из двухнитевой нуклеиновой кислоты; линейаризованные плазмиды из двухнитевой нуклеиновой кислоты и другие функционально эквивалентные векторы экспрессии любого происхождения. Вектор экспрессии содержит по меньшей мере промотор, расположенный выше по цепи и функционально связанный с нуклеиновой кислотой, конструкции нуклеиновых кислот или конъюгат нуклеиновых кислот, как определено ниже.

Термин "конструкция" относится к двухнитевому фрагменту рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащему один или несколько полинуклеотидов. Конструкция содержит "матричную цепь", основанная которой спарены с комплементарной "смысловой или кодирующей цепью". Данная конструкция может быть встроена в вектор в двух возможных ориентациях, либо в той же (или смысловой) ориентации, либо в обратной (или антисмысловой) ориентации по отношению к ориентации промотора, расположенного в векторе, таком как вектор экспрессии.

"Вектор" относится к средству доставки нуклеиновой кислоты, которое содержит комбинацию компонентов нуклеиновой кислоты для обеспечения переноса нуклеиновой кислоты, конструкций нуклеиновых кислот и конъюгатов нуклеиновых кислот и тому подобного. Подходящие векторы включают в себя эписомы, способные к внехромосомной репликации, такие как кольцевые плазмиды из двухнитевой нуклеиновой кислоты; линейаризованные плазмиды из двухнитевой нуклеиновой кислоты и другие векторы любого происхождения.

"Промотор" относится к элементу/последовательности нуклеиновой кислоты, как правило расположенным выше по цепи и функционально связанным с фрагментом двухнитевой ДНК. Промоторы могут быть получены целиком из областей вблизи нативного представляющего интерес гена или могут состоять из разных элементов, полученных из различных нативных промоторов или сегментов синтетической ДНК.

Термины "гомология, идентичность или сходство" относятся к степени сходства последовательностей между двумя полипептидами или между двумя молекулами нуклеиновых кислот, сравниваемых путем выравнивания последовательностей. Степень гомологии между двумя отдельными сравниваемыми последовательностями нуклеиновых кислот является функцией количества идентичных или совпадающих нуклеотидов в сопоставимых положениях. Процент идентичности может быть определен путем визуального осмотра и математических расчетов. В качестве альтернативы процент идентичности двух последовательностей нуклеиновых кислот можно определить путем сравнения информации о последовательностях с применением компьютерной программы, такой как ClustalW, BLAST, FASTA или Smith-Waterman. Процент идентичности двух последовательностей может принимать разные значения в зависимости от (i) способа, используемого для выравнивания последовательностей, например, ClustalW, BLAST, FASTA, способа Смита-Уотермана (используемых в разных программах), или структурного вы-

равнивания из 3D-сравнения; и (ii) параметров, используемых способом выравнивания, например, локального выравнивания по сравнению с глобальным, используемой матрицы замен пар (например, BLOSUM62, PAM250, Gonnet и т.д.) и штрафа за пропуск, например, функциональной формы и констант. После проведения выравнивания существуют разные способы подсчета процента идентичности между двумя последовательностями. Например, можно разделить количество идентичностей на (i) длину самой короткой последовательности; (ii) длину выравнивания; (iii) среднюю длину последовательности; (iv) количество положений без пропуска; или (iv) количество эквивалентных положений за исключением выступающих концов. Более того, следует понимать, что процент идентичности также является строго зависимым от длины. Вследствие этого, чем более короткой является пара последовательностей, тем большую идентичность последовательностей, возникшую случайно, можно ожидать. Популярная программа для множественного выравнивания ClustalW (Nucleic Acids Research (1994) 22, 4673-4680; Nucleic Acids Research (1997), 24, 4876-4882) является подходящим способом получения множественных выравниваний полипептидов или полинуклеотидов.

Подходящие параметры для ClustalW могут являться следующими.

Для выравниваний полинуклеотидов:

штраф за открытие пропуска=15,0,

штраф за удлинение пропуска=6,66,

матрица=идентичность.

Для выравниваний полипептидов:

штраф за открытие пропуска=10,0,

штраф за удлинение пропуска=0,2,

матрица=Gonnet.

Для выравниваний ДНК и белка: ENDGAP=-1 и GAPDIST=4. Специалистам в данной области техники известно, что может быть необходимо варьировать данные и другие параметры для оптимального выравнивания последовательностей. Соответствующим образом, затем проводят расчет процента идентичностей на основании такого выравнивания в виде (N/T), где N представляет собой количество положений, в которых в последовательностях присутствует идентичный остаток, и T представляет собой общее количество сравниваемых положений, с включением пропусков, но за исключением выступающих концов.

"Вариант" означает в значительной степени аналогичную последовательность. Вариант может обладать аналогичной функцией или в значительной степени аналогичной функцией относительно последовательности дикого типа. Для вариантов, описанных в данном документе, аналогичная функция составляет по меньшей мере приблизительно 50, 60, 70, 80 или 90% от функции фермента дикого типа. Для вариантов, описанных в данном документе, по существу аналогичная функция составляет по меньшей мере приблизительно 90, 95, 96, 97, 98 или 99% от функции фермента дикого типа. Варианты могут иметь одну или более благоприятных мутаций, которые приводят к получению фермента, характеризующегося сниженным уровнем активности по сравнению с полипептидом дикого типа. Варианты могут иметь одну или более благоприятных мутаций, которые приводят к нокауту их активности (т.е. 100% ингибированию и, таким образом, нефункциональному полипептиду). Иллюстративные варианты, имеющие одну или более благоприятных мутаций, описаны в данном документе.

Термин "растение" относится к любому растению или части растения на любой стадии его жизненного цикла или развития, а также к его потомству. В одном варианте осуществления растение представляет собой "растение табака", которое относится к растению, принадлежащему к роду *Nicotiana*. Предпочтительные виды растения табака описаны в данном документе. Соответствующим образом, растение представляет собой мутантное растение, в котором экспрессию одного или более генов или активность одного или более белков модулируют по сравнению с контрольным растением. Соответствующим образом, изменение, которое делает растение мутантным растением, приводит к модуляции экспрессии одного или более генов или модуляции активности одного или более полипептидов. В некоторых вариантах осуществления изменение представляет собой генетическое изменение или генетическую модификацию.

"Части растения" включают клетки растения, протопласты растений, тканевые культуры клеток растений, из которых можно регенерировать целое растение, каллюсы растений, корневища растений и клетки растений, которые являются интактными в растениях или частях растений, таких как зародыши, пыльца, пыльники, семязпочки, семена, листья, цветки, стебли, ветви, плод, корни, кончики корней и т.п. Потомство, варианты и мутанты регенерированных растений также включены в объем настоящего раскрытия при условии, что они содержат введенные полинуклеотиды, описанные в данном документе. Листья растений являются в особенности предпочтительными для применения в настоящем изобретении.

"Клетка растения" относится к структурной и физиологической единице растения. Клетка растения может находиться в виде протопласта без клеточной стенки, выделенной отдельной клетки или культивируемой клетки, или может быть представлять часть более высокоорганизованной единицы, такой как без ограничения растительная ткань, орган растения или целое растение.

Термин "растительный материал" относится к любой твердой, жидкой или газообразной композиции, или их комбинации, получаемой из растения, включая биомассу, листья, стебли, корни, цветки или

части цветка, плоды, пыльцу, яйцеклетки, зиготы, семена, черенки, секреты, экстракты, клеточные или тканевые культуры, или любые другие части или продукты растения. В одном варианте осуществления растительный материал содержит или состоит из биомассы, стеблей, семян или листьев. В другом варианте осуществления растительный материал содержит листья или состоит из них.

Термин "разновидность" относится к популяции из растений, которые обладают постоянными свойствами, отделяющими их от других растений того же вида. Имея один или несколько отличительных признаков, разновидность дополнительно характеризуется очень небольшой общей изменчивостью особей в пределах такой разновидности. Разновидность зачастую является предметом коммерческих продаж.

Термины "линия" или "селекционная линия", используемые в данном документе, обозначают группу растений, которые используют при селекции растений. Линия отличается от разновидности, поскольку демонстрирует небольшую вариабельность между особями по одному или нескольким представляющим интерес признакам, хотя может присутствовать некоторая вариабельность между особями по другим признакам.

Термин "не встречающийся в природе", используемый в данном документе, описывает объект (например, полинуклеотид, генетическую мутацию, полипептид, растение и клетку растения и растительный материал), который не образован природой или не существует в природе. Такие не встречающиеся в природе объекты или искусственные объекты можно создать, синтезировать, произвести, модифицировать, подвергнуть вмешательству или манипуляции способами, описанными в данном документе, или которые известны из уровня техники. Такие не встречающиеся в природе объекты или искусственные объекты можно создать, синтезировать, произвести, модифицировать, подвергнуть вмешательству или манипуляции человеком. Таким образом, в качестве примера не встречающегося в природе растения, не встречающуюся в природе клетку растения или не встречающийся в природе растительный материал можно создать с применением методик манипуляции с генами, например, с использованием антисмысловой РНК, интерферирующей РНК, мегануклеазы и т.п. В качестве дополнительного примера не встречающегося в природе растения, не встречающуюся в природе клетку растения или не встречающийся в природе растительный материал можно создать с применением интрогрессии или путем переноса одной или нескольких генетических мутаций (например, одного или нескольких полиморфизмов) от первого растения или клетки растения во второе растение или клетку растения (которые сами по себе могут быть встречающимися в природе), так что полученное растение, клетка растения или растительный материал или их потомство содержат генетическую структуру (например, геном, хромосому или ее сегмент), которая не образована естественным путем или которая не существует в природе. Полученное растение, клетка растения или растительный материал, таким образом, являются искусственными или не встречающимися в природе. Соответственно искусственные или не встречающиеся в природе растение или клетку растения можно создать путем модификации генетической последовательности в первом встречающемся в природе растении или клетке растения, даже если полученная генетическая последовательность встречается в природе во втором растении или клетке растения, генетический фон которых отличается от такового первого растения или клетки растения.

Термин "модулирование" может относиться к снижению, ингибированию, устранению, повышению или иному влиянию на экспрессию или активность полипептида. Этот термин может также относиться к снижению, ингибированию, устранению, повышению или иному влиянию на активность гена, кодирующего полипептид, который может включать в себя без ограничения модулирование транскрипционной активности.

Термины "снижение" или "сниженный", используемые в данном документе, относятся к снижению от приблизительно 10% до приблизительно 99%, или снижению, составляющему по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или по меньшей мере 100% или более от количества или активности, такой как, без ограничения, полипептидная активность, транскрипционная активность и экспрессия белка.

Термины "ингибировать" или "ингибированный" или "устранять" или "устраненный", используемые в данном документе, относятся к снижению от приблизительно 98% до приблизительно 100%, или снижению, составляющему по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, но в особенности 100% от количества или активности, такой как, без ограничения, полипептидная активность, транскрипционная активность и экспрессия.

Трансформация клетки может быть стабильной или временной. Термины "временная трансформация" или "временно трансформированный" или варианты указанных терминов относятся к введению одного или более экзогенных полинуклеотидов в клетку при отсутствии встраивания экзогенного полинуклеотида в геном клетки-хозяина. Напротив, термины "стабильная трансформация" или "стабильно трансформированный" относятся к введению и интеграции одного или более экзогенных полинуклеотидов в геном клетки. Термин "стабильный трансформант" относится к клетке, в которую стабильно интегрировали один или более экзогенных полинуклеотидов в геномную ДНК или ДНК органелл. Следует понимать, что организм или его клетка, трансформированные нуклеиновыми кислотами, конструкциями

и/или векторами согласно настоящему изобретению, могут являться временно, а также стабильно трансформированными. В некоторых вариантах осуществления стабильная трансформация является предпочтительной.

Термин "повышение" или "повышенный", используемые в данном документе, относятся к повышению от приблизительно 5% до приблизительно 99%, или повышению, составляющему по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или по меньшей мере 100% или более от количества или активности, такой как, без ограничения, полипептидная активность, транскрипционная активность и экспрессия белка.

Термин "в значительной степени", используемый в данном документе и при использовании в контексте количества означает, что количество составляет по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 9%, по меньшей мере приблизительно 8%, по меньшей мере приблизительно 7%, по меньшей мере приблизительно 6%, по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 4%, по меньшей мере приблизительно 3%, по меньшей мере приблизительно 2%, по меньшей мере приблизительно 1% или по меньшей мере приблизительно 0,1% от количества, с которым его сравнивают.

Термин "контроль" в контексте контрольного растения или контрольной клетки растения и т.п. означает растение или клетку растения, в которых экспрессия или активность гена или белка, представляющих интерес, не были модулированы, и поэтому данный контроль может обеспечить сравнение или эталон относительно растения или клетки растения, в которых экспрессия или активность фермента были модифицированы. Таким образом, в контексте настоящего изобретения, контроль не будет содержать по меньшей мере одно генетическое изменение, которое снижает экспрессию или активность НМА4, описанного(описанных) в данном документе. Контрольное растение или клетка растения могут содержать пустой вектор. Контрольное растение или клетка растения могут соответствовать растению дикого типа или клетке растения дикого типа и т.п. Во всех таких случаях исследуемое растение и контрольное растение выращивают и собирают при одинаковых условиях с применением одинаковых протоколов для целей сравнения. Таким образом, в качестве примера исследуемое растение и контрольное растение могут быть выращены и собраны с почвы с приблизительно такими же уровнями содержания тяжелого (тяжелых) металла (металлов), такого как Cd, и, таким образом, можно выполнить сравнение между ними двумя. Это может привести к тому, что исследуемое растение и контрольное растение могут быть выращены в той же части поля, например, таким образом, их подвергают влиянию приблизительно таких же уровней Cd в почве. Изменения в уровнях, соотношениях, активности или распределении в отношении генов или полипептидов, описанных в данном документе, или изменения в фенотипе растения, в частности, сниженное накопление Cd и/или цинка, можно измерять способом, описанным в данном документе, сравнивая исследуемое растение с контрольным растением, соответствующим образом, при этом исследуемое растение и контрольное растение культивировали и/или собирали с применением одинаковых протоколов. Контрольное растение может обеспечивать эталонную точку для измерения изменений фенотипа исследуемого растения. Показатель изменений в фенотипе можно измерять в любой момент времени для растения, в том числе во время развития растения, старения или после обработки. Показатель изменений фенотипа можно измерять у растений, выращиваемых в любых условиях, в том числе у растений, выращиваемых в вегетационной камере, теплице или в поле. Изменения в фенотипе можно определить с помощью измерения содержания Cd и/или содержания цинка перед, и/или во время, и/или после отвердения или подсушивания с использованием способов, хорошо известных из уровня техники.

Термин "поле", используемый в данном документе, предполагает его нормальное значение в области техники, а именно участок открытого грунта, в частности тот, который может быть засажен или засажен сельскохозяйственными культурами. Поле представляет собой часть окружающей природной среды, нежели искусственную среду - такую как лаборатория или теплица. Таким образом, в отличие от искусственной среды, которая обычно представляет собой строение или структуру, сделанные человеком, поле представляет собой часть открытой внешней среды.

Как описано в данном документе, экспрессия или активность НМА могут быть частично уменьшенными в мутантном растении. Используемый в данном документе термин "частично уменьшен" означает, что экспрессия или активность НМА в мутантном растении составляют от приблизительно 1% до 99% ниже, чем уровень экспрессии или активности НМА в контрольном растении. Соответствующим образом, экспрессия или активность НМА в мутантном растении составляют по меньшей мере от приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% ниже, чем уровень экспрессии или активности НМА в контрольном растении. В качестве примера ожидается, что нонсенс-мутация, которая отсекает большую часть белка НМА, не будет демонстрировать какой-либо ферментативной активности, тем самым приводя к полной потере активности (другими словами, нулевая активность). В качестве дополнительного примера для миссенс-мутации, ферментативная активность может быть такой же, как в контрольном растении, частично уменьшенной или не поддающейся выявлению (например, полностью утерянной или нулевой).

Подробное описание

Выделенные варианты (мутанты) полипептида НМА4, описанные в данном документе, содержат полипептидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 65% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 и содержит по меньшей мере одну мутацию аминокислоты по сравнению с последовательностями дикого типа, изложенными в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 представляют собой немутированные последовательности. SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответствуют аминокислотной последовательности АТФазы тяжелого металла *Nicotiana tabacum* (NtHMA4.1), № доступа в GenBank: CCQ77798, и аминокислотной последовательности АТФазы тяжелого металла *Nicotiana tabacum* (NtHMA4.2), № доступа в GenBank: CCW03243.1, соответственно. Соответствующим образом, выделенный полипептид содержит, состоит из или состоит по существу из последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 65, 66, 67, 68, 69, 70, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или 100% идентичностью последовательности с ним и содержит по меньшей мере одну мутацию аминокислоты. Определенные растения, такие как *N. tabacum*, содержат два гомолога НМА4, которые обозначаются в данном документе как НМА4.1 и НМА4.2.

В растении, клетке растения или растительном материале и им подобным функция или активность мутантного полипептида является модулируемой, уменьшенной, частично инактивированной, ингибированной, устраненной, приведенной к нокауту или утраченной. В одном варианте осуществления функция или активность мутантного полипептида может быть ингибированной, устраненной, приведенной к нокауту или утраченной, так что активность полипептида не поддается выявлению. В одном варианте осуществления функция или активность двух мутантных полипептидов (например, полипептидов, кодируемых гомологами таких же генов) может быть ингибированной, устраненной, приведенной к нокауту или утраченной, так что активность полипептида не поддается выявлению.

В другом варианте осуществления функция или активность мутантного полипептида (например, одного гомолога гена) является утраченной, ингибированной или устраненной, так что активность полипептида не поддается выявлению, и функция или активность другого мутантного полипептида (например, второго гомолога гена) является уменьшенной или частично уменьшенной, так что активность полипептида НМА ниже по сравнению с контрольным полипептидом НМА, но все еще поддается выявлению. Иллюстративная комбинация мутаций данного типа представляет собой двойного гомозиготного мутанта G251D/Q561*, где мутация G251D частично уменьшает активность NtHMA4.1 (SEQ ID NO: 1), и мутация Q561* обеспечивает нокаут, ингибирует или устраняет активность NtHMA4.2 (SEQ ID NO: 2). Активность или SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 2 является частично уменьшенной, и активность или SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 2 является утраченной, ингибированной или устраненной при условии, что активность одного из полипептидов НМА4 является частично уменьшенной, и активность одного из НМА является утраченной. Активность или SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 2 может быть частично уменьшенной, и активность или SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 2 может быть утраченной, ингибированной или устраненной при условии, что активность одного из полипептидов НМА4 является частично уменьшенной, и активность одного из НМА является утраченной.

Соответствующим образом обеспечен полный нокаут по меньшей мере одного из НМА, и по меньшей мере один из НМА содержит нонсенс- или миссенс-мутацию, расположенные или в А-домене, в DKGTG-мотиве Р-домена, или в локусе HP N-домена.

В растении, клетке растения или растительном материале и им подобным активность NtHMA4.1 (SEQ ID NO: 1) и NtHMA4.2 (SEQ ID NO: 2) может быть утраченной, ингибированной или устраненной по сравнению с контрольным растением. Иллюстративная комбинация мутаций данного типа представляет собой двойной гомозиготный мутант Q293*/Q561*, где мутация Q293* обеспечивает нокаут, ингибирует или устраняет активность NtHMA4.1 (SEQ ID NO: 1) и мутация Q561* обеспечивает нокаут, ингибирует или устраняет активность NtHMA4.2 (SEQ ID NO: 2). Другие иллюстративные мутанты описаны в табл. 4 и 5. Предусмотрены комбинации или смеси вариантов (мутантов) полипептидов и полинуклеотидов НМА4.1 и НМА4.2, описанных в данном документе.

Для всех комбинаций такая же комбинация предусмотрена соответственно в другом гомологе. Например, предусмотрены комбинация НМА4.1 E2 96K/ НМА4.2 Q561* и комбинация НМА4.1 Q561*/ НМА4.2 E296K.

Соответствующим образом, варианты полипептида НМА4 приводят к тому, что растение, в котором они содержатся, характеризуется снижением количества Cd по меньшей мере на приблизительно 27, 33, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% или более по сравнению с контролем.

Другие НМА с по меньшей мере 60% идентичностью с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, которые содержат по меньшей мере одну мутацию аминокислоты в положении (положениях), которые после выравнивания последовательностей соответствуют положениям, раскрытым в данном документе, и которые также предусмотрены для применения в настоящем изобретении. Примеры данных последовательностей включают последовательности НМА представителей семейства Solanaceae, таких как томат, картофель и баклажан.

Фрагменты вариантов полипептидов также предусмотрены, при условии, что они переносят одну

или более мутаций аминокислоты. Фрагменты вариантов полипептидов могут варьировать от по меньшей мере приблизительно 25 аминокислот, приблизительно 50 аминокислот, приблизительно 75 аминокислот, приблизительно 100 аминокислот, приблизительно 150 аминокислот, приблизительно 200 аминокислот, приблизительно 250 аминокислот, приблизительно 300 аминокислот, приблизительно 400 аминокислот, приблизительно 500 аминокислот, приблизительно 600 аминокислот и до полноразмерного полипептида.

Варианты могут быть получены путем введения изменений любого типа (например, вставок, делеций или замены аминокислот, изменения структуры гликозилирования, изменения, которые влияют на повторное сворачивание или изомеризацию, трехмерную структуру или состояния самоассоциации), при условии, что мутантные полипептиды приводят к тому, что растение, в котором они экспрессируются, характеризуется по меньшей мере уменьшением накопления Cd, как описано в данном документе.

Варианты полипептидов включают в себя мутантов, полученных путем введения изменений любого типа (например, вставки, делеции или замены аминокислот, изменения структуры гликозилирования, изменения, которые влияют на повторное сворачивание или изомеризацию, трехмерную структуру или состояния самоассоциации), которые могут быть сконструированы преднамеренно или выделены естественным образом. Преднамеренные аминокислотные замены можно осуществлять, исходя из сходства полярности, заряда, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и амфипатической природы остатков при условии, что сохраняется вторичная активность связывания вещества. Например, отрицательно заряженные аминокислоты включают в себя аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту, положительно заряженные аминокислоты включают в себя лизин и аргинин, и аминокислоты с незаряженными полярными концевыми группами с подобными значениями гидрофильности включают в себя лейцин, изолейцин, валин, глицин, аланин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, фенилаланин и тирозин. Консервативные замены можно осуществлять, например, в соответствии с приведенной ниже таблицей. Аминокислоты в одном и том же блоке во второй колонке и, соответствующим образом, в одной и той же строке в третьей колонке можно заменять одна на другую.

АЛИФАТИЧЕСКИЕ	Неполярные	Gly Ala Pro Ile Leu Val
	Полярные - незаряженные	Cys Ser Thr Met Asn Gly
	Полярные - заряженные	Asp Glu Lys Arg
АРОМАТИЧЕСКИЕ		His Phe Trp Tyr

Один предпочтительный тип мутаций представляет собой миссенс-мутацию, которая является точечной мутацией, в которой изменение одного нуклеотида обуславливает кодон, который кодирует другую аминокислоту. Миссенс-мутации могут быть особенно эффективными для частично инактивирования (например, уменьшения) полипептида НМА4, такого как НМА4.1 или НМА4.2.

Другой предпочтительный тип мутации представляет собой нонсенс-мутацию, которая является точечной мутацией, в которой изменение одного нуклеотида обуславливает преждевременный стоп-кодон или нонсенс-кодон в транскрибируемой мРНК и усеченный, неполный и нефункциональный полипептид НМА4, такой как НМА4.1 или НМА4.2. Нонсенс-мутации могут быть особенно эффективными для ингибирования или устранения, или приведения к нокауту активности полипептида НМА4, такого как НМА4.1 или НМА4.2.

Как описано в данном документе, экспрессия или активность одного из НМА4.1 или НМА4.2 по меньшей мере частично уменьшены, и экспрессия или активность другого НМА4.1 или НМА4.2 являются утраченными, устраненными или уменьшенными по сравнению с контрольным растением в некоторых вариантах осуществления. В одном варианте осуществления экспрессия или активность одного из НМА4.1 или НМА4.2 являются частично уменьшенными за счет использования точечной миссенс-мутации, и экспрессия или активность другого НМА4.1 или НМА4.2 являются утраченными, устраненными или уменьшенными за счет использования точечной нонсенс-мутации.

Соответствующим образом мутации, описанные в данном документе, являются гетерозиготными или гомозиготными мутациями. Соответствующим образом мутации, описанные в данном документе, являются гомозиготными мутациями.

Мутация (мутации) может (могут) быть расположена (расположены), например, в регуляторном участке НМА4.1 или НМА4.2 или в кодирующей последовательности НМА4.1 или НМА4.2. В некоторых вариантах осуществления мутация (мутации) расположена (расположены) в кодирующей последовательности НМА4.1 или НМА4.2.

Полипептид НМА4 содержит различные домены, которые описаны в табл. 7.

Для комбинации мутантов, описанных в данном документе, такая же комбинация может быть включена в другой гомолог соответственно.

Экспрессия или активность по меньшей мере двух АТФаз тяжелого металла (НМА) являются частично уменьшенными, так что мутантное растение или его часть, содержащие НМА, проявляют по меньшей мере 27% уменьшение, по сравнению с контрольным растением, накопления кадмия в листе,

SEQ ID NO: 1, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 265 немутированной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой H438Y и W265*, при этом * указывает на стоп-кодон.

Соответствующим образом вариант содержит одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из: (i) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 293 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q293* и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; (ii) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 293 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 265 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q293* и W265*, при этом * указывает на стоп-кодон; (iii) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 296 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой E296K и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; (iv) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 402 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой T402I и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; (v) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 251 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой G251D и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; (vi) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 464 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q464* и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; (vii) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 293 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 223 немутированной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q293* и L223F, при этом * указывает на стоп-кодон; (viii) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 293 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 234 немутированной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q293* и D234N, при этом * указывает на стоп-кодон; (ix) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 293 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 235 немутированной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q293* и G235E, при этом * указывает на стоп-кодон; или (x) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 438 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 265 немутированной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой H438Y и W265*, при этом * указывает на стоп-кодон.

Предусматривается, что любая из нонсенс-мутации может сочетаться с любой из миссенс-мутаций, описанных в данном документе.

Обобщенное представление данных, полученных с применением растений, содержащих вышеупомянутые варианты, когда они растут снаружи, в поле, изложено в табл. 4, 5 и 6. Растения, содержащие двойной мутант Q293*/Q561*, или Q293*/W265*, или Q464*/Q561*, или Q293*/G235E, или E296K/Q561*, или T402I/Q561*, проявляют около 80-96% уменьшения уровня Cd. Растения, содержащие двойной мутант G251D/Q561*, проявляют около 33-70% уменьшения уровня Cd. Растения, содержащие двойной мутант Q293VL223F или Q293*/D234N, проявляют около 27-37% уменьшения уровня Cd. На раннем этапе и при определенных условиях наблюдается задержка в развитии растения для двойных мутантов Q293*/Q561*, или Q293*/W265*, или Q464*/Q561*, или Q293*.G235E, или E296K/Q561*, или T402I/Q561*. Однако во время сбора не наблюдается четких различий в фенотипе между каждым из мутантов и контролем. G251D/Q561* демонстрирует нормальный рост и развитие. Хотя Q293*/Q561*, или Q293*/W265*, или Q464*/Q561*, или E296K/Q561*, или Q293*/G235E могут демонстрировать некротические поражения на своих листьях на раннем этапе, в зависимости от условий окружающей среды, присутствие некротических поражений не наблюдается при большинстве условий во время сбора в поле. Другие тестируемые комбинации мутаций (G382R/Q561*, V351M/Q561*, A188V/Q561*, Q293*/A369V, Q293*/A374V, T189I/Q561*, Q293*/S27L, Q293*/A188V, G128E/Q561*) не приводят к значимому уменьшению уровня Cd или к большему уменьшению, чем 20%. Соответствующим образом в некоторых вариантах осуществления, двойной мутант не представляет собой G382R/Q561*, или V351M/Q561*, или A188V/Q561*, или Q293*/A369V, или Q293*/A374V, или T189I/Q561*, или Q293*/S27L, или Q293*/A188V, или G128E/Q561*.

Данные для некоторых из данных двойных мутантов, выращенных в теплице, показаны в табл. 8. Как можно видеть со сравнения таблицы 4 (полевое испытание) и табл. 8 (теплица), уровень уменьшения Cd для различных комбинаций мутаций обычно соответствуют друг другу.

Дополнительных двойных мутантов протестировали в теплице. Результаты полученных данных представлены в табл. 9. С учетом общего соглашения по уровням уменьшения Cd для двойных мутантов, представленных в табл. 4 и 8, для данных по полю и данных по теплице можно предсказать, что данные по теплице, представленные в табл. 9, в общем будут также соответствовать результатам, которые будут получены с поля. Комбинации мутаций H438Y/W265* тестировали при тепличных условиях, только когда это приводило к уменьшению уровня Cd около 58%; изменений в фенотипе не наблюдали (табл. 9).

В некоторых вариантах осуществления двойные мутанты Q293*/Q561*, или Q293*/W265*, или E296K/Q561*, или T402I/Q561*, или Q464*/Q561*, или Q293*/G235E являются предпочтительными, поскольку они проявляют приблизительно 80% или более уменьшения уровня Cd в поле. В одном варианте осуществления данной предпочтительной комбинации мутантное растение или его часть содержат одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из: (i) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 293 SEQ ID NO: 1, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 2, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q293* и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; (ii) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 293 SEQ ID NO: 1, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 265 SEQ ID NO: 2, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q293* и W265*, при этом * указывает на стоп-кодон; (iii) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 296 SEQ ID NO: 1, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 2, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой E296K и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; (iv) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 402 SEQ ID NO: 1, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 2, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой T402I и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; (v) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 464 SEQ ID NO: 1, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 2, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q464* и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; (vi) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 293 SEQ ID NO: 1, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 235 SEQ ID NO: 2, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q293* и G235E, при этом * указывает на стоп-кодон.

В одном варианте осуществления данной предпочтительной комбинации мутантное растение или его часть содержат одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из: (i) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 293 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q293* и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; (ii) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 293 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 265 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q293* и W265*, при этом * указывает на стоп-кодон; (iii) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 296 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой E296K и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; (iv) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 402 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой T402I и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; (v) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 464 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q464* и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; (vi) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 293 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 235 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q293* и G235E, при этом * указывает на стоп-кодон.

В некоторых вариантах осуществления, двойные мутанты G251D/Q561*, или H438Y*/W265*, или Q293*/L223F, или Q293*/D234N являются предпочтительными (например, для введения в растения - такие как табак, например, табак Берлей) поскольку они проявляют 27-70% уменьшения уровня Cd и с большей вероятностью не нарушают рост. В одном варианте осуществления данной предпочтительной комбинации мутантное растение или его часть содержат одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из: (i) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 251 SEQ ID NO: 1, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 2, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой G251D и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; (ii) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 438 SEQ ID NO: 1, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 265 SEQ ID NO: 2, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой H438Y

и W265*, при этом * указывает на стоп-кодон; (iii) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 293 SEQ ID NO: 1, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 223 SEQ ID NO: 2, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q293* и L223F, при этом * указывает на стоп-кодон; (iv) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 293 SEQ ID NO: 1, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 234 SEQ ID NO: 2, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q293* и D234N, при этом * указывает на стоп-кодон.

В одном варианте осуществления данной предпочтительной комбинации мутантное растение или его часть содержат одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из: (i) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 251 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой G251D и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; (ii) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 438 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 265 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой H438Y и W265*, при этом * указывает на стоп-кодон; (iii) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 293 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 223 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q293* и L223F, при этом * указывает на стоп-кодон; (iv) нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 293 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 234 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой Q293* и D234N, при этом * указывает на стоп-кодон.

В некоторых вариантах осуществления, двойной мутант T402I/ Q561* является предпочтительным, поскольку он проявляет около 90% уменьшения уровня Cd и приемлемые морфологические характеристики даже на ранней стадии роста. Таким образом, согласно данному варианту осуществления мутантное растение или его часть содержат миссенс-мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 402 SEQ ID NO: 1, и нонсенс-мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 2, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой T402I и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон.

Комбинации мутаций, описанные в данном документе, также предусмотрены. В частности, разные комбинации каждой из одиночных мутаций предусмотрены в двойных мутантах. Примеры таких комбинаций показаны в табл. 11 и 12, и они описаны ниже.

В одном варианте осуществления вариант содержит по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 464 третьей петли Р-домена полипептида НМА, кодируемого SEQ ID NO: 3, и по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 265 второй цитоплазматической петли А-домена полипептида НМА, кодируемого SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления вариант содержит по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 464 третьей петли Р-домена полипептида НМА, кодируемого SEQ ID NO: 4, и по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 265 второй цитоплазматической петли А-домена полипептида НМА, кодируемого SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления вариант содержит по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 464 третьей петли Р-домена полипептида НМА, кодируемого SEQ ID NO: 3, и по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 223 второй цитоплазматической петли А-домена полипептида НМА, кодируемого SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления вариант содержит по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 464 третьей петли Р-домена полипептида НМА, кодируемого SEQ ID NO: 4, и по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 223 второй цитоплазматической петли А-домена полипептида НМА, кодируемого SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления вариант содержит по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 464 третьей петли Р-домена полипептида НМА, кодируемого SEQ ID NO: 3, и по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 234 второй цитоплазматической петли А-домена полипептида НМА, кодируемого SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления вариант содержит по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 464 третьей петли Р-домена полипептида НМА, кодируемого SEQ ID NO: 4, и по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем аминокислотному положению 234 второй цитоплазматической петли А-домена полипептида НМА, кодируемого SEQ ID NO: 3.

при этом мутации представляют собой E296K и W265*, при этом * указывает на стоп-кодон; (vi) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 296 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 223 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой E296K и L223F; (vii) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 296 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 234 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой E296K и D234N, при этом * указывает на стоп-кодон; (viii) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 296 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 235 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой E296K и G235E; (ix) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 402 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 265 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой T402I и W265*, при этом * указывает на стоп-кодон; (x) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 402 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 223 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой T402I и L223F; (xi) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 402 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 234 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой T402I и D234N; (xii) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 402 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 235 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой T402I и G235E; (xiii) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 251 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 265 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой G251D и W265*, при этом * указывает на стоп-кодон; (xiv) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 251 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 223 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой G251D и L223F; (xv) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 251 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 234 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой G251D и D234N; (xvi) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 251 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 235 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой G251D и G235E; (xvii) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 438 SEQ ID NO: 2, и нонсенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 561 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой H438Y и Q561*, при этом * указывает на стоп-кодон; (xviii) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 438 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 223 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой H438Y и L223F, при этом * указывает на стоп-кодон; (xix) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 438 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 234 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой H438Y и D234N, при этом * указывает на стоп-кодон; или (xx) миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 438 SEQ ID NO: 2, и миссенс-мутации в положении, соответствующем аминокислотному положению 235 SEQ ID NO: 1, соответствующим образом, при этом мутации представляют собой H438Y и G235E, при этом * указывает на стоп-кодон.

Полинуклеотид, описанный в данном документе, обычно содержит фосфодиэфирные связи, хотя в некоторых случаях включены полинуклеотидные аналоги, которые могут иметь альтернативные остовы, содержащие, например, фосфоамидатные, фосфоротиоатные, фосфородитиоатные или O-метилфосфоамидитные связи; и пептидные полинуклеотидные остовы и связи. Другие аналоги полинуклеотидов включают в себя полинуклеотиды с положительно заряженными остовами, неионными остовами и безрибозными остовами. Модификации рибозофосфатного остова можно делать по целому ряду причин, например, для повышения стабильности и периода полужизни таких молекул в физиологических средах или в качестве зондов на биочипе. Можно получать смеси природных полинуклеотидов и аналогов; в качестве альтернативы можно получать смеси разных полинуклеотидных аналогов и смеси встречающихся в природе полинуклеотидов и аналогов.

Выделенные варианты (мутанты) полинуклеотидов HMA4, описанные в данном документе, содержат полипептидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 65% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, и по меньшей мере одну мутацию нуклеотида по сравнению с последовательностью дикого типа, изложенной под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 представляют собой немутированные последовательности. SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответствуют полинуклеотидной последовательности АТФазы тяжелого металла *Nicotiana*

tabacum (NtHMA4.1), номер доступа в GenBank: HF675181.1, и АТФазе тяжелого металла *Nicotiana tabacum* (NtHMA4.2), номер доступа в GenBank: HF937054.1 соответственно. Соответствующим образом выделенный полипептид содержит, состоит или состоит по существу из последовательности, характеризующейся по меньшей мере 65, 66, 67, 68, 69, 70, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или 100% идентичностью последовательности с ним, и по меньшей мере одну мутацию нуклеотида.

Соответствующим образом растение содержит по меньшей мере одну мутацию в каждой из SEQ ID NO: 3 и SEQ NO: 4 и/или фрагменте гена, которая нарушает трансляцию РНК-транскрипта, кодирующего НМА, изложенные в (ii), соответствующим образом, где мутация представляет собой миссенс-мутацию или нонсенс-мутацию.

Известно множество полинуклеотидных аналогов, включающих, например, фосфоамидатные, фосфороиоатные, фосфородитиоатные или О-метилфосфоамидитные связи и пептидные полинуклеотидные остовы и связи. Другие аналоги полинуклеотидов включают в себя полинуклеотиды с положительно заряженными остовами, нейонными остовами и безрибозными остовами. Полинуклеотиды, содержащие один или несколько карбоциклических сахаров, также включены.

Основные параметры, влияющие на выбор условий гибридизации для полинуклеотидов, и руководство для разработки подходящих условий описаны в Sambrook et al., 1989. Используя данные о генетическом коде в комбинации с аминокислотными последовательностями, описанными в данном документе, можно получить наборы вырожденных олигонуклеотидов. Такие олигонуклеотиды применимы в качестве праймеров, например, в полимеразных цепных реакциях (ПЦР), с помощью которых выделяют и амплифицируют фрагменты ДНК. В определенных вариантах осуществления вырожденные праймеры можно использовать в качестве зондов для генетических библиотек. Такие библиотеки будут включать в себя, без ограничения, библиотеки кДНК, геномные библиотеки и даже электронные библиотеки меток экспрессируемых последовательностей или ДНК библиотеки. Гомологичные последовательности, идентифицированные этим способом, будут затем использованы в качестве зондов для идентификации гомологов последовательностей, указанных в данном документе.

Кроме того, потенциальное применение имеют полинуклеотиды и олигонуклеотиды (например, праймеры или зонды), которые гибридизируются в условиях пониженной жесткости, как правило в условиях средней жесткости, и обычно в условиях высокой жесткости с полинуклеотидом (полинуклеотидами), описанным (описанными) в данном документе. Основные параметры, влияющие на выбор условий гибридизации, и руководство для разработки подходящих условий могут с легкостью определить средние специалисты в данной области техники на основании, например, длины или состава оснований полинуклеотида. Один из путей достижения условий средней жесткости включает в себя применение раствора для предварительной отмывки, содержащего 5x стандартный цитрат натрия, 0,5% додецилсульфата натрия, 1,0 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты (рН 8,0), гибридизационного буфера с приблизительно 50% формамида, 6x стандартного цитрата натрия и температуры гибридизации при приблизительно 55°C (или других подобных гибридизационных растворов, таких как содержащий приблизительно 50% формамида при температуре гибридизации около 42°C) и условий отмывки при приблизительно 60°C с применением 0,5x стандартного цитрата натрия, 0,1% додецилсульфата натрия. Как правило, условия высокой жесткости определяются как условия гибридизации, как описано выше, но с отмывкой при примерно 68 С, с применением 0,2x стандартного цитрата натрия, 0,1% додецилсульфата натрия. SSPE (1x SSPE представляет собой 0,15 М хлорида натрия, 10 mM фосфата натрия и 1,25 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты, рН 7,4) можно заменить стандартным цитратом натрия (1x стандартный цитрат натрия представляет собой 0,15 М хлорида натрия и 15 mM цитрата натрия) в гибридизационных и отмывочных буферах; при этом отмывку выполняют в течение 15 мин после завершения гибридизации. Следует понимать, что температуру отмывания и концентрацию солей для отмывания можно скорректировать по мере необходимости для достижения желаемой степени жесткости с применением основных принципов, которые регулируют реакции гибридизации и стабильность двойной спирали, как это известно специалистам в данной области и дополнительно описано ниже (см., например, Sambrook, et al., 1989). При гибридизации полинуклеотида с целевым полинуклеотидом с неизвестной последовательностью предполагается, что длина гибрида будет такой как у гибридизирующегося полинуклеотида. Когда гибридизируют полинуклеотиды с известными последовательностями, длина гибрида может быть определена путем выравнивания последовательностей полинуклеотидов и идентификации участка или участков с оптимальной комплементарностью последовательности. Температура гибридизации для гибридов, которые предположительно составят менее чем 50 пар оснований в длину, должна быть на 5-10 С меньше, чем температура плавления гибрида, где температуру плавления определяют в соответствии со следующими уравнениями. Для гибридов, длина которых составляет менее 18 пар оснований, температура плавления (°C)=2 (количество оснований A+T)+4 (количество оснований G+C). Для гибридов, длина которых составляет более 18 пар оснований, температура плавления (°C)=81,5+16,6 (log₁₀ [Na⁺])+0,41(% G+C)-(600/N), где N - количество оснований в гибриде и [Na⁺] - концентрация ионов натрия в гибридизационном буфере ([Na⁺] для 1x стандартного цитрата натрия = 0,165 М). Как правило, каждый такой гибридизирующийся полинуклеотид имеет длину, которая составляет по меньшей мере 25% (обычно, по

меньшей мере 50, 60 или 70%, и наиболее часто по меньшей мере 80%) от длины полинуклеотида, с которым он гибридизируется, и характеризуется по меньшей мере 60% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%) с полинуклеотидом, с которым он гибридизируется.

Выделенные полинуклеотиды также предусмотрены. "Выделенный" полинуклеотид не содержит последовательностей (оптимально, белок-кодирующих последовательностей), которые в естественных условиях фланкируют полинуклеотид (например, последовательностей, расположенных на 5'- и 3'-концах полинуклеотида) в геномной ДНК организма, из которого получен полинуклеотид. Например, в различных вариантах осуществления выделенный полинуклеотид может содержать менее приблизительно 5 т.о., 4 т.о., 3 т.о., 2 т.о., 1 т.о., 0,5 т.о. или 0,1 т.о. нуклеотидной последовательности, которая в естественных условиях фланкирует полинуклеотид в геномной ДНК клетки, из которой получен полинуклеотид.

Рекомбинантные конструкции могут быть использованы для трансформации растений или клеток растения. Рекомбинантная полинуклеотидная конструкция может содержать полинуклеотид, кодирующий один или более вариантов полипептидов, описанных в данном документе, функционально связанных с регуляторным участком, подходящим для экспрессии варианта полипептида. Таким образом, полинуклеотид может содержать кодирующую последовательность, которая кодирует вариант полипептида. Растение или клетка растения могут содержать геном, который был изменен путем стабильной интеграции рекомбинантной ДНК. Рекомбинантная ДНК включает ДНК, полученную с помощью методик генной инженерии и сконструированную вне клетки, и включает ДНК, содержащую встречающуюся в природе ДНК, или кДНК, или синтетическую ДНК. Растение может включать в себя растение, регенерированное из первоначально трансформированной клетки растения, и растения-потомки от более поздних поколений или скрещиваний трансформированного растения. Соответствующим образом, модификация изменяет экспрессию или активность полинуклеотида НМА или полипептида НМА, описанных в данном документе, по сравнению с контрольным растением. В некоторых вариантах осуществления использован не относящийся к ГМО подход для уменьшения накопления Cd за счет использования инактивации гена. Таким образом, например, использованы мутанты с наличием одного или более нуклеотидных полиморфизмов, полученных за счет использования одного или более экзогенно добавляемых химических веществ - таких как мутагенные, тератогенные или канцерогенные органические соединения, например, этилметансульфонат (EMS), которые вызывают случайные мутации в используемом генетическом материале. ДНК-библиотеку обработанных растений можно подвергнуть скринингу для мутаций в двух генах НМА4.

Также предложены векторы, содержащие рекомбинантные полинуклеотидные конструкции, такие как описанные в данном документе. Подходящие основы для векторов включают в себя, например, те, которые обычно используют в данной области, такие как плазмиды, вирусы, искусственные хромосомы, искусственные хромосомы бактерий, искусственные хромосомы дрожжей или искусственные хромосомы бактериофагов. Подходящие векторы экспрессии включают в себя, без ограничения, плазмиды и вирусные векторы, полученные из, например, бактериофага, бакуловирусов и ретровирусов. Многочисленные векторы и системы экспрессии являются коммерчески доступными. Векторы могут включать в себя, например, точки начала репликации, участки связывания с ядерным матриксом или маркеры. Маркерный ген может придавать клетке растения селективируемый фенотип. Например, маркер может придавать биоцидную устойчивость, такую как устойчивость к антибиотику (например, к канамицину, G418, блеомицину или гигромицину) или к гербициду (например, к глифосату, хлорсульфурону или фосфинотрицину). Кроме того, вектор экспрессии может включать в себя последовательность метки, предназначенную для облегчения манипуляций или выявления (например, очистки или локализации) экспрессированного полипептида. Последовательности меток, такие как последовательности люциферазы, бета-глюкуронидазы, зеленого флуоресцентного белка, глутатион S-трансферазы, полигистидина, с-тус или гемагглютинина, как правило, экспрессируются в виде слияния с кодируемым полипептидом. Такие метки могут быть вставлены в любом месте в пределах варианта полипептида НМА, в том числе на карбоксильном или амино-конце.

Растение или клетку растения можно трансформировать путем интегрирования рекомбинантного полинуклеотида в ее геном, чтобы они стали стабильно трансформированными. Растение или клетка растения, описанные в данном документе, могут быть стабильно трансформированными. Стабильно трансформированные клетки, как правило, сохраняют введенный полинуклеотид при каждом клеточном делении. Растение или клетка растения также могут быть временно трансформированными, так что рекомбинантный полинуклеотид не интегрируется в их геном. Временно трансформированные клетки, как правило, теряют весь введенный рекомбинантный полинуклеотид или некоторую его часть при каждом клеточном делении, так что введенный рекомбинантный полинуклеотид невозможно выявлять в дочерних клетках после достаточного числа клеточных делений. Также предусматривается применение редактирования генома.

В данной области техники существует целый ряд способов, доступных для трансформации клетки растения, каждый из которых охвачен данным документом, в том числе, биолистика, методики с применением генной пушки, Agrobacterium-опосредованная трансформация, опосредованная вирусным векто-

ром трансформация и электропорация. Система *Agrobacterium* для интеграции чужеродной ДНК в хромосомы растений была тщательно изучена, модифицирована и использована для генной инженерии растений. Молекулы депротеинизированной рекомбинантной ДНК, содержащие последовательности ДНК, соответствующие исследуемому очищенному белку, функционально связанные в смысловой или антисмысловой ориентации с регуляторными последовательностями, соединяют с соответствующими последовательностями Т-ДНК с помощью общепринятых способов. Данные молекулы вводят в протопласты при помощи методики на основе полиэтиленгликоля или методики электропорации, каждая из которых является стандартной. В качестве альтернативы такие векторы, содержащие молекулы рекомбинантной ДНК, кодирующие исследуемый очищенный белок, вводят в живые клетки *Agrobacterium*, которые затем переносят ДНК в клетки растения. Трансформацию с помощью депротеинизированной ДНК без сопутствующих векторных последовательностей Т-ДНК можно выполнять с помощью слияния протопластов с ДНК-содержащими липосомами или с помощью электропорации. Депротеинизированную ДНК без сопутствующих векторных последовательностей Т-ДНК также можно использовать для трансформации клеток с помощью инертных высокоскоростных микрочастиц.

Выбор регуляторных участков, которые следует включить в рекомбинантную конструкцию, зависит от нескольких факторов, в том числе, без ограничения, от эффективности, селективности, индуцируемости, необходимого уровня экспрессии и предпочтительной экспрессии в определенных клетках или тканях. Обычным делом для специалиста в данной области техники является модулирование экспрессии кодирующей последовательности варианта НМА путем соответствующего выбора и размещения регуляторных участков по отношению к кодирующей последовательности. Аналогичным образом можно модулировать транскрипцию полинуклеотида. Некоторые подходящие регуляторные участки инициируют транскрипцию исключительно или преимущественно в определенных типах клеток. Способы идентификации и определения свойств регуляторных участков в геномной ДНК растений хорошо известны из уровня техники. Примеры промоторов включают в себя тканеспецифичные промоторы, распознаваемые тканеспецифичными факторами, присутствующими в разных типах тканей или клеток (например, специфичные для корня промоторы, специфичные для побега промоторы, специфичные для ксилемы промоторы), или присутствующими на различных стадиях развития, или присутствующими в ответ на различные условия окружающей среды. Примеры промоторов включают в себя конститутивные промоторы, которые могут активироваться в большинстве типов клеток без необходимости в специфических индукторах. Примеры промоторов для контроля над образованием полипептида RNAi включают в себя промотор 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV/35S), SSU, OCS, Iib4, usp, STLS1, B33, nos или промоторы убиквитина или фазеолина. Специалисты в данной области могут создавать множество вариантов рекомбинантных промоторов. В дополнение к растительным промоторам можно получить другие подходящие промоторы бактериального происхождения (например, промотор гена октопинсинтазы, промотор гена нопалинсинтазы и другие промоторы, полученные из Ti-плазмид), или их можно получить из вирусных промоторов (например, РНК-промоторы 35S и 19S вируса мозаики цветной капусты (CaMV), конститутивные промоторы вируса табачной мозаики, промоторы 19S и 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV) или промотор 35S вируса мозаики норичника).

Следует понимать, что уменьшение или ингибирование экспрессии или активности НМА, описанных в настоящей заявке, можно достичь различными способами. Например, предусмотрено встраивание одной или нескольких мутаций в по меньшей мере один ген, кодирующий НМА, включая делеции, вставки, сайт-специфичные мутации, нуклеазы с "цинковыми пальцами" и т.п.

В одном аспекте предложено мутантное растение или его часть, характеризующиеся по меньшей мере частично уменьшенной экспрессией или активностью по меньшей мере двух АТФаз тяжелого металла (НМА), при этом две указанных НМА содержат, состоят из или состоят, по сути, из: (i) полипептидов, характеризующихся по меньшей мере 65% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2; (ii) полинуклеотидов, кодирующих полипептиды, изложенные в (i); или (iii) полинуклеотидов, которые характеризуются по меньшей мере 65% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, которые кодируют НМА; при этом мутантное растение или его часть проявляют по меньшей мере 27% уменьшение, по сравнению с контрольным растением, накопления кадмия в листе, когда мутантное растение выращено в поле в присутствии встречающегося в природе или не встречающегося в природе кадмия.

Экспрессию или активность НМА можно модулировать за счет использования одной или более мутаций, которые приводят к уменьшению экспрессии или функции указанного гена или белка, кодируемого им. Помимо одной или более мутаций, описанных в данном документе, мутантное растение или клетка растения могут иметь одну или более дополнительных мутаций в одном или нескольких других генах или полипептидах. В некоторых вариантах осуществления мутанты могут иметь одну или более дополнительных мутаций в одном или более других генах или полипептидах.

В другом аспекте предусмотрен способ уменьшения уровня кадмия в листе выращенного в поле растения, который предусматривает стадии: (a) уменьшения экспрессии или активности двух АТФаз тяжелого металла (НМА), при этом указанные две НМА предусматривают, состоят из или состоят, по сути, из: (i) полипептидов, характеризующихся по меньшей мере 65% идентичностью последовательности с

SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2; (ii) полинуклеотидов, кодирующих полипептиды, изложенные в (i); или (iii) полинуклеотидов, которые характеризуются по меньшей мере 65% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, кодирующими НМА; (b) выращивания растений в поле; (c) необязательно измерений содержания кадмия в растениях, полученных на стадии (b); и (d) идентификации растения, в котором содержание кадмия, имеющегося в нем, уменьшено по сравнению с контрольным растением, в котором экспрессия или активность НМА не были уменьшены, соответствующим образом, при этом растение или его часть проявляют по меньшей мере 27% уменьшение, по сравнению с контрольным растением, накопления кадмия в листе, когда растение выращено в поле в присутствии встречающегося в природе или не встречающегося в природе кадмия; соответствующим образом, при этом фенотип мутантного растения или его части во время сбора является таким же, как у контрольного растения в такое же время сбора, соответствующим образом, при этом мутантное растение или его часть не демонстрируют уменьшения биомассы (например, веса листа) во время сбора по сравнению с контрольным растением в такое же время сбора. В некоторых вариантах осуществления экспрессия или активность двух НМА являются уменьшенными с помощью применения подхода с обеспечением мутагена, описанного в данном документе, или за счет использования мутантов, описанных в данном документе.

"Время сбора" растения будет, тем самым, очевидным специалисту в данной области техники. Другими словами, специалист в данной области будет знать, когда растение готово для сбора. В качестве примера специалист в данной области техники знает, когда собирать растение табака, поскольку листья растения табака начинают созревать. Для определенных разновидностей табака это значит, что листья начинают становиться желтыми, что подразумевалось и является желаемым для надлежащего высушивания. Также известны разновидности табака, который высыхает с изменением цвета от зеленого до коричневого или от зеленого до желтого и до коричневого. Растения могут быть собраны целиком или частично после того, как часть растения готова к сбору. Например, для растений табака время сбора может быть определено для каждого положения стебля. Листья в нижней части стебля табака сперва начнут менять цвет (например, на желтый) и могут быть собраны, и верхние листья затем также пожелтеют для дальнейшего сбора. Также предусмотрен способ идентификации одного или более генетических изменений в растениях, выращенных в поле, которые коррелируют с уменьшением уровней кадмия в листе по сравнению с выращенным в поле контрольным растением, которое не содержит одного или более генетических изменений, при этом указанный способ предусматривает стадии: (a) идентификации растения с уменьшенными уровнями кадмия в листьях при выращивании в поле по сравнению с контрольным растением, которое выращено в поле, при этом необязательно фенотип растения или его части во время сбора является таким же, как у контрольного растения в такое же время сбора, соответствующим образом, при этом растение или его часть не демонстрируют уменьшения биомассы (например, веса листа) во время сбора по сравнению с контрольным растением в такое же время сбора; (b) обеспечения образца нуклеиновой кислоты из растения, идентифицированного на стадии (a); и (c) идентификации в образце нуклеиновой кислоты из стадии (b) одного или более генетических изменений в полинуклеотидных последовательностях, кодирующих НМА, которые характеризуются по меньшей мере 65% идентичностью последовательности с немутированными последовательностями, изложенными под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, или в полинуклеотидной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 65% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления одна или более благоприятных мутаций идентифицированы за счет использования скрининга популяции мутантных растений. В некоторых вариантах осуществления одна или более благоприятных мутаций, которые определены за счет применения скринингового подхода, могут быть введены в разные растения или клетку растения, и введенная мутация может быть идентифицирована или выбрана с применением способов, известных специалисту в данной области техники, таких как анализ методом Саузерн-блоттинга, секвенирование ДНК, ПЦР-анализ или фенотипический анализ. Мутации, которые влияют на экспрессию генов или которые нарушают функцию кодируемого белка НМА, можно определять с применением способов, хорошо известных из уровня техники.

Любое представляющее интерес растение, в том числе клетку растения или растительный материал, можно модифицировать различными способами, с помощью которых, как известно, индуцируется мутагенез, в том числе сайт-направленный мутагенез, олигонуклеотид-направленный мутагенез, индуцированный химическими соединениями мутагенез, индуцированный ионизирующим излучением мутагенез, мутагенез с применением модифицированных оснований, мутагенез с применением содержащих пропуски ДНК-дуплексов, мутагенез с двухнитевыми разрывами, мутагенез с применением штаммов хозяев с нарушенной репарацией, мутагенез посредством синтеза полного гена, ДНК-шаффлинг и другие эквивалентные способы.

Варианты мутантного полипептида можно применять для создания мутантных растений или клеток растений, содержащих один или более вариантов мутантного полипептида. Активность НМА мутантного варианта полипептида может быть выше, ниже или приблизительно такой же, как у немутированного полипептида. Соответствующим образом, активность НМА вариантов мутантного полипептида является частично инактивированной (например, уменьшенной) или утраченной (например, ингибированной или устраненной), как описано в данном документе.

Мутации в нуклеотидных последовательностях и полипептидах, описанных в данном документе, могут включать внесенные человеком мутации или синтетические мутации, или мутации, созданные при помощи генной инженерии. Мутации в нуклеотидных последовательностях и полипептидах, описанных в данном документе, могут быть мутациями, которые получены или которые можно получить с помощью способа, который включает в себя стадию манипуляции *in vitro* или *in vivo*. Мутации в нуклеотидных последовательностях и полипептидах, описанных в данном документе, могут быть мутациями, которые получены или которые можно получить с помощью способа, который включает в себя вмешательство человека. В качестве примера способ может включать в себя мутагенез с применением экзогенно добавляемых химических соединений, таких как мутагенные, тератогенные или канцерогенные органические соединения, например, этилметансульфонат (EMS), которые приводят к случайным мутациям в генетическом материале. В качестве дополнительного примера способ может включать в себя одну или более стадий генной инженерии - таких как одна или более стадий генной инженерии, которые описаны в данном документе, или их комбинации. В качестве дополнительного примера способ может включать в себя одну или более стадий скрещивания растений.

Активность одного или более полипептидов НМА в растении является сниженной или ингибированной согласно настоящему изобретению, если активность полипептида НМА является статистически меньшей, чем активность того же полипептида НМА или полипептидов в растении, которое не было модифицировано с целью ингибирования активности данного полипептида НМА, и которое культивировали и собирали с применением тех же протоколов. Активность полипептида НМА в растении считается устраненной, если данная активность не поддается выявлению с помощью аналитических способов, описанных в данном документе. Для того, чтобы анализировать активность транспорта Cd мутантного белка НМА, может быть использован анализ, основанный на дрожжах. В этом анализе полноразмерную последовательность можно клонировать в вектор экспрессии дрожжей и экспрессировать в Cd-чувствительном дрожжевом мутанте *usc1*. Клетки в лог фазе разбавляют до разных OD_{600} и помещают на среду, содержащую Cd. Выносливость штамма в отношении Cd отображает транспортную активность мутантного белка НМА. В качестве альтернативы активность может быть установлена при сочетании мутированной последовательности НМА со второй нонсенс-мутацией НМА, которая ликвидирует транспортную активность НМА. Ожидается, что нонсенс-мутация, которая отсекает большую часть белка, не будет демонстрировать никакой транспортной активности. Для миссенс-мутации ферментативная активность может быть либо частично уменьшена, или полностью утрачена. Если значения Cd в двойном мутанте, который сочетает в себе нонсенс и миссенс-мутации, являются аналогичными контрольным, можно сделать вывод, что миссенс-мутация не имеет значимого влияния на активность белка. Если значения Cd и/или фенотип находятся между двойной нонсенс-мутацией и контролем, можно предположить частичную активность миссенс-мутации. Если значения Cd и фенотип являются аналогичными двойному нонсенс-мутанту НМА, можно сделать вывод, что миссенс-мутация ликвидирует транспортную активность.

Способы, с помощью которых случайным образом вводят случайную мутацию в последовательность гена, могут включать химический мутагенез, мутагенез с помощью EMS и радиационный мутагенез. Способы, которые позволяют вводить одну или более целевых мутаций в клетку, включают без ограничения технологию редактирования генома, в частности, мутагенез, опосредованный нуклеазой с "цинковыми пальцами" (рассмотрено в Petolino, 2015), целенаправленное введение индуцированных локальных повреждений в геномах (TILLING) (рассмотрено в Chen et al., 2014), мутагенез, опосредованный мегануклеазой (см., например, Arnould et al., 2011), TALEN (рассмотрено в Wright et al., 2014) и систему CRISPR/Cas (рассмотрено в Bortesi and Fischer, 2015). Способы редактирования генома/гена в растениях рассмотрено, например, в Puchta and Fauser (2013), Qiwei and Caixia, (2015) и Chen and Gao (2014).

Комбинации различных способов, описанных выше, также предусмотрены. Другими словами, активность или экспрессия одной НМА может быть модулирована с применением одной конкретной методики, а таковая второй НМА может быть модулирована с применением другой методики.

Некоторые не ограничивающие примеры мутаций представляют собой делеции, вставки, нонсенс- и миссенс-мутации по меньшей мере одного нуклеотида, однонуклеотидные полиморфизмы и простую повторяющуюся последовательность. После внесения мутации можно провести скрининг для идентификации мутаций, которые создают ранние стоп-кодоны или иным образом нефункциональные гены. Скрининг мутантов можно выполнить путем секвенирования, или путем применения одного или более зондов или праймеров, специфичных для данного гена или белка. Можно также создать в полинуклеотидах конкретные мутации, которые приводят в результате к модулированию экспрессии гена, модулированию стабильности мРНК или модулированию стабильности белка. Такие растения обозначены в данном документе как "не встречающиеся в природе" или "мутантные" растения. Мутантные или не встречающиеся в природе растения могут включать в себя по меньшей мере часть чужеродной, или синтетической, или созданной человеком нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), которая не присутствовала в растении до проведения с ним манипуляций. Чужеродной нуклеиновой кислотой может быть один нуклеотид, два или более нуклеотидов, два или более смежных нуклеотидов или два или более несмежных нуклеотидов, например, по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 или 1500 более смежных или несмежных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления семена растений подвергают мутагенезу и затем выращивают из них мутантные растения первого поколения, которые затем подвергают скринингу на наличие мутаций в их локусах. Может допускаться самоопыление растений первого поколения, и из семян растений первого поколения выращивают растения второго поколения, которые затем подвергают скринингу на наличие мутаций в их локусах. Хотя подвергнутый мутагенезу растительный материал (включая семена) можно подвергать скринингу на наличие мутаций, преимуществом скрининга растений второго поколения является то, что все соматические мутации соответствуют мутациям зародышевой линии. Специалисту в данной области будет понятно, что различный растительный материал, в том числе без ограничения семяна, пыльцу, растительные ткани или клетки растения, можно подвергать мутагенезу для создания мутантных растений. Однако тип растительного материала, подвергнутого мутагенезу, может иметь значение, когда нуклеиновую кислоту растения подвергают скринингу на наличие мутаций. Например, если пыльцу подвергают мутагенезу до проведения опыления не подвергаемого мутагенезу растения, из семян, полученных в результате такого опыления, выращивают растения первого поколения. Каждая клетка растений первого поколения будет содержать мутации, созданные в пыльце; таким образом, эти растения первого поколения можно затем подвергать скринингу на наличие мутаций вместо того, чтобы дожидаться второго поколения.

Для создания мутаций можно применять мутагены, которые создают главным образом точечные мутации и короткие делеции, вставки, трансверсии и/или транзиции, включая химические мутагены и облучение. Мутагены включают без ограничения этилметансульфонат, метилметансульфонат, N-этил-N-нитрозомочевину, триэтилмеламин, N-метил-N-нитрозомочевину, прокарбазин, хлорамбуцил, циклофосфамид, диэтилсульфат, акриламидный мономер, мельфалан, азотистый иприт, винкристин, диметилнитрозамин, N-метил-N'-нитро-нитрозогуанидин, нитрозогуанидин, 2-аминопурин, 7,12-диметилбенз(а)антрацен, этиленоксид, гексаметилфосфорамида, бисульфат, диэпоксикалканы (диэпоксидоктан, диэпоксидбутан и т.п.), 2-метокси-6-хлор-9-[3-(этил-2-хлорэтил)аминопропиламино]акридина дигидрохлорид и формальдегид.

Также предусматриваются спонтанные мутации в локусе, которые могут не быть непосредственно вызванными мутагеном, при условии, что они приводят к требуемому фенотипу. Подходящие мутагенные средства могут также включать в себя, например, ионизирующее излучение, такое как рентгеновское излучение, гамма-излучение, излучение быстрых нейтронов и ультрафиолетовое излучение. Любой способ получения нуклеиновой кислоты растения, известный специалистам в данной области, можно использовать для получения нуклеиновой кислоты растения для скрининга в отношении мутаций.

Нуклеиновую кислоту, полученную из отдельных растений, клеток растения или растительного материала, можно необязательно объединить, чтобы ускорить скрининг в отношении мутаций в популяции растений, происходящих из подвергнутых мутагенезу растительных тканей, клеток или материала. Можно подвергать скринингу одно или более следующих поколений растений, клеток растения или растительного материала. Размер необязательно объединенной группы зависит от чувствительности используемого способа скрининга.

После необязательного объединения образцов нуклеиновых кислот, их можно подвергнуть методикам полинуклеотид-специфичной амплификации, таким как полимеразная цепная реакция. Любой один или более праймеров или зондов, специфичных в отношении гена или последовательностей, непосредственно примыкающих к гену, можно использовать для амплификации последовательностей в пределах необязательно объединенного образца нуклеиновых кислот. Примеры олигонуклеотидных праймеров описаны в данном документе.

Соответствующим образом, один или более праймеров или зондов конструируют для амплификации участков локуса, в которых с наибольшей вероятностью возникают полезные мутации. Наиболее соответствующим образом, праймер конструируют для выявления мутаций в участках полинуклеотида. Кроме того, для праймера (праймеров) и зонда (зондов) желательно избегать известных сайтов полиморфизмов для облегчения скрининга на точечные мутации. Для облегчения выявления продуктов амплификации один или несколько праймеров или зондов можно метить с применением любого общепринятого способа введения метки. Праймер (праймеры) или зонд (зонды) можно сконструировать на основе последовательностей, описанных в данном документе, с применением способов, которые хорошо известны из уровня техники.

Для облегчения обнаружения продуктов амплификации праймер (праймеры) или зонд (зонды) можно пометить с применением любого общепринятого способа внесения метки. Их можно сконструировать на основе последовательностей, описанных в данном документе, с применением способов, которые хорошо известны в данной области. Полиморфизмы можно идентифицировать с помощью средств, известных из уровня техники, и некоторых из описанных в литературе.

В дополнительном аспекте предложен способ получения мутантного растения. Способ включает обеспечение по меньшей мере одной клетки растения, содержащей ген, кодирующий функциональный полипептид НМА, описанный в данном документе (или любую их комбинацию, описанную в данном документе). Далее эту по меньшей мере одну клетку растения обрабатывают в условиях, эффективных для модулирования активности полипептида (полипептидов) НМА, описанного (описанных) в данном

документе. По меньшей мере одну мутантную клетку растения затем размножают в мутантное растение, где мутантное растение имеет модулированный уровень полипептида (полипептидов) НМА по сравнению с уровнем у контрольного растения. В одном варианте осуществления данного способа получения мутантного растения стадия обработки включает воздействие по меньшей мере на одну клетку химическим мутагенным средством, описываемым выше, и в условиях, эффективных для получения по меньшей мере одной мутантной клетки растения. В другом варианте осуществления данного способа стадия обработки включает воздействие по меньшей мере на одну клетку источником ионизирующего излучения в условиях, эффективных для получения по меньшей мере одной мутантной клетки растения. Термин "мутантное растение" включает мутантные растения, в которых генотип модифицирован по сравнению с контрольным растением.

В некоторых вариантах осуществления мутантное растение, клетка мутантного растения или мутантный растительный материал могут содержать одну или более мутаций, которые встречаются в природе в другом растении, клетке растения или растительном материале и обеспечивают необходимый признак. Данную мутацию можно ввести (например, путем интрогрессии) в другое растение, клетку растения или растительный материал (например, растение, клетку растения или растительный материал с генетическим фоном, отличающимся от такового растения, из которого происходит мутация) для создания мутации, которая не встречается в природе в данном растении, и для обеспечения у указанного растения данного признака. Таким образом, в качестве примера, мутацию, которая встречается в природе в первом растении, можно ввести во второе растение, такое как второе растение с генетическим фоном, отличающимся от такового первого растения. Специалист в данной области, таким образом, может осуществлять поиск и идентифицировать растение, несущее в естественных условиях в своем геноме один или несколько мутантных аллелей генов, описанных в данном документе, которые обеспечивают необходимый признак. Мутантный (мутантные) аллель (аллели), который (которые) встречается (встречаются) в природе, можно перенести во второе растение различными способами, включая селекцию, возвратное скрещивание и интрогрессию, с получением линий, разновидностей или гибридов, которые имеют одну или несколько мутаций в генах, описанных в данном документе. Растения, демонстрирующие необходимый признак, можно отобрать из пула мутантных растений. Соответствующим образом, отбор осуществляют с использованием данных о нуклеотидных последовательностях, описанных в данном документе. Следовательно, можно осуществлять скрининг в отношении генетического признака по сравнению с контролем. Такой скрининговый подход может включать применение общепринятых методик амплификации и/или гибридизации нуклеиновых кислот, как обсуждается в данном документе.

В другом аспекте предложен способ получения мутантного растения, которое характеризуется сниженными уровнями Cd по сравнению с контрольным растением, предусматривающий стадии: (а) обеспечения образца из первого растения; (b) определения того, содержит ли указанный образец одновременные мутации в каждом из полипептидов НМА4, описанных в данном документе, которые приводят к уменьшению уровней Cd в растениях, выращенных в поле; и (с) переноса обеих мутаций во второе растение. Мутацию (мутации) можно перенести во второе растение с помощью различных способов, которые известны из уровня техники, например с помощью генной инженерии, манипуляции с генами, интрогрессии, селекции растений, возвратного скрещивания и т.п. В одном варианте осуществления второе растение имеет генетический фон, отличный от такового первого растения.

В другом аспекте предложен способ получения мутантного растения, которое характеризуется сниженными уровнями Cd по сравнению с контрольным растением, предусматривающий стадии: (а) обеспечения образца из первого растения; (b) определения того, содержит ли указанный образец двойные мутации в полипептидах НМА4, описанных в данном документе, которые приводят к уменьшению уровней Cd в растениях, выращенных в поле; и (с) интрогрессии обеих мутаций из первого растения во второе растение. В одном варианте осуществления стадия интрогрессии включает в себя селекцию растений, необязательно включающую возвратное скрещивание и т. п. В одном варианте осуществления второе растение имеет генетический фон, отличный от такового первого растения. В одном варианте осуществления первое растение не представляет собой сорт или элитный сорт. В одном варианте осуществления второе растение представляет собой сорт или элитный сорт.

Дополнительный аспект относится к мутантному растению (включая мутантное растение сорта или элитного сорта), которое получено или которое можно получить с помощью способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления "мутантное растение" может содержать одну или более мутаций, локализованных только в конкретном участке растения - таком как последовательности одного или более полинуклеотидов, описанных в данном документе. Согласно данному варианту осуществления остальная часть геномной последовательности мутантного растения будет такой же или практически такой же, как у растения перед осуществлением мутагенеза.

Настоящее изобретение является, вероятно, воспроизводимым в других растениях и применимым для селекции с линиями вариантов.

Растения, представляющие интерес, включают без ограничения однодольные и двудольные растения и системы клеток растений, в том числе виды из одного из следующих семейств: Acanthaceae, Alliaceae, Alstroemeriaceae, Amaryllidaceae, Apocynaceae, Arecaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Bixaceae, Bras-

sicaceae, Bromeliaceae, Cannabaceae, Caryophyllaceae, Cephalotaxaceae, Chenopodiaceae, Colchicaceae, Cucurbitaceae, Dioscoreaceae, Ephedraceae, Erythroxylaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Linaceae, Lycopodiaceae, Malvaceae, Melanthiaceae, Musaceae, Myrtaceae, Nyssaceae, Papaveraceae, Pinaceae, Plantaginaceae, Poaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Salicaceae, Sapindaceae, Solanaceae, Taxaceae, Theaceae или Vitaceae.

Подходящие виды могут включать представителей рода *Abelmoschus*, *Abies*, *Acer*, *Agrostis*, *Allium*, *Alstroemeria*, *Ananas*, *Andrographis*, *Andropogon*, *Artemisia*, *Arundo*, *Atropa*, *Berberis*, *Beta*, *Bixa*, *Brassica*, *Calendula*, *Camellia*, *Camptotheca*, *Cannabis*, *Capsicum*, *Carthamus*, *Catharanthus*, *Cephalotaxus*, *Chrysanthemum*, *Cinchona*, *Citrullus*, *Coffea*, *Colchicum*, *Coleus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Cynodon*, *Datura*, *Dianthus*, *Digitalis*, *Dioscorea*, *Elaeis*, *Ephedra*, *Erianthus*, *Erythroxylum*, *Eucalyptus*, *Festuca*, *Fragaria*, *Galanthus*, *Glycine*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Hevea*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Jatropha*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Lycopodium*, *Manihot*, *Medicago*, *Mentha*, *Miscanthus*, *Musa*, *Nicotiana*, *Oryza*, *Panicum*, *Papaver*, *Parthenium*, *Pennisetum*, *Petunia*, *Phalaris*, *Phleum*, *Pinus*, *Poa*, *Poinsettia*, *Populus*, *Rauwolfia*, *Ricinus*, *Rosa*, *Saccharum*, *Salix*, *Sanguinaria*, *Scopolia*, *Secale*, *Solanum*, *Sorghum*, *Spartina*, *Spinacea*, *Tanacetum*, *Taxus*, *Theobroma*, *Triticosecale*, *Triticum*, *Uniola*, *Veratrum*, *Vinca*, *Vitis* и *Zea*.

Подходящие виды могут включать *Panicum* spp., *Sorghum* spp., *Miscanthus* spp., *Saccharum* spp., *Erianthus* spp., *Populus* spp., *Andropogon gerardii* (бородач Жерара), *Pennisetum purpureum* (слоновая трава), *Phalaris arundinacea* (двуклосточник тростниковидный), *Cynodon dactylon* (свиной палец), *Festuca arundinacea* (овсяница тростниковая), *Spartina pectinata* (спартина гребешковая), *Medicago sativa* (люцерна), *Arundo donax* (арундо тростниковый), *Secale cereale* (рожь), *Salix* spp. (ива), *Eucalyptus* spp. (эвкалипт), *Triticosecale* (тритикале, пшеница, скрещенная с рожью), бамбук, *Helianthus annuus* (подсолнечник), *Carthamus tinctorius* (сафлор красильный), *Jatropha curcas* (ятрофа), *Ricinus communis* (клещевина), *Elaeis guineensis* (масличная пальма), *Linum usitatissimum* (лен), *Brassica juncea*, *Beta vulgaris* (сахарная свекла), *Manihot esculenta* (маниок), *Lycopersicon esculentum* (томат), *Lactuca sativa* (латук), *Musyclise alca* (банан), *Solanum tuberosum* (картофель), *Brassica oleracea* (брокколи, цветная капуста, брюссельская капуста), *Camellia sinensis* (чай), *Fragaria ananassa* (земляника), *Theobroma cacao* (какао), *Coffea cliseca* (кофе), *Vitis vinifera* (виноград), *Ananas comosus* (ананас), *Capsicum annuum* (острый и сладкий перец), *Allium sepa* (лук), *Cucumis melo* (дыня), *Cucumis sativus* (огурец), *Cucurbita maxima* (тыква гигантская), *Cucurbita moschata* (тыква мускатная), *Spinacea oleracea* (шпинат), *Citrullus lanatus* (арбуз), *Abelmoschus esculentus* (бамия), *Solanum melongena* (баклажан), *Rosa* spp. (роза), *Dianthus caryophyllus* (гвоздика), *Petunia* spp. (петуния), *Poinsettia pulcherrima* (пуансеттия), *Lupinus albus* (люпин), *Uniola paniculata* (овес), полевица (*Agrostis* spp.), *Populus tremuloides* (тополь осинообразный), *Pinus* spp. (сосна), *Abies* spp. (пихта), *Acer* spp. (клен), *Hordeum vulgare* (ячмень), *Poa pratensis* (мятлик), *Lolium* spp. (плевел) и *Phleum pratense* (timoфеевка), *Panicum virgatum* (просо), *Sorghu uclise* (сорго, суданская трава), *Miscanthus giganteus* (мискантус), *Saccharum* sp. (сахарный тростник), *Populus balsamifera* (тополь), *Zea mays* (кукуруза), *Glycine max* (соя), *Brassica napus* (канола), *Triticum aestivum* (пшеница), *Gossypium hirsutum* (хлопок), *Oryza sativa* (рис), *Helianthus annuus* (подсолнечник), *Medicago sativa* (люцерна), *Beta vulgaris* (сахарная свекла) или *Pennisetum glaucum* (просо жемчужное).

Различные варианты осуществления направлены на мутантные растения или клетки растения, модифицированные для модулирования уровней экспрессии гена, в результате чего получают растение или клетку растения - таких как растение табака или клетку растения табака - в которых уровень экспрессии полипептида НМА модулирован в тканях, представляющих интерес, по сравнению с контролем. Раскрытые композиции и способы можно применять для любого вида из рода *Nicotiana*, в том числе *N. glauca* и *N. tabacum* (например, LA B21, LN KY171, TI 1406, Basma, Galpao, Perique, Beinhart 1000-1 и Petic). Другие виды включают *N. acaulis*, *N. acuminata*, *N. africana*, *N. alata*, *N. ameghinoi*, *N. amplexicaulis*, *N. arentsii*, *N. attenuata*, *N. azambujae*, *N. benavidesii*, *N. benthamiana*, *N. bigelovii*, *N. bonariensis*, *N. cavicola*, *N. Clevelandii*, *N. cordifolia*, *N. corymbosa*, *N. debneyi*, *N. excelsior*, *N. forgetlana*, *N. fragrans*, *N. glauca*, *N. glutinosa*, *N. goodspeedii*, *N. gossei*, *N. hybrid*, *N. ingulba*, *N. kawakamii*, *N. knightiana*, *N. langsdorffii*, *N. linearis*, *N. longiflora*, *N. maritima*, *N. megalosiphon*, *N. miersii*, *N. noctiflora*, *N. nudicaulis*, *N. obtusifolia*, *N. occidentalis*, *N. occidentalis* subsp. *hesperis*, *N. otophora*, *N. paniculata*, *N. pauciflora*, *N. petunioides*, *N. plumbaginifolia*, *N. quadrivalvis*, *N. raimondii*, *N. repanda*, *N. rosulata*, *N. rosulata* subsp. *ingulba*, *N. rotundifolia*, *N. setchellii*, *N. simulans*, *N. solanifolia*, *N. spegazzinii*, *N. stocktonii*, *N. suaveolens*, *N. sylvestris*, *N. thyriflora*, *N. tomentosa*, *N. tomentosiformis*, *N. trigonophylla*, *N. umbratica*, *N. undulata*, *N. velutina*, *N. wigandioides* и *N. x sanderae*.

Применение сортов табака и элитных сортов табака также предусмотрено в данном документе. Мутантное растение, таким образом, может являться разновидностью табака или элитным сортом табака, который содержит один или более трансгенов или одну или более генетических мутаций или их комбинацию.

Генетическая (генетические) мутация (мутации) (например, один или несколько полиморфизмов) может (могут) представлять собой мутации, которые не существуют в природе в отдельной разновидности табака или сорте табака (например, элитном сорте табака), или может (могут) представлять собой генетическую (генетические) мутацию (мутации), которая (которые) существует в природе при условии, что мутация не существует в природе в отдельной разновидности табака или сорте табака (например, в

элитном сорте табака).

Особенно применимые разновидности *Nicotiana tabacum* включают табак типа Берлей, табак темного типа, табак трубоогневой сушки и табак восточного типа. Неограничивающими примерами разновидностей или сортов являются: BD 64, CC 101, CC 200, CC 27, CC 301, CC 400, CC 500, CC 600, CC 700, CC 800, CC 900, Coker 176, Coker 319, Coker 371 Gold, Coker 48, CD 263, DF911, DT 538 LC табак Galpao, GL 26H, GL 350, GL 600, GL 737, GL 939, GL 973, HB 04P, HB 04P LC, HB3307PLC, гибрид 403LC, гибрид 404LC, гибрид 501 LC, K 149, K 326, K 346, K 358, K394, K 399, K 730, KDH 959, KT 200, KT204LC, KY10, KY14, KY 160, KY 17, KY 171, KY 907, KY907LC, KY14xL8 LC, Little Crittenden, McNair 373, McNair 944, msKY 14xL8, Narrow Leaf Madole, Narrow Leaf Madole LC, NBH 98, N-126, N-777LC, N-7371LC, NC 100, NC 102, NC 2000, NC 291, NC 297, NC 299, NC 3, NC 4, NC 5, NC 6, NC7, NC 606, NC 71, NC 72, NC 810, NC BH 129, NC 2002, Neal Smith Madole, OXFORD 207, PD 7302 LC, PD 7309 LC, PD 7312 LC, табак "Перик", PVH03, PVH09, PVH19, PVH50, PVH51, R 610, R 630, R 7-11, R 7-12, RG 17, RG 81, RG H51, RGH 4, RGH 51, RS 1410, Speight 168, Speight 172, Speight 179, Speight 210, Speight 220, Speight 225, Speight 227, Speight 234, Speight G-28, Speight G-70, Speight H-6, Speight H20, Speight NF3, TI 1406, TI 1269, TN 86, TN86LC, TN 90, TN 97, TN97LC, TN D94, TN D950, TR (Tom Rosson) Madole, VA 309, VA359, AA 37-1, B13P, Xanthi (Mitchell-Mor), Bel-W3, 79-615, Samsun Holmes NN, KTRDC номер 2 гибрид 49, Берлей 21, KY8959, KY9, MD 609, PG01, PG04, PO1, PO2, PO3, RG11, RG 8, VA509, AS44, Бенкет A1, Basma Drama B84/31, Basma I Zichna ZP4/B, Basma Xanthi BX 2A, Batek, Besuki Jember, C104, Coker 347, Criollo Misionero, Delcrest, Djebel 81, DVH 405, Galpao Comum, HB04P, Hicks Broadleaf, Kabakulak Ellassona, Kutsage E1, LA BU 21, NC 2326, NC 297, PVH 2110, Red Russian, Samsun, Saplak, Simmaba, Talgar 28, Wislica, Yayaldag, Prilep HC-72, Prilep P23, Prilep PB 156/1, Prilep P12-2/1, Yaka JK-48, Yaka JB 125/3, TI-1068, KDH-960, TI-1070, TW136, Basma, TKF 4028, L8, TKF 2002, GR141, Basma xanthi, GR149, GR153, Petit Havana. Также предусмотрены подразновидности вышеуказанного с низким уровнем превращения, даже если они специально не указаны в данном документе. В одном варианте осуществления используют тип Берлей *Nicotiana tabacum*.

Варианты осуществления также направлены на композиции и способы получения мутантных растений, которые были модифицированы для модулирования экспрессии или активности НМА полинуклеотида (полинуклеотидов), описанного (описанных) в данном документе (или любой их комбинации, как описано в данном документе). Преимущественно полученные мутантные растения по общему внешнему виду могут быть подобными или практически такими же, как контрольные растения. Различные фенотипические свойства, такие как степень зрелости, количество листьев на растении, высота стебля, угол отхождения листьев, размер листьев (ширина и длина), длина междоузлия и соотношение листовая пластина-главная жилка, можно оценивать путем полевых наблюдений.

Один аспект относится к семенам мутантного растения. Соответствующим образом, семя представляет собой семя табака. Дополнительный аспект относится к пыльце или семяпочке мутантного растения, которое описано в данном документе. Кроме того, предложено мутантное растение, описанное в данном документе, которое дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, придающую мужскую стерильность.

Также предложена тканевая культура регенерируемых клеток мутантного растения или его части, как описано в данном документе, при этом из культуры регенерируют растения, способные экспрессировать все морфологические и физиологические свойства родителя. Регенерируемые клетки включают без ограничения клетки из листьев, пыльцы, зародышей, семядолей, гипокотилей, корней, кончиков корней, пыльников, цветков и их части, семяпочек, побегов, стеблей, черешков, сердцевин и семенных коробочек или каллюса или протопластов, полученных из них.

Еще один дополнительный аспект относится к подсушенному или высушенному растительному материалу, такому как подсушенный или высушенный лист или подсушенный или высушенный табак, который получен или можно получить из мутантного растения или клетки, при этом экспрессия одного или более полинуклеотидов НМА, описанных в данном документе, или активность белка, кодируемого ими, является сниженной, что приводит к снижению уровней Cd в указанном растении.

Варианты осуществления также направлены на композиции и способы получения мутантных растений или клеток растения, которые были модифицированы для модулирования экспрессии или активности одного или нескольких полинуклеотидов НМА или полипептидов НМА, описанных в данном документе, что может приводить к получению растений, или компонентов растения (например, листьев, таких как подсушенные или высушенные листья), или клеток растений со сниженными уровнями Cd, как описано в данном документе.

Соответствующим образом внешний вид растений, описанных в данном документе, является практически таким же, как у контрольного растения. Соответствующим образом биомасса и размер листа являются практически неизменными по сравнению с контрольным растением. В одном варианте осуществления масса листьев у мутантного растения является практически такой же, как у контрольного растения. В одном варианте осуществления количество листьев у мутантного растения является практически таким же, как у контрольного растения. В одном варианте осуществления масса листьев и количество листьев у мутантного растения являются практически такими же, как у контрольного растения. В од-

ном варианте осуществления высота стебля у мутантных растений является практически такой же, как у контрольных растений через, например, один, два или три или более месяцев после пересадки в поле или через 10, 20, 30 или 36 или более дней после обрезания верхушек. Например, высота стебля у мутантных растений не меньше, чем высота стебля у контрольных растений. В другом варианте осуществления содержание хлорофилла у мутантных растений является практически таким же, как у контрольных растений. В другом варианте осуществления высота стебля у мутантных растений является практически такой же, как у контрольных растений, и содержание хлорофилла у мутантных растений является практически таким же, как у контрольных растений. В других вариантах осуществления размер, или форма, или количество, или окраска листьев у мутантных растений являются практически такими же, как у контрольных растений.

Снижение уровня экспрессии по сравнению с контролем может составлять от приблизительно 5% до приблизительно 100%, или снижение может составлять по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или 100%, которое включает в себя снижение транскрипционной активности или уровня экспрессии полинуклеотида или уровня экспрессии полипептида или их комбинации.

Снижение активности по сравнению с контролем может составлять от приблизительно 5% до приблизительно 100%, или снижение может составлять по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98 или 100%.

Полинуклеотиды и рекомбинантные конструкции, описанные в данном документе, можно использовать для модулирования экспрессии NtHMA4, описанного в данном документе, в представляющем интерес виде растений, соответствующим образом, в табаке. Полинуклеотиды и рекомбинантные конструкции, описанные в данном документе, можно применять для экспрессии мутантных полипептидов NtHMA4, описанных в данном документе, в представляющем интерес виде растений, соответствующим образом в табаке.

В некоторых вариантах осуществления фенотип листа и показатель роста мутантного растения или его части такие же как у контрольного растения. Пример двойной мутации, который обеспечивает данные свойства, представляет собой G251D/Q561*.

В некоторых вариантах осуществления, фенотип листа мутантного растения или его части является таким же, как у контрольного растения, и мутантное растение или его часть проявляют задержку роста на ранней стадии по сравнению с контрольным растением. Задержка роста на ранней стадии не считается проблемой, поскольку во время сбора не наблюдают различия в биомассе по сравнению с контрольными растениями. Примером двойной мутации, которая обеспечивает данные свойства, является T402I/Q561*.

В некоторых вариантах осуществления, фенотип листа мутантного растения или его части является таким же, как у контрольного растения, за исключением присутствия некротических поражений на ранней стадии, и мутантное растение или его часть проявляет задержку роста по сравнению с контрольным растением на ранней стадии. Присутствие некротических поражений не является проблемой, поскольку в большей части условий во время сбора в поле некротических поражений не наблюдают. Примером двойной мутации, которая обеспечивает данные свойства, являются Q293*/Q561*, или Q293*/W265*, или E296K/Q561*, или Q464*/Q561*, или Q293*/G235E. Соответствующим образом количество выращенных мутантных растений или их части, как описано в данном документе, не является уменьшенным по сравнению с контрольным растением.

Соответствующим образом мутантные растения или их часть, как описано в данном документе, не проявляют карликовый фенотип по сравнению с контрольным растением. Соответствующим образом, мутантные растения или их часть, как описано в данном документе, не проявляют карликовый фенотип во время сбора по сравнению с контрольным растением во время сбора.

Соответствующим образом мутантные растения или их часть, как описано в данном документе, не демонстрируют уменьшения биомассы (вес листа) по сравнению с контролем. Соответствующим образом мутантные растения или их часть, как описано в данном документе, не демонстрируют уменьшения биомассы (вес листа) во время сбора по сравнению с контролем.

В некоторых вариантах осуществления мутантные растения могут быть обеспечены цинком во время роста.

Различные варианты осуществления направлены на способы снижения уровня экспрессии одного или более полинуклеотидов, описанных в данном документе, путем интеграции множества копий полинуклеотида в геном растения, причем указанные способы включают: трансформацию клетки растения-хозяина вектором экспрессии, который содержит промотор, функционально связанный с одним или более полинуклеотидами, описанными в данном документе. Полипептид, кодируемый рекомбинантным полинуклеотидом, может быть нативным полипептидом или может быть гетерологичным по отношению к клетке.

Растение, несущее мутантный аллель одного или более полинуклеотидов, описанных в данном документе (или любой комбинации полинуклеотидов, как описано в данном документе), можно применять в программе селекции растений для создания применимых линий, разновидностей и гибридов. В частности, мутантный аллель интрогрессируют в коммерчески важные разновидности, описанные выше. Таким образом, предложены способы селекции растений, которые предусматривают скрещивание мутантного растения, как описано в данном документе, с растением, характеризующимся иными генетическими особенностями. Способ может дополнительно предусматривать скрещивание растения-потомка с другим растением и необязательно повторное скрещивание до тех пор, пока не будет получен потомок с необходимыми генетическими признаками или генетическим фоном. Одной целью, для которой служат такие способы селекции, является введение необходимого генетического признака в другие разновидности, селекционные линии, гибриды или сорта, особенно те, которые представляют коммерческий интерес. Другой целью является облегчение пакетирования генетических модификаций различных генов в отдельной разновидности, линиях, гибридах или сортах растений. Предусмотрены внутривидовые, а также межвидовые скрещивания. Растения-потомки, которые возникают в результате таких скрещиваний, также называемые селекционными линиями, являются примерами не встречающихся в природе растений согласно настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления предложен способ получения не встречающегося в природе растения или мутантного растения, предусматривающий: (а) скрещивание мутантного растения со вторым растением с получением семени-потомка табака; (b) выращивание семени-потомка в условиях роста растений с получением не встречающегося в природе растения. Способ может дополнительно предусматривать: (с) скрещивание предыдущего поколения не встречающегося в природе растения с самим собою или с другим растением с получением семени-потомка; (d) выращивание семени-потомка из стадии (с) в условиях роста растений с получением дополнительных не встречающихся в природе растений; и (е) повторение стадий скрещивания и выращивания (с) и (d) много раз с получением следующих поколений не встречающихся в природе растений. Способ может необязательно включать перед стадией (а) стадию обеспечения родительского растения, которое характеризуется отличительными генетическими особенностями и которое не идентично мутантному растению. В некоторых вариантах осуществления в зависимости от программы селекции стадии скрещивания и выращивания повторяют от 0 до 2 раз, от 0 до 3 раз, от 0 до 4 раз, 0 до 5 раз, от 0 до 6 раз, от 0 до 7 раз, от 0 до 8 раз, от 0 до 9 раз или от 0 до 10 раз для получения поколений не встречающихся в природе растений. Возвратное скрещивание является примером такого способа, при этом потомка скрещивают с одним из его родителей или с другим растением, генетически подобным его родителю, чтобы получить растение-потомка в следующем поколении, которое характеризуется генетическими особенностями, более близкими к одному из родителей. Методики селекции растений, в частности, селекции растений, хорошо известны и могут быть использованы в способах согласно настоящему изобретению. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены не встречающиеся в природе растения, полученные с помощью данных способов. Определенные варианты осуществления исключают стадию селекции растения.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, линии, полученные в результате селекции и скрининга вариантных генов, оценивают в поле с использованием стандартных полевых процедур. В эксперимент включают контрольные генотипы, в том числе исходного не подвергнутого мутагенезу родителя, и места посадки растений располагают в поле согласно рандомизированному полноблочному плану или согласно другому соответствующему планированию поля. Для табака используют стандартные агротехнические приемы, например, табак собирают, взвешивают и отбирают образцы для химического и другого общепринятого тестирования до и во время подсушивания или высушивания. Статистические анализы данных выполняют для подтверждения сходства выбранных линий с родительской линией. Цитогенетические анализы выбранных растений необязательно выполняют для подтверждения взаимосвязей набора хромосом и конъюгации хромосом.

ДНК-фингерпринтинг, однонуклеотидный полиморфизм, микросателлитные маркеры или подобные технологии можно использовать в программе селекции с отбором с помощью маркера (MAS) для переноса или разведения мутантных аллелей гена в других растениях, как описано в данном документе. Например, селекционер может создать сегрегирующие популяции за счет гибридизации генотипа, содержащего мутантный аллель, с генотипом, необходимым с точки зрения агрономии. Растения в поколении F₂ или поколении возвратного скрещивания можно подвергнуть скринингу с использованием маркера, полученного из геномной последовательности или ее фрагмента, с использованием одной из методик, перечисленных в данном документе. Растения, идентифицированные как обладающие мутантным аллелем, можно подвергнуть возвратному скрещиванию или самоопылению для получения второй популяции, подлежащей скринингу. В зависимости от предполагаемого характера наследования или используемой технологии MAS может быть необходимым самоопыление отобранных растений перед каждым циклом возвратного скрещивания для облегчения обнаружения необходимых отдельных растений. Возвратное скрещивание или другую процедуру селекции можно повторять до тех пор, пока не восстановится необходимый фенотип рекуррентного родителя.

В программе селекции успешные скрещивания дают растения F₁, которые являются фертильными.

Отобранные растения F1 можно скрещивать с одним из родителей, и растения первого поколения возвратного скрещивания самоопыляются с получением популяции, которую снова подвергают скринингу в отношении экспрессии вариантного гена (например, нулевой версии гена). Процесс возвратного скрещивания, самоопыления и скрининга повторяют, например, по меньшей мере 4 раза до тех пор, пока при последнем скрининге не получат растение, которое является фертильным и в достаточной степени схожим с рекуррентным родителем. Это растение, при необходимости, самоопыляют и затем потомство снова подвергают скринингу, чтобы подтвердить, что растение демонстрирует экспрессию вариантного гена. В некоторых вариантах осуществления популяцию растений в поколении F2 подвергают скринингу в отношении экспрессии вариантного гена, например, растение, которое не экспрессирует полипептид из-за отсутствия гена, идентифицируют согласно стандартным способам, например, с помощью методики ПЦР с использованием праймеров, созданных на основе информации о нуклеотидной последовательности полинуклеотида (полинуклеотидов), описанного (описанных) в данном документе (или любой их комбинации, как описано в данном документе).

Гибридные разновидности можно получить путем предотвращения самоопыления женских родительских растений (то есть родительских форм) первой разновидности, позволяя пыльце с мужских родительских растений второй разновидности оплодотворить женские родительские растения и обеспечивая образование гибридных семян F1 на женских растениях. Самоопыление женских растений можно предотвратить путем кастрации цветков на ранней стадии развития цветка. В качестве альтернативы образование пыльцы на женских родительских растениях можно предотвратить с применением какой-либо формы мужской стерильности. Например, мужскую стерильность можно получить с помощью цитоплазматической мужской стерильности (CMS) или трансгенной мужской стерильности, где трансген подавляет микроспорогенез и/или образование пыльцы, или вызывает самонесовместимость. Женские родительские растения, характеризующиеся CMS, являются особенно применимыми. В вариантах осуществления, в которых женские родительские растения характеризуются CMS, пыльцу собирают с мужских фертильных растений и наносят вручную на рыльца женских родительских растений с CMS, и собирают полученные семена F1.

Разновидности и линии, описанные в данном документе, можно использовать для образования простых гибридов F1. В таких вариантах осуществления растения родительских разновидностей можно выращивать в виде практически однородно соединенных популяций для облегчения естественного перекрестного опыления мужскими родительскими растениями женских родительских растений. Семя F1, образованное на женских родительских растениях, селективно собирают с помощью обычных средств. Можно также выращивать две разновидности родительского растения в общей массе и собирать смесь гибридных семян F1, образовавшихся на женском родителе, и семян, образовавшихся на мужском родителе в результате самоопыления. В качестве альтернативы можно осуществить трехлинейное скрещивание, где простой гибрид F1 используют в качестве женского родителя и скрещивают с другим мужским родителем. В качестве другой альтернативы, можно создать гибриды двойного скрещивания, где потомство F1 двух разных простых гибридов скрещивают само с собой.

Популяцию мутантных растений можно подвергнуть скринингу или отбору в отношении тех представителей популяции, которые имеют необходимый признак или фенотип. Например, популяцию из потомков линии с одной трансформацией можно подвергнуть скринингу в отношении тех растений, которые имеют необходимый уровень экспрессии или активности полипептида (полипептидов), кодируемого (кодируемых) с ее помощью. Для идентификации уровней экспрессии или активности можно применять физические и биохимические способы. Они включают анализ по Саузерну или ПЦР-амплификацию для обнаружения полинуклеотида; нозерн-блоттинг, анализ с защитой от РНКазы S1, анализ методом удлинения праймера или ПЦР-амплификацию в режиме реального времени для обнаружения РНК-транскриптов; ферментные анализы для обнаружения ферментативной или рибозимной активности полипептидов и полинуклеотидов; и гель-электрофорез белков, вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию и иммуноферментные анализы для обнаружения полипептидов. Другие методики, такие как гибридизация *in situ*, ферментативное окрашивание и иммуноокрашивание, и ферментативный анализ также можно использовать для обнаружения присутствия, или экспрессии, или активности полипептидов или полинуклеотидов.

В данном документе описаны мутантные растения, содержащие один или более рекомбинантных полинуклеотидов, одну или более полинуклеотидных конструкций, одну или более двухнитевых РНК, один или более конъюгатов или один или более векторов/векторов экспрессии.

Без ограничения мутантные растения, описанные в данном документе, можно модифицировать для других целей либо до того, либо после того, как экспрессия или активность были модулированы согласно настоящему изобретению. Соответствующим образом, мутантные растения остаются такими же растениями, не относящимися к ГМО несмотря на данные дополнительные модификации. Одна или более следующих генетических модификаций могут присутствовать в мутантных растениях. В одном варианте осуществления один или несколько генов, которые вовлечены в превращение промежуточных продуктов азотного обмена, модифицируют с получением растений (например, листьев), у которых в подсушенном состоянии присутствуют более низкие уровни по меньшей мере одного специфичного для табака нитро-

замина, чем у контрольных растений. Неограничивающие примеры генов, которые можно модифицировать, включают, как описано в данном документе, гены, кодирующие аспарагинсинтетазу, такие как CYP82E4, CYP82E5 и CYP82E10, которые принимают участие в превращении никотина в норникотин и описаны в публикациях WO 2006091194, WO 2008070274, WO 2009064771 и PCT/US 2011/021088, и как описано в данном документе. В другом варианте осуществления один или более генов, которые вовлечены в поглощение тяжелых металлов или транспорт тяжелых металлов, модифицируют с получением растений или частей растений (таких как листья), характеризующихся более низким содержанием тяжелых металлов, чем у контрольных растений или их частей без модификации (модификаций). Неограничивающие примеры включают гены семейства белков, ассоциированных с множественной лекарственной устойчивостью, семейства посредников диффузии катионов (CDF), семейства Zrt-, Irt-подобных белков (ZIP), семейства катионообменников (CAH), семейства транспортеров меди (COPT), семейства АТФаз тяжелых металлов Р-типа (например, HMA, как описано в WO 2009074325), семейства гомологов белков макрофагов, ассоциированных с естественной устойчивостью (NRAMP), и семейства транспортеров с АТФ-связывающей кассетой (ABC) (например, MRP, описанных в WO 2012/028309, которые участвуют в транспорте тяжелых металлов, таких как Cd). Термин тяжелый металл, используемый в данном документе, включает в себя переходные металлы. Примеры других модификаций включают выносливость в отношении гербицидов, например, глифосат является действующим веществом многих гербицидов широкого спектра действия. Устойчивые к глифосату трансгенные растения были разработаны путем переноса гена *aroA* (глифосат EPSP-синтетаза из *Salmonella typhimurium* и *E.coli*). Устойчивые к сульфонилмочевине растения были получены путем трансформации мутантного гена ALS (ацетолактатсинтетаза) из *Arabidopsis*. Белок OB фотосистемы II из мутантного *Amaranthus hybridus* был перенесен в растения с получением атразин-устойчивых трансгенных растений; а бромоксинил-устойчивые трансгенные растения были получены путем встраивания гена *bxn* от бактерии *Klebsiella pneumoniae*. Другие примеры модификаций приводят к получению растений, которые устойчивы к насекомым. Токсин *Bacillus thuringiensis* (Bt) может обеспечить эффективный путь задержки появления Bt-устойчивых вредителей, как недавно показано на брокколи, где пирамидальные гены *cry1Ac* и *cry1C* Bt обеспечивали контроль капустной моли, устойчивой к любому одному белку, и существенно задерживали развитие устойчивых насекомых. Другая иллюстративная модификация приводит к получению растений, которые устойчивы к заболеваниям, вызываемым патогенами (например, вирусами, бактериями, грибами). Были разработаны растения, экспрессирующие ген *Ха21* (устойчивость к бактериальному некрозу), с растениями, экспрессирующими одновременно ген слияния Bt и ген хитиназы (устойчивость к желтой огневке-травянке и выносливость в отношении ризоктониоза). Другая иллюстративная модификация приводит к измененной репродуктивной способности, такой как мужская стерильность. Другая иллюстративная модификация приводит к получению растений, которые выносливы в отношении абиотического стресса (например, засухи, изменения температуры, засоленности), и выносливые трансгенные растения были получены путем переноса фермента глицеролфосфат-ацилтрансферазы из *Arabidopsis*; генов, кодирующих маннитдегидрогеназу и сорбитдегидрогеназу, которые вовлечены в синтез маннита и сорбита, улучшающих устойчивость к засухе. Другие иллюстративные модификации могут приводить в результате к получению растений с улучшенным накоплением белков и масел, растений с повышенной эффективностью фотосинтеза, растений с длительным сроком хранения, растений с повышенным содержанием углеводов и растений, устойчивых к грибам; растений, кодирующих фермент, участвующий в биосинтезе алкалоидов. Также предусмотрены трансгенные растения, в которых экспрессия S-аденозил-L-метионина (SAM) и/или цистатионин-гамма-синтазы (CGS) была модулирована.

Один или более таких признаков можно интрогрессировать в мутантные растения, принадлежащие к другому сорту, или можно непосредственно трансформировать в него. Интрогрессия признака или признаков в мутантные растения может быть достигнута любым способом селекции растений, известным из уровня техники, например, селекцией на основе родословной, возвратным скрещиванием, селекцией двойных гаплоидов и т.п. (см. публикации Wernsman, E.A, and Rufty, R.C. 1987. Chapter Seventeen. Tobacco. Pages 669-698 в: Cultivar Development. Crop Species W.H. Fehr (ed.), MacMillan Publishing Co, Inc., New York, N.Y 761 pp.). Методики на основе молекулярной биологии, описанные выше, в частности, RFLP (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) и микросателлитные маркеры, можно использовать при таких возвратных скрещиваниях для идентификации потомства с самой высокой степенью генетической идентичности с рекуррентным родителем. Данный подход позволяет ускорить получение разновидностей, которые характеризуются генетической идентичностью по меньшей мере 90%, соответствующим образом, по меньшей мере 95%, более соответствующим образом, по меньшей мере 99% с рекуррентным родителем, еще более соответствующим образом, генетически идентичных с рекуррентным родителем, и которые дополнительно содержат признак или признаки, интрогрессированные от донорского родителя. Такое определение генетической идентичности может основываться на молекулярных маркерах, известных из уровня техники.

Последнее поколение, полученное путем возвратного скрещивания, можно подвергать самоопылению с получением потомков чистой линии в отношении переносимой (переносимых) нуклеиновой (нуклеиновых) кислоты (кислот). Полученные растения обычно характеризуются по существу всеми морфо-

логическими и физиологическими свойствами мутантных растений в дополнение к перенесенному (перенесенным) признаку (признакам) (например, одному или нескольким признакам, определяемым одним геном). Точный протокол возвратного скрещивания будет зависеть от изменяемого признака для определения соответствующего протокола испытаний. Хотя способы возвратного скрещивания упрощаются, если переносимый признак представляет собой доминантный аллель, рецессивный аллель также можно переносить. В данном случае может быть необходимо применять исследование потомства для определения успешности переноса необходимого признака.

Различные варианты осуществления обеспечивают уменьшение содержания Cd в мутантных растениях, а также в биомассе, в которой уровень экспрессии полинуклеотидов NtHMA4 является уменьшенным.

Части таких растений, в частности растений табака, и более конкретно листовую пластинку и среднюю жилку растений табака, можно включать в различные потребительские продукты или использовать в их изготовлении, включая без ограничения материалы, образующие аэрозоль, устройства, образующие аэрозоль, курительные изделия, изделия для курения, бездымные продукты и табачные продукты. Примеры материалов, образующих аэрозоль, включают без ограничения табачные композиции, виды табака, табачный экстракт, резаный табак, резаный наполнитель, подсушенный или высушенный табак, взорванный табак, гомогенизированный табак, восстановленный табак и трубочный табак. Курительные изделия и изделия для курения представляют собой, как правило, устройства, образующие аэрозоль. Примеры курительных изделий и изделий для курения включают без ограничения сигареты, сигариллы и сигары. Примеры бездымных продуктов включают жевательный табак и нюхательный табак. В определенных устройствах, образующих аэрозоль, вместо сгорания (или сжигания) табачную композицию или другой материал, образующий аэрозоль, нагревают, например, с помощью одного или более электрических нагревательных элементов с получением аэрозоля. Как правило, в таких нагреваемых курительных изделиях аэрозоль генерируется в результате передачи тепла от источника тепла на физически отделенный субстрат или материал, образующий аэрозоль, который может быть расположен внутри, вокруг или ниже по потоку относительно источника тепла. Во время курения летучие соединения высвобождаются из субстрата, образующего аэрозоль, путем передачи тепла от источника тепла и захватываются воздухом, втягиваемым через курительное изделие. Когда происходит охлаждение высвобождаемых соединений, они конденсируются с образованием аэрозоля, вдыхаемого пользователем. Такие устройства содержат, например, образующие аэрозоль устройства с электрическим нагревом, в которых аэрозоль образуется в результате передачи тепла от одного или более электронагревательных элементов образующего аэрозоль устройства на образующий аэрозоль субстрат нагреваемого курительного изделия.

В другом типе нагреваемого устройства, образующего аэрозоль, аэрозоль получают путем передачи тепла от горючего топливного элемента или источника тепла к физически отделенному материалу, образующему аэрозоль, который может быть расположен внутри, вокруг или ниже по потоку относительно источника тепла. Бездымные табачные продукты и различные табакосодержащие материалы, образующие аэрозоль, могут содержать табак в любом виде, в том числе в виде высушенных частиц, обрезков, гранул, порошков или суспензий, нанесенных на другие ингредиенты, смешанных с другими ингредиентами, окруженных другими ингредиентами или иным образом объединенных с другими ингредиентами в любом формате, таком как хлопья, пленки, таблетки, пены или шарики. Используемый в данном документе термин "дым" используют для описания типа аэрозоля, который получен с помощью курительных изделий, таких как сигареты, или при сжигании материала, образующего аэрозоль.

В одном варианте осуществления также предложен подсушенный растительный материал из мутантных растений табака, описанных в данном документе. Способы обработки зеленых листьев табака известны средним специалистам в данной области техники и включают без ограничения воздушную обработку, огневую обработку, паровую обработку и обработку на солнце. Способ обработки зеленых листьев табака зависит от типа собранного табака. Например, Берлей и определенные темные разновидности обычно обрабатывают воздушной обработкой, а трубочный табак, жевательный табак и нюхательный табак обычно обрабатывают огневой обработкой.

Бездымные табачные продукты, включающие растения табака, как описано в данном документе, можно изготавливать в любом формате, предпочтительном для комфорта в ротовой полости потребителя. Бездымные табачные продукты содержат табак в любой форме, включая высушенные частицы, обрезки, гранулы, порошки или пульпу, нанесенный на другие ингредиенты, смешанные с ними, окруженные ими или иным образом объединенные с ними в любом формате, таком как хлопья, пленки, таблетки, пеноматериалы или шарики. Бездымные табачные продукты могут быть окружены материалом, который может съедобным или несъедобным. Жидкое содержание бездымных табачных продуктов может быть заключено в форму, такую как шарики, для предотвращения взаимодействия с водорастворимой оберткой. Обертка может иметь форму кисета для частичного или полного закрытия табакосодержащих композиций или для выполнения функции клея для удержания вместе нескольких таблеток, шариков или хлопьев табака. Обертка также может включать формируемую табачную композицию, которая соответствует форме рта потребителя. Обертка, которая разрушается в ротовой полости, может включать бездымный табак, например, высушенный нюхательный табак или растворимый табак, и может быть получена на оборудовании продолжительного горячего формования или горизонтального формования.

ния/заполнения/упаковывания или другом предпочтительно упаковочном оборудовании с применением съедобных пленок (которые могут включать или не включать табак). Иллюстративные материалы для создания обертки включают пленочные композиции, содержащие НРМС, СМС, пектин, альгинаты, пуллулан и другие коммерчески реализуемые пищевые пленкообразующие полимеры. Обертки, которые не разрушаются в ротовой полости, могут состоять из тканого или нетканого материала, мелованной или немелованной бумаги или перфорированных или других пористых пластмассовых пленок. Обертки могут содержать в своем составе ароматизирующие и/или красящие средства. Бездымные продукты могут быть скомпонованы вместе с помощью обертки с применением любого способа, известного специалистам в области серийной упаковки, включая такие способы, как упаковка в блистеры или в стики, при которой небольшая упаковка может быть получена с помощью машины вертикального формования/заполнения/упаковывания.

В другом варианте осуществления также предложен высушенный растительный материал из мутантных растений, описанных в данном документе. Способы сушки листьев известны средним специалистам в данной области техники и включают, без ограничения, воздушную сушку и сушку на солнце. Точный способ сушки листьев зависит от типа собранного растения. Соответствующим образом растительный материал высушивают после сбора. Таким образом, в данном документе предусмотрено применение высушенного материала и послеуборочного высушенного материала. Процесс сушки может активировать один или более генов, связанных со старением. Экспрессию активности генов и белков, описанных в данном документе, можно контролировать в ходе подсушивания или сушки.

В другом варианте осуществления описаны табачные продукты, в том числе табакосодержащие материалы, образующие аэрозоль, содержащие растительный материал, такой как листья, предпочтительно подсушенные или высушенные листья, из мутантных растений табака, описанных в данном документе. Табачные продукты, описанные в данном документе, могут представлять собой смешанный табачный продукт, который может дополнительно содержать немодифицированный табак.

Количество Cd в растениях, выращенных в поле, части растения, растительном материале, растительном продукте или табачном продукте, описанных в данном документе, может быть уменьшено по меньшей мере на 33, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% или более, по сравнению с аналогом дикого типа. Так как НМА4 принимает участие в транслокации Cd от корня к побегу, уменьшение или устранение активности или экспрессии НМА4 может привести к уменьшению накопления Cd в листьях и увеличить накопление Cd в корнях.

В некоторых вариантах осуществления, может быть желательным вырастить растения, описанные в данном документе, в присутствии удобрений. В одном варианте осуществления удобрение может содержать или состоять из Zn, который добавляют в поле либо до, либо во время роста растений. Данное введение добавки может помочь пополнить или восстановить содержание Zn в растении и при этом иметь уменьшенные уровни Cd. Данное введение добавки может помочь восстановить фенотип растения и при этом иметь уменьшенные уровни Cd. Добавление Zn может увеличить высоту стебля и/или вес листа.

Семена растений, описанных в данном документе, можно кондиционировать и упаковать в упаковочный материал с помощью средств, известных из уровня техники, с получением промышленного изделия. Упаковочный материал, такой как бумага или ткань, хорошо известен из уровня техники. Упаковка с семенами может иметь этикетку, например, бирку или этикетку, прикрепленную к упаковочному материалу, этикетку, напечатанную на упаковке, которая описывает происхождение содержащихся в ней семян.

Композиции, способы и наборы для генотипирования растений для идентификации, отбора или селекции могут включать в себя средства для обнаружения присутствия полинуклеотида (или любой их комбинации, как описано в данном документе) в образце полинуклеотида. Соответственно, описана композиция, содержащая один или более праймеров для специфической амплификации по меньшей мере части одного или более полинуклеотидов и, необязательно, один или более зондов и, необязательно, один или более реагентов для проведения амплификации или обнаружения.

В одном варианте осуществления также предложен подсушенный или высушенный растительный материал из мутантных растений, описанных в данном документе. Например, способы подсушивания или сушки листьев табака известны специалистам в данной области техники и включают без ограничения воздушную обработку, огневую обработку, паровую обработку и обработку на солнце. Способ подсушивания зеленых листьев табака зависит от типа собранного табака, как описано в данном документе.

В другом варианте осуществления описаны табачные продукты, в том числе табачные продукты, содержащие растительный материал такой как листья, предпочтительно, подсушенный растительный материал - такой как подсушенные или высушенные листья - из мутантных растений, описанных в данном документе, или которые получены согласно способам, описанным в данном документе. Табачные продукты, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать немодифицированный табак.

В другом варианте осуществления описаны табачные продукты, содержащие растительный материал, соответствующим образом, листья, такие как подсушенные или высушенные листья из мутантных растений, описанных в данном документе. Например, растительный материал можно добавить внутрь или снаружи табачного продукта, вследствие чего при сгорании высвобождается необходимый аромат. Табачный продукт в соответствии с этим вариантом осуществления может даже представлять собой не-

модифицированный табак или модифицированный табак. Табачный продукт в соответствии с данным вариантом осуществления может быть получен из мутантного растения, которое имеет мутации в одном или более генах, отличающихся от генов, раскрытых в данном документе.

Настоящее изобретение дополнительно описано в примерах ниже, которые представлены для более подробного описания настоящего изобретения. Эти примеры, в которых изложен предпочтительный режим, предполагаемый в настоящее время для осуществления настоящего изобретения, предназначены для иллюстрации, а не для ограничения настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1. Материалы и способы.

Последовательности НМА4.

NtHMA4.1 (последовательность белка: SEQ ID NO: 1, Genbank: CCQ77798.1; нуклеотидная последовательность: SEQ ID NO: 3, Genbank: HF675181.1) и NtHMA4.2 (последовательность белка: SEQ ID NO: 2, Genbank: CCW03243.1; нуклеотидная последовательность: SEQ ID NO: 4, Genbank: HF937054.1).

Растительный материал.

TN90 (PI 543792, TC 586, USDA -база данных GRIN), K326 (PI 552505, TC 319, USDA-база данных GRIN). AA37 предположительно представляет собой гибрид южноамериканского темного табака и идиоплазмы американского Берлея.

Получение растений с RNAi НМА4.

Для создания конструкции для RNAi *HMA4* последовательность

экзона 7 *HMA4.1* (5'-
 TGAGAGCAAGTCAGGTCATCCGATGGCAGCCGCTCTGGTGGACTATGCACAATCAAATTCGGTT
 GAGCCAAAGCCTGATAGAGTTGAGCAGTTTCAAATTTCTCTGGTGAAGGGATATTTGGAAGAA
 TTGATGGAATGGAATCTATGTCGGGAATAGGAAAATTTCTCAAGAGCTGGATGTACCACAG-
 3') используют в смысловом и антисмысловом направлении и часть
 смежного интрона (5'-
 TAAATGGTTGAATCATTTCTTATGCTCATAGTAGAGATAAAACATCAGA
 GTTATAATATAAGTATATGATTTCTCCAGTTAATTTTGCTGTAGATTTTCTTTGACCTGTTT
 AGCACTAATGCGGTGGATGTTTGAAT-3')

используют в качестве петли шпильки. Конструкция разработана с помощью сайтов Gateway и синтезирована Geneart (Invitrogen, Life technologies, Регенсбург, Германия). Затем ее переносят на вектор экспрессии с применением технологии Gateway и соответствующих ферментов (Invitrogen, Life technologies, Карлсбад, Калифорния, США). *Agrobacterium tumefaciens* трансформируют с помощью вектора экспрессии и используют для трансформации листовых дисков табака с применением описанных ранее способов (Horsch et al., 1985). Первичные трансформанты T0 выращивают в почве и анализируют их корни в отношении экспрессии НМА4. Определяют линии с наилучшими показателями (характеризуются наиболее низкой экспрессией НМА4) и поколение T1 и растения дикого типа выращивают на агаровой среде, и общую совокупность корней снова анализируют в отношении экспрессии НМА4.

Полученные с помощью EMS мутантные линии и TILLING Мутантную популяцию создают с помощью обрабатывания семян табака AA37 мутагенным средством этилметансульфонатом (EMS). Библиотеку ДНК приблизительно 9800 EMS-обработанных растений поколения M2 (представляют собой сегрегирующее потомство 1050 вариантов поколения M1) подвергают скринингу на наличие мутаций в двух НМА4 генах. Пять ампликонов секвенируют и анализируют на наличие мутаций в НМА4.1 и в НМА4.2 соответственно.

Следующую пару праймеров используют для амплификации НМА4.1 – экзон 1.

прямой праймер 5'-GCATGTTCTTATAAGAGAAACTC-3', обратный праймер 5'-GTGAATTTATTTAACAAGCCACA-3'; НМА4.1 - экзон2: прямой праймер 5'-ССААААТТГТТТТСТГСТТСТСС-3', обратный праймер 5'-CGTCATATAAАТТGGGACAAAAG-3'; НМА4.1 - экзон4/5: прямой праймер 5'-GTGTCTTTATTTTCTCACTGATA-3', обратный праймер 5'-TAGTGACGTGATTTCATAAGACAA-3'; НМА4.1 - экзон6: прямой праймер 5'-ATCAGTCCSTTTCACTTGACCC-3', обратный праймер 5'-AACCATTAGAGCCATTTCAGAA-3'; НМА4.1 - экзон7/8: прямой праймер 5'-GATACTGCAATACAAAAGCACAT-3', обратный праймер 5'-CACTTACTTGGTAATACGTTCT-3'; НМА4.2 - экзон 1: прямой праймер 5'-TTGCTACTCTGGGTTGCTAC-3', обратный праймер 5'-TCAAGTTTAAAGTTTCTTCTAC-3'; НМА4.2 - экзон 2: прямой праймер 5'-TGTGCATACATAACGTAAATCG-3', обратный праймер 5'-ATCAAATACCACATAAGTAGGG-3'; НМА4.2 - экзон 4/5: прямой праймер 5'-TTTAGTCACTTTGACATAAATGG-3', обратный праймер 5'-AAGACAGAGAACAAGTTCACAT-3'; НМА4.2 - экзон 6: прямой праймер 5'-TCAGTCCSTTTGCTTGACCT-3', обратный праймер 5'-GAGAATGTGGTACTCGCAAG-3'; НМА4.2 - экзон 7/8: прямой праймер 5'-ATACATTGAGGACACATAATCG-3', обратный праймер 5'-TATACCCCATCTGACCSTTG-3'.

Продукты амплификации секвенируют согласно способу Sanger на ABI XL3730 (Applied Biosystems, Life Technologies, Фостер-Сити, Калифорния, США). Праймеры амплификации аналогично используют для секвенирования, за исключением НМА4.2 - экзон 6, где вложенный обратный праймер 5'-TTATGAATATATGCTACAAATCASC-3' используют для секвенирования. Для того, чтобы получить мутантную линию с влиянием на функцию белка, выбирают как стоп-мутации, так и миссенс-мутации. Тепличные условия для выращивания растений

Для удобрения используют следующие растворы, при этом все растворы приобретены у Yara Benvex В.В. (Влардинген, Нидерланды): "Трубоогневая сушка": макроэлементы: 666,5 мг NO₃-1-1, 18 мг NH₄⁺ 1-1 (всего 165,39 мг N 1-1), 88,78 мг P₂O₅ 1-1, 306,25 мг K₂O 1-1, 49,99 мг 1-1, 185,61 мг Ca 1-1, 369,60 мг SO₄²⁻ 1-1; микроэлементы: 0,839 мг Fe 1-1, 0,549 мг Mn 1-1, 0,262 мг Zn 1-1, 0,216 мг B 1-1, 0,048 мг Cu 1-1, 0,048 мг Mo 1-1. "Берлей": макроэлементы: 850,3 мг NO₃- 1-1, 18,5 мг NH₄⁺ 1-1 (всего 207,35 мг N 1-1), 91,31 мг P₂O₅ 1-1, 383,65 мг K₂O 1-1, 49,99 мг 1-1, 185,61 мг Ca 1-1, 369,60 мг SO₄²⁻ 1-1; микроэлементы: 0,839 мг Fe 1-1, 0,549 мг Mn 1-1, 0,327 мг Zn 1-1, 0,324 мг B 1-1, 0,048 мг Cu 1-1, 0,048 мг Mo 1-1. Линии RNAi НМА4 удобряют в двух параллельных экспериментах либо раствором "Трубоогневая сушка", либо раствором "Берлей". Содержание различных нитратов в растворах не имеет дифференциального эффекта на уровни Cd или фенотип НМА4. (Данные, представленные в данном исследовании, получены от растений, которые удобряют раствором "Трубоогневая сушка"). Линии AA37 удобряют раствором "Берлей". Для прибавления Zn применяют 0,1 г Zn в форме ZnSO₄·H₂O (Landog, Бирсфельден, Швейцария), разбавленного в 100 мл H₂O. Все растения выращивают в 10-л горшках, в цикле 16 ч света: 8 ч темноты.

Полевые испытания.

Полевые испытания проводят в поле в Швейцарии (кантон Во). Все растения высевают в подвесные ящики (согласно сельскохозяйственной практике) и выращивают в теплице перед пересадкой. Растения группируют по генотипическим классам. Растения группируют в экспериментальные единицы, которые дублируют в поле шесть раз. В первый год для каждой комбинации мутаций выращивают 10 растений, которые несут обе мутации в гомозиготном состоянии, вместе с 10 растениями, гомозиготными только в отношении мутации в НМА4.1, 10 растениями, гомозиготными только в отношении мутации в НМА4.2, и 10 растениями, которые представляют собой нуль-сегрегантные растения в отношении обоих генов НМА4. Для двойных нонсенс-мутантов предусмотрены также два других генотипа (в трех повторностях): 10 растений, которые представляют собой гомозиготные нонсенс-мутанты в отношении НМА4.1 и гетерозиготные нонсенс-мутанты в отношении НМА4.2, и 10 растений, которые представляют собой гомозиготные нонсенс-мутанты в отношении НМА4.2 и гетерозиготные нонсенс-мутанты в отношении

НМА4.1, причем эти последние группы содержат только один функциональный немутантный аллель. На второй год для каждой комбинации мутаций выращивают 20 растений, которые несут обе мутации в гомозиготном состоянии, вместе с 20 растениями, которые представляют собой нуль-сегрегантные растения в отношении обоих генов НМА4. Поле удобряют согласно стандартным приемам для выращивания Берлея.

Два полевых испытания осуществляют в один год на двух полях в двух участках выращивания табака, содержащих высокий уровень кадмия. Для каждой комбинации мутаций выращивают 20 растений, которые переносят обе мутации в гомозиготном состоянии, смежно с 20 растениями, которые представляют собой нуль-сегрегантные растения в отношении обоих генов НМА4.

Анализ экспрессии с применением qPCR.

Общую РНК выделяют из табака с применением набора для выделения РНК из растений RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Хильден, Германия). РНК расщепляют с применением ДНКазы без РНКаз RQ1 (Promega, Медисон, Висконсин, США) и обратно транскрибируют с применением олигопраймера dT17, dTNP, ингибитора РНКазы RNasin Plus и обратной транскриптазы M-MLV, РНКазы (H-), Point Mutant (все от Promega, Медисон, Висконсин, США). qRT-PCR осуществляют с помощью системы Mx3005P (Stratagene, Agilent, Вальдброн, Германия). Реакции амплификации осуществляют с помощью прямого праймера

НМА4.1 (5'-TCATGCAGAAATAAGAAGTGCCAG-3')

и обратного праймера

НМА4.1 (5'-ATGGATGCTTAGAGAGTCCAGGA-3')

или с помощью прямого праймера

НМА4.2 (5'-GTTATGCGGAAATAAGAAGTGCCTA-3')

и обратного праймера

НМА4.2 (5'-CATGGATGCTTAGAGAGTCCAGAC-3')

с применением SYBR 2-стадийной QRT Low Rox (Thermo Scientific, Суррей, Великобритания). В качестве внутреннего стандарта используют ген actin9 с прямым праймером

(5'-CTATTCTCCGCTTTGGACTTGGCA-3')

и обратным праймером

(5'-AGGACCTCAGGACAACGGAAACG-3').

Выделение ДНК и генотипирование растения.

Образцы листа экстрагируют с применением BioSprint 96 (Qiagen, Хильден, Германия) совместно с набором для выделения ДНК из растений BioSprint 96 DNA plant kit (Qiagen, Хильден, Германия). Образцы ДНК используют в реакции TaqMan для того, что бы определить генотип растения. Taqman осуществляют с применением секвенатора ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Life Technologies, Фостер-сити, Калифорния, США) и мастер-микса TaqMan Fast Advanced (Applied Biosystems, Фостер-сити, Калифорния, США). Применяют следующие праймеры Taqman (Microsynth, Бальгах, Швейцария) и зонды (Applied Biosystems, Life Technologies, Воррингтон, Великобритания):

НМА4.1 Q293* :

зонд для мутантного гена 5'-AGGATGGCАТАGCT-3', зонд для дикого типа (WT) 5'-AGGATGGCАCAGCT-3', прямой праймер 5'-СТGGCАСТАСАААТСТАААТGGTAGTАТАGТATTT-3', обратный праймер 5'-СТGGTGTАТААТATTTAGCАCАСТTGTСG-3'; НМА4.1 E296K: зонд для мутантного гена 5'-CАCAGCTTGTСAAAG-3', зонд для WT 5'-

CACAGCTTGTCTGAAG-3', прямой праймер 5'-
 CTGGCACTACAAATCTAAATGGTAGTATAGTATTT-3', обратный праймер 5'-
 CTGGTGTATAATATTTAGCACACTTGTCTG-3'; HMA4.1 T402I: зонд для
 мутантного гена 5'-TTTGACAAAACAGGGATTA-3', зонд для WT 5'-
 TTTGACAAAACAGGGACTA-3', прямой праймер 5'-CCATGTGTTGCGCACTTTCA-3',
 обратный праймер 5'-AACTCGGTCACCATAAAATTCTCCTT-3'; HMA4.1 G251D:
 зонд для мутантного гена 5'-AGAAAACACTGACAGACG-3', зонд для WT 5'-
 AAAACACTGACAGGCG-3', прямой праймер 5'-
 AAGTCGTAAATGTTGATGAAGTCAAGG-3', обратный праймер 5'-
 CAGCCCAGACCGTTGAATCTC3'; HMA4.1 V351M: зонд для мутантного гена
 5'-CTTTGGTCACATTTGATGA-3', зонд для WT 5'-TTGGTCACATTTGGTGAGT-3',
 прямой праймер 5'-GGCTATATCAGCTTCTTTGGCAATT-3', обратный праймер
 5'-AACACATGGCAACTGGTGTAGATAGA-3'; HMA4.1 G382R: зонд для
 мутантного гена 5'-TTCTGTTTAAAAGAGCAGAG-3', зонд для WT 5'-
 TCTGTTTAAAGGAGCAGAGTA-3', прямой праймер 5'-CCATGTGTTGCGCACTTTCA-
 3', обратный праймер 5'-AACTCGGTCACCATAAAATTCTCCTT-3'; HMA4.2
 W265*: зонд для мутантного гена 5'-ATAGATTCAACGGTCTAGG-3', зонд
 для WT 5'-TTCAACGGTCTGGGC-3', прямой праймер 5'-
 GGTGAAACATACCTATTGATGGAGTTGTAA-3', обратный праймер 5'-
 CACTAAATAAATGAAGCATGAAGGAATACTAC-3'; HMA4.2 Q561*: зонд для
 мутантного гена 5'-CAACCATGTGTAGGAT-3', зонд для WT 5'-
 TGCCAACCATGTGCAG-3', прямой праймер 5'-TTGGTGTAAGAAGCAATGAGAGAG-
 3', обратный праймер 5'-ATCATTTTCAGCGTATTGCAGAAATTT-3'.

Анализ элементарного состава.

Во время сбора осуществляют сбор с положений стебля зрелых растений, соответствующих его средней и нижней части, с получением объединенных образцов для каждого полевого опытного участка (1 лист на растение). Осуществляют сбор листьев с двух положений стебля, соответствующих его средней и нижней части, с отдельных тепличных растений (такое же положение листа для всех растений). Собранный материал высушивают в печи при 60°C до полного высушивания.

Анализ образцов осуществляют с помощью ALS (Прага, Чешская Республика). Образцы гомогенизируют и минерализуют с помощью кислот и пероксида водорода перед анализом. Zn и Cd измеряют с помощью масс спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS) согласно CZ_SOP_D06_02_002 (US EPA 200.8, CSN EN ISO 17294-2).

Биоинформатический анализ.

Показатели переносимости мутации получают с применением программного обеспечения SIFT (Ng and Henikoff, 2003), основанного на базе данных последовательностей растений с UniProt (загружена 30 декабря 2012 года). Библиотеки секвенированных РНК образуют с применением набора для приготовления образцов РНК Illumina TruSeq и секвенируют с помощью Illumina HiSeq-2500. Распознавание азотистых оснований и демультимплексинг образцов осуществляют с применением программного обеспечения Illumina HiSeq Control и программного обеспечения конвейерного действия CASAVA. Риды картируют согласно ранее опубликованному геному (Sierra et al., 2014) с применением программного обеспечения TopHat2 (Kim et al. 2013; версия 2.0.11). Дифференциальную экспрессию гена рассчитывают с применением Cuffdiff (Trapnell et al, 2013, версия 2.2.1).

Статистическая обработка.

Когда аналитическое значение ниже LOQ, значение LOQ учитывают в расчетах и графическом представлении. Для измерения значимости применяют 2-сторонние t-критерии с использованием коррекции Satterthwaite для неоднородности дисперсии. Для полевого эксперимента применяли парные t-

критерии для соотношений данных мутантных опытных участков и соответствующих им контрольных опытных участков. Исходные р-значения рассчитывали для определения вероятности того, что среднее значение (мутанта) случайным образом $<0,8 \times$ среднее значение (контроль), с целью определения значимого снижения уровня Cd/Zn ниже неоднозначно измеренного (20%).

Пример 2. Идентификация ортологов транспортеров HMA2/3/4 *A. thaliana* и анализ экспрессии NtHMA4.

Транспортеры HMA2, HMA3 и HMA4 *Arabidopsis* являются близко родственными. Поскольку HMA2 и HMA4 вовлечены в перемещение Zn и Cd от корня к побегу (Wong и Cobbett, 2009), HMA3 принимает участие в накоплении Cd с помощью вакуоль запасающего корня, в которых также хранятся Zn, Cd, Co и Pb (Gravot et al., 2004; Morel et al., 2009). Основываясь на последовательностях *Arabidopsis*, геном табака подвергают скринингу на наличие предполагаемых ортологов AtHMA2/3/4 и двух гомологов HMA4, HMA4.1 и HMA4.2, унаследованных от *N. sylvestris* и *N. tomentosiformis* соответственно и которые были обнаружены в *N. tabacum*.

Паттерны экспрессии HMA4.1 и HMA4.2 исследуют в двух основных сортах табака, TN90 и K326. Типы табака трубоогневой сушки (K326) требуют удобрения, менее богатого на азот по сравнению с типом табака Берлей (TN90) (Lewis et al., 2012). Данные различия в приемах удобрения также частично объясняют, почему содержание Cd оказывается более высоким в типе табака Берлей по сравнению с табаком трубоогневой сушки (Lugon-Moulin et al., 2006). Паттерны экспрессии NtHMA4.1 и NtHMA4.2 анализируют в разных тканях растений табака TN90 и K326, выращенных в поле. В данных двух сортах растений оба гена, как обнаружено, в частности экспрессируются в тканях корня и цветка, но также в незначительной степени во всех остальных тканях (фиг. 1). Данный паттерн находится в соответствии с данными по экспрессии GUS, отмеченными Hussain et al. (2004) для *Arabidopsis* и отмеченными Hermand et al. (2014) для табака.

Пример 3. Эффект подавления NtHMA4 на накопление Cd в листе и фенотип.

С целью оценки потенциала генов NtHMA4 табака в качестве мишеней для уменьшения уровня Cd разработаны конструкции для RNAi против обоих гомологов NtHMA4. Фрагменты ДНК клонируют в бинарные векторы под контролем конститутивного промотора MMV (Dey and Maiti, 1999) и трансформируют в два вышеупомянутых сорта растений TN90 и K326. Для каждого типа табака выбирают линию с RNAi, основываясь на уменьшении экспрессии обоих гомологов HMA4 (фиг. 2). Пять растений из каждой линии и соответствующие им не трансформированные контрольные растения выращивают на почве, с введением добавки в виде Zn и без нее.

Иллюстративные растения каждой линии изображены на фиг. 3а. Соответствующее им содержание Cd и Zn показаны на фиг. 3б и с. Обе линии TN90 и K326 с RNAi HMA4 имеют очень низкий уровень Cd (около LOQ=0,05 ч./млн) по сравнению с контрольными растениями ($>0,55$ ч./млн Cd) в обоих сортах. Кроме того, наблюдают уменьшение уровня Cd в более чем 10 раз и уменьшение уровня Zn в около 4 раз. Что касается биомассы растения (высота стебля и вес листа), линия K326 с RNAi HMA4 демонстрирует хорошие показатели, и они не являются существенно меньше, имея даже чуть более тяжелые листья чем у контрольного растения (фиг. 3д, е). Форма листа незначительно отличается, трансгенные листья более округлые и имеют утолщенные жилки (фиг. 3а). В отличие от этого, линии TN90 с RNAi HMA4 демонстрируют задержку роста и некротические участки на листьях (фиг. 3а, д). Листья являются более толстыми по сравнению с контролем TN90 WT (фиг. 3ф). Основываясь на измерениях свежего и сухого веса, данные растения проявляют увеличение содержания воды (фиг. 3г). Эксперимент повторяют с применением удобрений с высоким уровнем нитратов, тем не менее, снабжение азотом не оказывает влияния на уровни Cd и фенотип (данные не продемонстрированы). В заключение, данные результаты демонстрируют, что подавление обоих гомологов HMA4 в обоих сортах табака уменьшает уровень Cd в листе в более чем 10 раз и уровень Zn в около 4 раз. Тем не менее, несмотря на аналогичное уменьшение уровней Cd/Zn в обоих разновидностях, фенотипические эффекты очень отличались между K326 и TN90, при этом K326 показал себя лучше.

Интересно отметить, что обработка растений с RNAi HMA4 с помощью Zn пополняет содержание Zn в растении почти до контрольных уровней и восстанавливает нормальный (Берлей) фенотип растения в TN90, с поддержанием при этом уменьшенных уровней Cd (фиг. 3а-с, заштрихованные полосы). Прибавление Zn увеличивает высоту стебля и вес листа в линии TN90 с RNAi и уменьшает содержание воды и толщину листа в обоих растениях TN90 и K326 с RNAi HMA4 (фиг. 3д-г, заштрихованные полосы). Это демонстрирует, что Zn может дополнять RNAi HMA4 и восстанавливать фенотип WT, поддерживая более чем 90% уменьшение содержания Cd.

Пример 4. Уменьшение уровня Cd в поле требует комбинации мутаций NtHMA4.

Для селекции табака популяцию обработанных EMS сортов растений AA37 подвергают скринингу на наличие мутаций в HMA4. AA37 представляет собой сорт растений, полученный путем скрещивания южноамериканского темного табака с идиопазмой американского Берлея, таким образом, данный сорт более тесно связан с TN90, чем с K326 (Fricano et al., 2012). Сопоставление профилей экспрессии позволяют предположить, что оба гомолога HMA4 (фиг. 1 и 2) вовлечены в перемещение Zn и Cd от корня к побегу. Таким образом, экзоны, кодирующие каталитически важные домены, подвергают скринингу на

наличие точечных мутаций в обеих копиях НМА4. Все аминокислотные замены, идентифицированные в NtHMA4.1 и NtHMA4.2, анализируют на наличие возможного влияния на функцию белка с применением программы SIFT (Ng and Henikoff, 2003). Небольшой показатель SIFT ($<0,05$) подразумевает, что аминокислотный остаток, вероятно, недопустим на функциональном уровне. В NtHMA4.1 и в NtHMA4.2 идентифицированы 36 и 33 мутации соответственно, включая 2 нонсенс-мутации в каждом из гомологов и 15 миссенс-мутаций в каждом гомологе со значением показателя SIFT ниже 0,05 (табл. 10). Показатель SIFT используется в качестве инструмента для облегчения выбора мутаций.

Мутации в обеих изоформах НМА4 сочетают с помощью скрещивания. Такое скрещивание включает по меньшей мере одну нонсенс-мутацию и вторую мутацию, которая является либо нонсенс-мутацией, либо миссенс-мутацией, прогнозируемой с применением SIFT. Перед каждым из тепличных и полевых тестов в подвесных ящиках сегрегирующих потомков выращивают, генотипируют с применением Taqman и группируют в отдельные классы перед пересадкой в почву.

В тепличном эксперименте тестируют шесть комбинаций мутаций. Для каждой из них восемь растений, которые переносят две гомозиготные мутации, выращивают вместе с восемью растениями, которые гомозиготны в отношении только одной мутации в НМА4.1, восемью растениями, которые гомозиготны в отношении мутации в НМА4.2, и восемью нуль-сегрегантными растениями в отношении обоих генов НМА4. Для двойных нонсенс-мутантов также включены два других генотипа: восемь растений, которые представляют собой гомозиготные нонсенс-мутанты в отношении НМА4.1 и гетерозиготные нонсенс-мутанты в отношении НМА4.2, и восемь растений, которые представляют собой гомозиготные нонсенс-мутанты в отношении НМА4.2 и гетерозиготные нонсенс-мутанты в отношении НМА4.1, причем данные последние группы содержат только один функциональный немутантный аллель. После пяти и одиннадцати недель выращивания в почве (а), листья с нижних позиций стебля собирают для определения свежего веса (b) и анализа в отношении уровней Cd, Zn (фиг. 4с, d).

В отличие от простых нонсенс-мутантов и нонсенс-мутантов с одним функциональным аллелем НМА4 только двойные нонсенс-мутанты НМА4.1 Q293*/НМА4.2 Q561* демонстрируют аналогичное уменьшение уровня Cd, как нарушение, наблюдаемое для растений с RNAi НМА4. После пяти недель выращивания в почве гомозиготные двойные нонсенс-мутанты демонстрируют уменьшение уровня Cd от 0,6 ч./млн. в контрольных растениях до уровней около предела количественного определения ($LOQ=0,05$ ч./млн.), когда содержание Zn уменьшается только на треть (фиг. 4с, d). Результаты анализа в отношении уровня Cd после одиннадцати недель демонстрируют, что тепличные растения с последующим ростом характеризовались небольшим уровнем Cd в увеличивающемся количестве биомассы. Средние контрольные значения составляют около 0,3 ч./млн Cd, в то время как две проанализированные линии двойных мутантов демонстрируют уровни Cd ниже предела количественного определения (фиг. 4с). Интересно отметить, что одиночные нонсенс-мутанты и мутантные растения, несущие только один функциональный аллель НМА4, демонстрируют промежуточный уровень содержания Zn и при этом проявляют контрольные уровни Cd. Данные уровни Zn кажутся достаточными для нормального роста, учитывая, что в данных растениях не наблюдается разница в росте по сравнению с контролем. С другой стороны гомозиготные двойные нонсенс-мутанты демонстрируют 50% уменьшение в весе листа после пяти недель роста. Тем не менее, после одиннадцати недель мутантные растения достигают такого же размера, как и контрольные (фиг. 4а, b), присутствует только незначительная задержка цветения.

Иные комбинации мутантов исследуют после пяти недель роста, две другие комбинации (E296K/Q561* и T402I/Q561*) демонстрируют уменьшение уровня Cd, аналогичное двойному нонсенс-мутанту, при этом характеризуются только одной третью содержания Zn в контроле (фиг. 5а, b). Две данные линии демонстрируют аналогичную задержку роста: на ранней стадии T402I/Q561* демонстрирует около 25% уменьшение веса листа, и E296K/Q561* демонстрирует 50% уменьшение веса листа (фиг. 5с). Спустя еще шесть недель роста больше не наблюдают существенно значимых различий в размере листа и высоте между контрольными растениями и двойными мутантами. Тем не менее, в линиях двойных мутантов присутствует незначительная задержка образования цветка. Две другие комбинации мутаций (G382R/Q561* и G251D/Q561*) не демонстрируют значимого уменьшения уровня Cd. Все данные по Cd и Zn подытожены в табл. 8. Для контрольных групп значения всех индивидуальных контрольных растений сгруппированы вместе в табл. 8.

В совокупности данные эксперименты демонстрируют, что оба гена НМА4 должны по меньшей мере частично подвергаться влиянию, чтобы значимо уменьшить уровни Cd.

Пример 5. Валидация уменьшения уровня Cd в двух полевых испытаниях при умеренных условиях содержания Cd.

Два полевых эксперимента проводят при умеренных условиях содержания кадмия с целью подтвердить тепличные данные. В первом эксперименте выращивают одинаковые генотипические группы (одиночные мутанты, двойные мутанты и контрольные растения) в шести дублируемых опытных участках. Каждая дублируемая единица содержит 10 растений двойных мутантов, контроль НМА4 WT и два простых мутанта соответственно. Для двойных нонсенс-мутантов включены также два других генотипа, которые содержат один функциональный немутантный аллель (гомозиготные нонсенс-мутанты в отношении НМА4.1/ гетерозиготные нонсенс-мутанты в отношении НМА4.2 и гетерозиготные нонсенс-

мутанты в отношении НМА4.1/ гомозиготные нонсенс-мутанты в отношении НМА4.2). Растения выращивают в течении 14 недель в поле в Швейцарии. Исследуют фенотип растений и собирают листья со середины стебля, высушивают и подвергают анализу на уровень Cd/Zn. Р-значения рассчитывают для определения вероятности того, что наблюдаемое уменьшение уровня Cd в мутанте случайным образом составляет более чем 20% по сравнению с контролем.

В целом полевые и тепличные данные являются взаимосоответствующими. В то время как одиночные мутанты не демонстрируют какого-либо уменьшения уровня Cd по сравнению с контрольными растениями (табл. 2), такие же линии двойных мутантов, которые характеризовались низким уровнем Cd в теплице (T402I/Q561*; E296K/Q561*; Q293*/Q561*), так же как и дополнительный двойной нонсенс-мутант (Q293*/W265*), демонстрируют аналогичное более чем десятикратное уменьшение уровня содержания Cd в полевых условиях с вероятностью $p < 0,05$ (наибольшее р значение=0,0054) того, что среднее значение двойного мутанта является уменьшенным по меньшей мере на 20% (табл. 4). Кроме данных четырех линий линия G251D/Q561* демонстрирует 30% уменьшения уровня Cd, тем не менее, в данной линии содержание Cd не является значимо уменьшенным на более чем на 20% (р значение=0,1029). Несмотря на то, что содержание Zn уменьшено примерно на 70% в теплице, линии с низким уровнем Cd (T402I/Q561*; E296K/Q561*; Q293*/Q561*; Q293*/W265*), выращенные в поле, демонстрируют максимально только около 50% уменьшения уровня Zn (табл. 4). В первом полевом испытании вес листа является уменьшенным в линии E296K/Q561*, в свою очередь в трех других линиях с низким содержанием Cd (T402I/Q561*; Q293*/Q561*; Q293*/W265*) вес листа значимо не изменен (фиг. 6b). Морфология растения и листа не подвержена влиянию мутаций. Тем не менее, для линий E296K/Q561*, Q293*/Q561* и Q293*/W265* наблюдают некротические пятна на нижних листьях, в частности на ранней стадии роста. Двойные мутанты T402I/Q561* и G251D/Q561* демонстрируют наилучшие фенотипы и не проявляют некротических поражений в любой момент времени. Два данные линии почти не отличаются от соответствующих им контролей.

Во втором полевом испытании такую же комбинацию мутаций выращивают в поле вместе с дополнительными комбинациями (18 в целом). На этот раз одна экспериментальная единица содержит 20 гомозиготных двойных мутантных по НМА4 растений и 20 контрольных растений с НМА4 WT. Одиночных мутантов не подвергают анализу снова. Данные по уровню Cd/Zn продемонстрированы в табл. 5; графики данных по уровню Cd и данные по фенотипу изображены на фиг. 7. Те же линии, которые демонстрируют уменьшение уровня Cd в первом полевом испытании, снова демонстрируют сопоставимое уменьшение уровня Cd; за исключением линии G251D/Q561*, которая на этот раз даже демонстрирует 70% уменьшения уровня Cd. Кроме данных линий подвергнуты анализу дополнительно другие двойные нонсенс-мутации (Q464*/Q561*), которые демонстрируют, как ожидалось, очень сильное уменьшение уровня Cd на 94%. Аналогично новая комбинация мутация Q293*/G235E демонстрирует 94% уменьшения уровня Cd. Комбинации мутаций Q293*/L223F и Q293*/D234N характеризуются промежуточным уменьшением уровня Cd (37% и 27% соответственно). Линии Q293*/Q561*, Q293*/W265*, Q464*/Q561*, Q293*.G235E, E296K/Q561*, T402I/Q561*, G251D/Q561* и Q293*/L223F демонстрируют значимое уменьшение более чем на 20% уровня Cd ($p < 0,05$; наибольшее р-значение=0,0007). Линия Q293*/D234N демонстрирует 27% уменьшения уровня Cd, но при этом уменьшение составляет не более чем 20% с $p < 0,05$. Все остальные проанализированные двойные мутанты демонстрируют только менее чем 20% уменьшения уровня Cd и, таким образом, не представляют интереса для дальнейшего развития. Комбинации мутаций Q293*/Q561* и Q293*/W265*, Q464*/Q561*, Q293*/G235E и E296K/Q561* демонстрируют некротические пятна на листьях и уменьшенный показатель роста на ранней стадии. Тем не менее, во время сбора не наблюдают явной разницы между данными двойными мутантами и соответствующими им контролями. Сухой вес листа большей части мутантных линий в поле является аналогичным соответствующему ему весу контрольных растений (фиг. 7b). В некоторых случаях сухой вес листа незначительно отличается от контрольных образцов, тем не менее, без корреляции с уменьшением уровня Cd.

Пример 6. Валидация уменьшения уровня Cd в двух полевых испытаниях при условиях высокого содержания Cd.

В двух небольших полевых испытаниях растения с пятью комбинациями мутаций, перспективных в плане низкого уровня Cd (комбинация двойных нонсенс-мутаций Q293*/Q561*, так же как комбинации Q293*.G235E, E296K/Q561*, T402I/Q561* и G251D/Q561*), также как и соответствующие им контрольные растения, выращивают на двух участках с известным высоким содержанием Cd. Данные по уровню Cd/Zn продемонстрированы в табл. 6; графики данных по уровню Cd и данные по фенотипу показаны на фиг. 8. Контрольные растения накапливают около 3 ч./млн Cd, в свою очередь содержание Cd является уменьшенным на >80% и на >90% для комбинаций мутаций Q293*/Q561*, Q293*/G235E, E296K/Q561* и T402I/Q561* в первом (поле 3) и втором участках (поле 4) соответственно. Для комбинаций G251D/Q561* уменьшение уровня Cd достигает около 45% в обоих местоположениях в поле. Для всех линий вероятность того, что среднее значение ниже 20%, является значимой ($p < 0,05$; наибольшее р-значение=0,0068). Не наблюдают влияния на вес листа (фиг. 8b).

В совокупности полевые данные демонстрируют, что при сельскохозяйственных полевых условиях даже в разных участках комбинации мутаций НМА4 имеют потенциал к уменьшению содержания Cd в

5- 10 раз. Как представляется, развитие растения и урожай не подвергаются влиянию на поздней стадии роста сорта AA37.

Пример 7. NtHMA4 представляет собой ключевой фермент для перемещения Cd от корня к побегу.

В линиях с RNAi HMA4, а также в двойных нонсенс-мутантах по HMA4, описанных в данном документе, уровень Cd в листе может быть уменьшен в более чем 10 раз, тем самым указывая на то, что перенос Cd от корня к побегу в табаке, по сути, зависит от HMA4. Мутации в обоих генах HMA4 необходимы для разведения табака с низким уровнем Cd. Как при тепличных, так и при полевых условиях двойные нонсенс-мутанты HMA4 характеризуются 90% уменьшением уровня Cd. При всех условиях уровня Cd, которые были протестированы, нонсенс-мутация только в одном из генов HMA4 не способна уменьшать содержание Cd в растениях табака.

Интересно отметить, что при чрезвычайно высоких не встречающихся в природе параметрах Cd отмечалось 50% уменьшение уровня Cd в растениях, которые несут только одну нонсенс-мутацию в одном из генов NtHMA4 (Hermand, 2014). Это соответствует результатам наблюдений за Arabidopsis, где в агаровой среде с высоким уровнем Cd нокаут AtHMA4 уменьшает содержание Cd в побеге более чем на 50%, в свою очередь, одновременный нокаут обоих данных генов-транспортеров приводит к еще большему уменьшению (Wong и Cobbett, 2009). Исследование на NtHMA4.1 и NtHMA4.2 демонстрирует, что результаты, полученные с искусственных систем, нуждаются в подтверждении в полевых и почвенных условиях для оценки влияния мутации на разведение растения.

Как и для многих сельскохозяйственных культур, существуют различные сорта табака. Они характеризуются значительными различиями, например в требованиях к удобрению и накоплению аминокислот и сахаров (Lewis et al., 2012). В трех проанализированных сортах растений, TN90, K326 и AA37, разрушение HMA4 демонстрирует сопоставимый эффект, т.е. во всех данных сортах растений достигнуто уменьшение уровня Cd более чем на 90%. Тем не менее, несмотря на сопоставимый эффект, наблюдаемый в отношении уменьшения уровня Cd и Zn, производительность растений очень разная. В то время как K326 лишь незначительно подвержен нехватке HMA4, и характеризуется округлой формой листа и увеличением жилок листа, с постоянной биомассой и размером растения, TN90 демонстрирует сильную задержку роста и некротические поражения, в свою очередь, AA37, не являясь типичным растением типа Берлей, как TN90, демонстрирует только незначительные эффекты. Это подчеркивает метаболические различия между сортами табака относительно гомеостаза Zn. Снабжение Zn почвы обеспечивает возможность восстановить фенотип, и это указывает на то, что другие транспортеры могут восполнить HMA4 и опосредовать поглощение Zn, хотя и на низком уровне.

Пример 8. Низкий уровень Cd в сочетании с не подверженным влиянию фенотипом требует корректировки обоих гомологов NtHMA4.

Для того, что бы минимизировать эффекты двойного нокаута HMA4 на фенотип, вторую мутацию идентифицируют в одном из генов HMA4. Цель состоит в том, что во время разведения данной комбинации в виде различных сортов достаточно значимо уменьшить уровень Cd, но без влияния на фенотип растения. В то время как в мутантном фоне AA37 EMS эффект является заметным, в частности на ранней стадии роста, на поздней стадии явного влияния на рост и биомассу не наблюдают. Тем не менее, согласно данным по линиям с RNAi HMA4 (фиг. 3) и согласно разновидности, представляющей интерес, в частности с разновидностями типа Берлей, может проявляться негативное влияние на рост.

Далее по тексту описаны комбинации мутаций, которые считаются особенно полезными для дополнительного разведения растения. Кроме двойных нокаут-мутантов по HMA4 (Q293*/Q561*, Q293*/W265*, Q464*/Q561*) были идентифицированы дополнительные комбинации с сопоставимым уменьшением уровня Cd (80-90%).

В то время как двойные мутанты E296K/Q561* и Q293*/G235E демонстрируют фенотип, аналогичный двойным нокаут-мутантам на ранней стадии (некротические поражения, уменьшение роста), мутантные растения T402I/Q561* демонстрируют лучшие показатели роста и не проявляют некротических участков на листьях на ранней стадии. Комбинация G251D/Q561* обеспечивает от 30 до 70% уменьшения уровня Cd, и фенотип не отличается от контроля. Еще две комбинации мутаций (Q293*/L223F и Q293*/D234N) демонстрируют только низкие показатели уменьшения уровня Cd (37 и 27% соответственно в одном полевом испытании).

Второй тепличный эксперимент выполняли с дополнительными комбинациями мутаций, в которых комбинация H438Y/W265* демонстрирует 58% уменьшения уровня Cd и не влияет на фенотип (табл. 9).

Описанные выше комбинации мутаций предлагают возможность дозировать содержание Cd и Zn и найти оптимальную комбинацию мутаций для каждого сорта. Для такого сорта растений как Берлей, на котором сильнее сказывается нехватка HMA4, как продемонстрировано на трансгенных линиях (фиг. 3), может быть необходимо применить промежуточный состав (например, G251D/Q561*, H438Y/W265*, Q293*/L223F или Q293*/D234N).

Далее по тексту исследовали локализацию мутаций (фиг. 9). АТФаза тяжелого металла содержит три домена, которые являются важными для каталитической функции: фосфорилирующий домен (P), домен нуклеотидного связывания (N) и исполнительный домен (A). P-домен состоит из N- и C-терминальных краев третьей цитоплазматической петли. Средняя часть петли представляет собой N-

домен. DKTGT-мотив обнаружен в Р-домене. Остаток аспартата в этом мотиве, за прогнозами, фосфорилируется в активном ферменте во время катализа. В А-домене каталитически активная TGE(S) петля выступает из структуры, взаимодействуя с сайтом фосфорилирования в АТФ-связующем домене (Banci et al., 2009).

Пять функциональных мутаций, которые имеют влияние на уровень поглощения Cd, обнаружены в А (исполнительный домен)-домене транспортера (L223F, D234N, G235E, G251D, E296K), и G251* локализован в TGES-мотиве. С данных по другим транспортерам НМА известно, что мутации, которые происходят в А-домене, либо нарушают устойчивость укладки домена, либо влияют на взаимодействие с другими доменами фермента (Banci et al., 2009). Мутация T402I обнаружена в DKTGT-мотиве, а Р (фосфорилирующий)-домен в третьей цитоплазматической петле белка. Мутация H438Y обнаружена в НР-мотиве N (нуклеотидное связывание)-домена в третьей цитоплазматической петле белка, который может воздействовать путем нарушения координационной связи с участием нуклеотида.

В заключение, две мутации являются необходимыми для ингибирования транслокации Cd, одна из них приведена к полному нокауту, и вторая представляет собой нонсенс- или миссенс-мутацию, которая вероятно расположена либо в А-домене, в DKTGT-мотиве Р-домена, либо в локусе НР N-домена во второй копии НМА4.

В совокупности данная работа подчеркивает потребность в идентификации предпочтительной системы для измерения эффекта мутаций НМА4 и их комбинаций на содержание Cd и на фенотип. Данная работа демонстрирует важное значение корректировки системы перемещения НМА4 от корня к побегу для того, чтобы получить табак с низким уровнем Cd без изменений фенотипа для всех сортов растений, вызывающих интерес.

Перечень источников.

Arnould, S., Delenda, C., Grizot, S., Desseaux, C., Pâques, F., Silva, G.H., and Smith, J. (2011). The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. *Protein Eng Des Sel.* **24** (1-2): 27-31.

Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Migliardi, M., Natile, G., Nushi, F., и Rosato, A. (2009). Solution structures of the actuator domain of ATP7A and ATP7B, the Menkes and Wilson disease proteins. *Biochemistry* 48(33): 7849-7855.

Bortesi, L., и Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv.* **33** (1): 41-52.

Chen, K, and Gao, C. (2014). Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. *Plant Cell Rep.* 33(4):575-583.

Chen, L., Hao, L., Parry, M.A., Phillips, A.L., и Hu, Y.G. (2014). Progress in TILLING as a tool for functional genomics and improvement of crops. *J Integr Plant Biol.* **56** (5): 425-443.

Dey, N., and Maiti, I.B. (1999). Structure and promoter/leader deletion analysis of mirabilis mosaic virus (MMV) full-length transcript promoter in transgenic plants. *Plant Mol Biol.* 40 (5): 771-82.

Fricano, A., Bakaher, N., Del Corvo, M., Piffanelli, P., Donini, P., Stella, A., Ivanov, N.V., and Pozzi, C. (2012). Molecular diversity, population structure, and linkage disequilibrium in a worldwide collection of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) germplasm. *BMC Genet.* 13:18. doi: 10.1186/1471-2156-13-18.

Gravot, A., Lieutaud, A., Verret, F., Auroy, P., Vavasseur, A., and Richaud, P. (2004). AtHMA3, a plant P1B-ATPase,

functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *FEBS Lett.* 561 (1-3):22-28.

Hermand, V., Julio, E., Dorlhac de Borne, F., Punshon, T., Ricachenevsky, F.K., Bellec, A., Gosti, F., and Berthomieu, P. (2014) Inactivation of two newly identified tobacco heavy metal ATPases leads to reduced Zn and Cd accumulation in shoots and reduced pollen germination. *Metallomics*, **6** (8), 1427-1440.

Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N.L., Wallroth, M., Eichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1985). A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. *Science*, 227, 1229-1231.

Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Young, J, Camakaris J, Harper JF, Cobbett CS. (2004) P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*, **16** (5), 1327-1339.

Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* **14**:R36.

Korenkov, V., King, B., Hirschi, K., and Wagner, G.J. (2009). Root-selective expression of AtCAX4 and AtCAX2 results in reduced lamina cadmium in field-grown *Nicotiana tabacum* L. *Plant Biotechnol J* **7** (3):219-226.

Lewis, R.S., Parker, R.G., Danehower, D.A., Andres, K., Jack, A.M., Whitley, D.S., and Bush, L.P. (2012) Impact of alleles at the Yellow Burley (Yb) loci and nitrogen fertilization rate on nitrogen utilization efficiency and tobacco-specific nitrosamine (TSNA) formation in air-cured tobacco. *J Agric Food Chem.* **60**, 6454-6461.

Liedschulte, V., Laparra, H., Battey, J., Goepfert, S., and Bovet, L. Missense or nonsense mutations in either *HMA4.1* or *HMA4.2* do not significantly reduce cadmium content in the leaves of tobacco plants grown under field conditions. Стендовый доклад представлен на: The 12th Solanaceae conference; 25-29 октября 2015 г.; Бордо, Франция.

Lugon-Moulin, N., Martin, F., Krauss, M.R., Ramey, P.B.,

and Rossi L. (2006) Cd concentration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) from different countries and its relationship with other elements. *Chemosphere* **63**, 1074-1086.

Morel, M., Crouzet, J., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., Vavasseur, A., and Richaud, P. (2009). AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **149** (2), 894-904.

Ng, P.C., and Henikoff, S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* **31**(13):3812-4.

Petolino, J.F. (2015). Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* **51** (1): 1-8.

Puchta, H., and Fauser, F. (2013). Gene targeting in plants: 25 years later. *Int J Dev Biol.* **57** (6-8): 629-37.

Qiwei, S., and Caixia, G. (2015). Research progress of genome editing and derivative technologies in plants. *Yi Chuan.* **37** (10): 953-973.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**, 671-675, 2012.

Sierro, N., Battey, J.N.D., Ouadi, S., Bakaher, N., Bovet, L., Willig, A., Goepfert, S., Peitsch, M.C., and Ivanov, N.V. (2014) The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nature Communications* **5**, Article number: 3833.

Trapnell, C., Hendrickson, D., Sauvageau, M., Goff, L., Rinn, J.L., and Pachter, L. (2013). Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnology* **31**: 46-53.

Wong, C.K., and Cobbett C.S. (2009) HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.*, **181** (1), 71-78.

Wright, D.A., Li, T., Yang, B., and Spalding, M.H. (2014) TALEN-mediated genome editing: prospects and perspectives. *Biochem J.* **462** (1): 15-24.

Любая публикация, цитируемая или описанная в данном документе, предоставляет соответствующую информацию, раскрытую до даты подачи настоящего изобретения. Заявления, сделанные в данном документе, не должны быть истолкованы как признание того, что авторы настоящего изобретения не имеют оснований для его противопоставления таким раскрытиям как более раннего. Все публикации, упомянутые в вышеприведенном описании, включены в данный документ с помощью ссылки. Различные модификации и варианты настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники без отступления от объема и сути настоящего изобретения. Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано в связи с конкретными предпочтительными вариантами осуществления, следует понимать, что заявленное изобретение не должно чрезмерно ограничиваться такими конкретными вариантами осуществления. В действительности различные модификации описанных способов осуществления изобретения, которые очевидны специалистам в клеточной, молекулярной биологии и биологии рас-

тений или в смежных областях, предназначены находиться в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

Последовательности.

SEQ ID NO:1

Аминокислотная последовательность АТФазы тяжелого металла *Nicotiana tabacum* (NtHMA4.1), номер доступа в GenBank: CCQ77798.

```

1  MVESEKMNET  KKLSKSYFDV  LGICCTSEVV  LVEKILKNLE  GVKEVSVIVT
TKTVIVIHDS
61  LLISPQQIVK  ALNQARLEAS  IRVKGEKNYQ  KKWSPFAIG  SGILLGLSFL
KYFFAPFQWL
121 ALAAVAVGIP  PIIFRGVAAV  RNLTLDINIL  VLIAVAGSIV  LHDYWEAGTI
VFLFAIAEWL
181  ESRASHKATA  AMSSLVNIVP  PTAVLAESGE  VVNVDEVKVN  SILAVKAGET
IPIDGVVVEG
241  ECDVDEKTLT  GESFPVSKQR  DSTVWAGTTN  LNGYISVKTT  ALAEDCAVAR
MAQLVEDAQN
301  KSKTQRYID  KCAKYTPAI  VAISASLAIV  PTALRVHNRN  EWYRLALVTL
VSACPCALVL
361  STPVAMCCAL  SKAATSGLLF  KGAEYLETLA  KIKIMAFDKT  GTITKGEFMV
TEFKSLIDGF
421  SLNTLLYWVS  SIESKSGHPM  AAALVDYAQS  NSVEPKPDRV  EQFQNFPGEG
IFGRIDGMEI
481  YVGNRKISSR  AGCTTVPEIE  GDSFKGKSVG  YIFLGSSPAG  IFSLSDVCRI
GVKEAMRELK
541  QMGIKTAMLT  GDCYAAANHV  QDQLGGALDE  FQAELLPEDK  ATIIKGFQKE
APTAMIGDGL
601  NDAPALATAD  IGISMGISGS  ALAKETGHVI  LMTNDIGRIP  KAARLARRVR
RKIVENMIIS
661  VVTKAAIVAL  AIAGYPLVWA  AVLADTGTCL  LVILNSMLLL  RGGTRRHGKK
CWRSSTPSHA
721  PHHKDKASCC  KSENAPQLCC  SDIESQKCKT  SQSCSSEVCV  PRCQPVSSGS
KSCGNNQCPD
781  SIENSGFHS  RRPQCCSSKM  AAKACQSAVS  ESKSCGNNQC  PDSVENS GFH
SHPRPECCSS
841  KMAAKACQSA  VSEKSCGNN  QCPDSVENS  FHSHPRPQCC  SSKMAAKAGQ
SALSEKSCG
901  NNNCSDSIHK  SNCHSLTNSL  VCSSKMSAPQ  CHSATSSNKS  CGSTKCSDFS
DKKCCQSDKI

```


041833

961 PQTCSKKSA PGCQSAVSGS KSCGNSKCS D SKDNSSHPSH PDHQTCMSKL
 CAPQSQSATS
 1021 SSRTCNTKC SDTNSKNSCY SQTNSESCSS KMSGPCKTA NSGSRSCRNK
 KCQDSATENS
 1081 FHSPLTNPLS GEKLSEQKSL DLVRKDKESS HDLRHGCSDE EHDHTNLDKA
 YDSCALQECC
 1141 YSVQGNKTDV SETGIQETAH CDSTNQTCQT ASSGSMTCGN DKILDLSLSIH
 GCHSHDNPLH
 1201 EENNLEQKIL DVVGEIKSP HAVGHGCS DK EHDHSHPEKA YDSCATDDCC
 FSVQVHGIDD
 1261 VSKSEIQETA HCDSTKQSMV ISSSCKHEPK DQVNHGCLHS KTTPTDEELA
 KLVRRCKKYK
 1321 PCHDVRSGCR KHAAECGPTV RSTINILRDN HHHYLDCSGR KVCSLLEKRH
 IGGCCDSFRK
 1381 ECCAKKKHLG ASFGGGLSEI VIE
 SEQ ID NO:2
 Аминокислотная последовательность АТФазы тяжелого металла
Nicotiana tabacum (NtHMA4.2), номер доступа в GenBank:
 CCW03243.1.
 1 MVESEKMN D KNLSKSYFDV LGICCTSEVV LVEKILKNLE GVKEVSVIVT
 TKTIVIVIHDS
 61 LLISQQQIVK ALNQARLEAS IRVKGEKNYQ KKWSPFAIG SGILLGLSFL
 KYFFAPFQWL
 121 ALAAVAVGIP PIIFRGVA AV RNLTLDINIL VLIAVTGSIV LHDYWEAGTI
 VFLFTIAEWL
 181 ESRASHKATA AMSSLVNIVP PTAVLAESGE VVNVDEVKLN SILAVKAGET
 IPIDGVVMEG
 241 ECDVDEKTLT GESFPVSKQI DSTVWAGTTN LNGYISVKTT ALAEDCAVAR
 MAQLVEDAQN
 301 KSKTQRYID KCAKYYTPAI VAISASLAIV PTALRVHNRN EWYRLALVTL
 VSACPCALVL
 361 STPVAMCCAL SKAATSGLLF KGAEYLETLA KIKIMAFDKT GTITRGEFMV
 TEFKSLVDGL
 421 GLNTLLYWVS SIESKSGHPM AAALVDYAQS NSVEPKPDRV EQFQNFPGEG
 IFGRIDGMEI
 481 YVGNRKISSR AGCTTVPEIE GDSFQGKSVG YIFLGSSPAG IFGLSDVCRI

GVKEAMRELK
 541 QMGIKTAMLT GDCYAAANHV QDQLGGAMDE FQAE LLPEDK ATIIKGFQKE
 APTAMIGDGL
 601 NDAPALATAD IGISMGISGS ALAKETGHVI LMTNDIGRIP KAARLARRVR
 RKIVENMIIS
 661 VVTKAAIVAL AIAGYPLVWA AVLADTGTCL LVILNSMLLL RVGTHRHGKK
 CCRSATPSHA
 721 PNHKDKASCC KSENAPQLCC SDIESQKKCT SQSCSSEVCV PRCQPVS SSGS
 KSCGNNQCPD
 781 SVENSGF HSH PRPQCCSSKM ASKACQSAVS ESKSCGNNQC PDSVENSGFH
 SHPRPQCCSS
 841 KMASKACQSA VSESKSCGNN QCPDSVENSG FSHPRPQCC SLKMASKACQ
 SAVSESKSCG
 901 NNQCPDSVEN SGF HSHPRPQ CCSSKMAAKA CQSAVSESKS CGNNNCSESI
 YKSSCHSLTS
 961 SLVCSKMSA PQCHSATSSS KSCGSTKCSN FSDKKCCQYD KIPQTCSTKK
 SAPGCQSAVS
 1021 GSKSCGDSKC SDSKDNSSHP SHPDHQICTS KLCAPQSQSA TSSSRTCGNM
 KCDTNSKNS
 1081 CYSHTNSESC SSKMSGPACK TANSGSRLCG NKKCLDSANE NSFHSLTNPL
 CEEKLLEKES
 1141 LDLARKDRES NHDLSHGCS D EEHDHLNLDK AHDSCALQEC CYSVQGNKTD
 VSETGIQEAA
 1201 HCDSINQTCQ TAISGSMTCG NNKSLDSL SI HGCHSHDSPL HKESNLEQKS
 LDVAGEGIKS
 1261 PHAVGQGCSD KEHNHSHPEK AYDSCATDDC CFSVQVHGID DVSRSEIQET
 AHCDSTKQST
 1321 VIPSSCEHEP KDQVNHCGSH SKSIPTDEEL AKLVRRCKY KPCHDVRSGC
 RKHAAECGPT
 1381 VRSTINILRD NHHHHLDCSG RKCSSLLEKR HIGGCCDSFR KECCA KNNHL
 GASFGGGLSE
 1441 IVIE

SEQ ID NO:3

Полинуклеотидная последовательность АТФазы тяжелого металла
Nicotiana tabacum (*NtHMA4.1*) номер доступа в GenBank:
 HF675181.1.

041833

1 agagaaggag aaaaatggtg gaaagtgaaa aatgaatga acaaagaag
 ttgagcaaga
 61 gctatthttga tgthtttgga atthtgctgta cthtcagaagt thttctagtt
 gaaaaaatc
 121 tcaagaatct tgaaggggtt aaagaggtht cagtaattgt cacaacaaag
 actgtcattg
 181 ttattcatga thctctthct atthctccgc aacaaattgt taaagcattg
 aatcaagcaa
 241 gattagaagc aagcataaga gtgaaaggag agaaaaacta ccaaaagaaa
 tggccaagtc
 301 catttgcaat tggcagtgga atattgcttg gactctcatt thtgaagtac
 thttthgcac
 361 cthtccaatg gthtagcactt gcagctgtht cagthtggat thctccaatt
 atththtagag
 421 gtgtggctgc cgtgcgaaac thcactcttg acatcaacat thctgtthta
 atagcagthg
 481 ctggatcaat ththttacac gattattggg aagctggtac thttgtcttc
 thattcgcca
 541 thgcagaatg gctagagthca agggcaagth acaaggctac cgctgctatg
 thcatcactg
 601 tcaatatagt cctccaaca gcagththtag ctgaaagcgg agaagthgta
 aatgthgatg
 661 aagthcaaggt gaatagcatt thtgctgthga aagctggtga aactatacct
 atthgatggag
 721 thgtagthga aggggaatgt gacgthgacg agaaaacact gacagcgag
 thgththccag
 781 thtctaagca aagagattca acgthctggg thggcactac aatctaaat
 ggctatatca
 841 gtgthtaagac thcggcttht gctgaagatt thgthgthgth taggathgga
 cagctthgthg
 901 aagathgthca gaacaagaaa thcaaaaacc aaagatacat cgacaagthg
 gctaaatatt
 961 atacaccagc aatthgthgct atathcagct thththgcaat ththctact
 gctaaagag
 1021 thcacaatcg aatgaatgg thctgctthg thththgthc atthgthgag
 gcatgthcgt

041833

1081 gtgcacttgt tctatctaca ccagttgcca tgtgttgccg actttcaaaa
 gcagcaacgt
 1141 ccggtcttct gtttaaagga gcagagtacc ttgagactct agctaaaatc
 aaaatcatgg
 1201 cttttgacaa aacagggact ataactaaag gagaatttat ggtgaccgag
 ttcaagtctc
 1261 tgattgatgg ttttagtctc aatacactgc tttactgggt ttcaagcatt
 gagagcaagt
 1321 caggatcatcc gatggcagcc gctctgggtg actatgcaca atcaaattcc
 gttgagccaa
 1381 agcctgatag agttgagcag tttcaaaatt ttcttgggtga agggatattt
 ggaagaattg
 1441 atggaatgga aatctatgtc gggaaatagga aaatttcttc aagagctgga
 tgtaccacag
 1501 taccagaaat agaggggtgat agtttcaaag gaaagtctgt tggatacata
 tttttgggat
 1561 catctccagc tggaaatttc agtctttccg atgtttgtcg aattgggtga
 aaagaagcaa
 1621 tgagagaact gaagcagatg ggtatcaaaa ccgcatgct tactgggtgat
 tgttatgcag
 1681 ctgccaacca tgtgcaggat cagttagggtg gagctttgga tgaatttcaa
 gcagaactcc
 1741 taccagagga caaggcaaca atcatcaagg gttttcagaa ggaagctcca
 acagcgatga
 1801 taggcgacgg ccttaatgat gctcctgcat tagcaacagc tgacattggc
 atctcaatgg
 1861 gcatctctgg gtcagctctc gctaaagaaa caggccatgt tataactaatg
 acaaatgaca
 1921 tcggaagaat accgaaagct gcacgtcttg ctagaagagt tcgaaggaag
 attggtgaga
 1981 atatgattat atcagtcggt acaaaggctg ccatagttgc attggcaata
 gcaggttatc
 2041 cattggtttg ggctgctgtc ctcgcagata ctgggacatg cttgctagtg
 attttgaaca
 2101 gcatgctact tctacgagga ggacacgca gacatgggaa aaaatggttg
 agatcttcta

041833

2161 ctctctcgca tgctccccac cacaagaca aagcttcatg ttgcaagtcg
 gaaaatgctc
 2221 cccagctgtg ttgctctgat attgagtcac aaaagaaatg tacaagtcaa
 tcatgctcgt
 2281 ccgaggtgtg tgtccaaga tgtcaacctg tctcctcagg atcaaagtca
 tgtggaaata
 2341 atcagtgcc agactccatt gaaaatagtg gttttcattc tcatcgccgt
 cctcaatgct
 2401 gctcgtcgaa gatggctgct aaagcatgcc aatctgcagt ttcagaatca
 aagtcatgcg
 2461 gaaataatca gtgccagac tccgttgaaa atagtggttt tcattctcat
 ccccgctctg
 2521 aatgctgctc gtcgaagatg gctgctaaag cgtgccaatc tgcagtttca
 gaatcaaagt
 2581 catgtggaaa taatcagtgc ccagactccg ttgaaaatag tggttttcat
 tctcatcccc
 2641 gtctcaatg ctgttcatcg aagatggctg ctaaagcagg ccaatctgca
 ctttcagaat
 2701 caaagtcatg tggaaataac aattgctcag actccattca caagagtaat
 tgtcattctt
 2761 taactaactc tctagtatgt tcttccaaga tgtctgctcc acaatgtcat
 tctgctactt
 2821 caagcaacaa atcatgtgga agtaccaagt gctccgactt cagtgacaaa
 aaatggttgc
 2881 aatccgacaa aattcctcaa acgtgctcta ccaagaagtc tgctccagga
 tgtcaatctg
 2941 cagtttctgg gtctaaatca tgtggaaata gcaagtgttc agactcaaaa
 gacaatagta
 3001 gccatccttc acatcccgat catcaaacat gcatgtctaa gttgtgtgct
 ccacaaagcc
 3061 aatctgcaac ttcaagctcc aggacatgtg gaaatacaaa gtgctcggac
 accaatagca
 3121 agaattcttg ttattcacia accaactctg aatcatgctc ttcaaagatg
 tctggtccat
 3181 catgcaaaac tgctaattca ggttcaaggt catgcagaaa taagaagtgc
 caggactctg

041833

3241 caaccgagaa cagttttcat tcaccactta ctaatccact cagtggggaa
 aagctttcgg
 3301 agcagaaaag cttggattta gtccgaaaag ataaggaatc aagtcattgat
 cttcgtcatg
 3361 gctgctctga cgaggaacat gatcatacaa atttagacaa ggcatatgac
 agttgtgcct
 3421 tacaagaatg ttgttattcg gttcaaggca ataaaactga tgtatcagaa
 actggaatcc
 3481 aggaaactgc tcattgtgac agcaccaatc aaacatgcca aactgcaagt
 tcaggatcga
 3541 tgacatgagg aatgataag atcctggact ctctaagcat ccatggttgt
 cattcgcattg
 3601 ataatccact ccacgaggag aacaacttgg agcagaaaat cttggatggt
 gttggagaag
 3661 gtataaaatc acctcatgct gtcggtcatg gctgttcgga caaggaacac
 gatcactcac
 3721 atccagaaaa ggcatatgac agttgtgcaa cagatgattg ttgtttttca
 gttcaagtcc
 3781 atggcattga cgacgatca aaaagtgaaa ttcaagaaac tgctcattgt
 gacagcaca
 3841 agcagagcat ggtcatctcc agcagctgca aacatgaacc aaaagatcag
 gtaaatcact
 3901 gtggacttca ctctaaaact actccaactg atgaagaact agccaagctg
 gttagaagat
 3961 gctgcaaata caaacatgc cacgacgtcc gttctggctg caggaagcat
 gctgcagaat
 4021 gtggccaac cgttcgatca accatcaata tcttacggga caaccatcat
 cattacctag
 4081 actgcagtgg tcgtaagggt tggtcgtgtg tggagaagag acacatcggg
 ggatgctgtg
 4141 acagcttcag aaaagaatgt tgtgccaaga aaaaacacct tggagcaagt
 tttggaggag
 4201 gtttatcaga aattgtcata gagtagatgc aatccgaagt gtacat

SEQ ID NO:4

Полинуклеотидная последовательность АТФазы тяжелого металла
Nicotiana tabacum (NtHMA4.2), номер доступа в GenBank:

041833

HF937054.1.

1 atagaaagaa gagaatggtg gaaagtgaga aatgaatga cacaagaat
 ctgagcaaga
 61 gctatTTTTga tgTTTTggga atTTgctgta cttcagaagt tGttcttGtt
 gaaaaaattc
 121 tcaagaatct tgaagggtt aaagaggtt cagtaattgt cacaacaag
 actgtcattg
 181 ttattcatga ttctctctc atttctcagc acaaattgt taaagcattg
 aatcaagcaa
 241 gattagaagc aagtataaga gtgaaaggag agaaaaacta ccaaagaaa
 tggccaagtc
 301 catttgcaat tggcagtgga atattgcttg gactctcatt tttgaagtac
 ttttttgcac
 361 ctttccaatg gttagcactt gcagctgttg cagttgggat tcctccaatt
 attttaggg
 421 gtgtggctgc cgtgcgaaac ctactcttg acatcaacat tcttgTTTTa
 atagcagtga
 481 cgggatcaat tgTTTTacac gattattggg aagctggtac tattgtcttc
 ttattcacca
 541 ttgcagaatg gctagagtca agggcaagtc acaaggctac tgctgctatg
 tcatcactgg
 601 tcaatatagt ccctccaaca gcagttttag ctgaaagtgg agaagtcgta
 aatgttgatg
 661 aagtcaagtt gaatagcatt cttgctgTTa aagctggtga aactatacct
 attgatggag
 721 ttgtaatgga aggggaatgt gacgtggacg agaaaacact gacaggcgag
 tcgtttccag
 781 tttctaagca aatagattca acggtctggg ctggcactac aaatctaaat
 ggctatatca
 841 gtgttaagac tacggctttg gctgaagatt gtgcggtggc taggatggcg
 cagcttGtcg
 901 aagatgctca gaacaagaaa tcaaaaacc aaagatacat tgacaagtgt
 gctaaatatt
 961 atacaccagc aattgtggct atatcagctt ctttggcaat agttcctact
 gcattaagag
 1021 ttcacaatcg aatgagtgg tatcgcttg ctttggTcac gttggtgagt

gcatgtccgt
 1081 gtgcacttgt gctatctaca ccagttgcc a tgtgttgtgc actttctaaa
 gcagcaacgt
 1141 ccggtcttct gtttaaagga gcagagtacc ttgagactct tgctaaaatc
 aaaatcatgg
 1201 cttttgacaa aacagggact ataactagag gagaatttat ggtgaccgag
 ttcaagtctc
 1261 tggttgatgg tcttggctc aatacactgc ttactgggt ttcaagtatt
 gagagcaagt
 1321 caggtcatcc gatggcagcc gctctggtg actatgcaca atcaaattcc
 gttgagccaa
 1381 agcctgatag agttgagcag tttcaaaatt ttctggtga agggatattt
 ggaagaattg
 1441 atggaatgga aatctatgtc gggaatagga aaatttcttc aagagctgga
 gtactacag
 1501 taccagaaat agagggatg agtttccaag gaaagtctgt tggatacata
 tttttgggat
 1561 catctcccgc tggaaatttc ggtctttccg atgtttgtcg aattggtgta
 aaagaagcaa
 1621 tgagagagct gaagcagatg ggtatcaaaa ccgcgatgct tactggtgat
 gtttatgcag
 1681 ctgccaacca tgtgcaggat cagttagggtg gagctatgga tgaatttcaa
 gcggaactct
 1741 taccagagga caaggcaaca atcatcaagg gttttcagaa ggaagctcca
 acagcgatga
 1801 taggcgacgg ccttaatgat gctcctgcat tagcaacagc tgacattggc
 atctcaatgg
 1861 gcatctctgg gtcagctctc gcgaaagaaa caggccatgt tataactaatg
 acaaatgaca
 1921 tcggaagaat accaaaagct gcacgtcttg ctagaagagt tcgaaggaag
 attggtgaga
 1981 atatgattat atcagtcggt acaaaggccg ccatagttgc attggcaata
 gcaggttatc
 2041 cattggtttg ggctgctgtc ctcgcgata ctgggacatg cttgctagtg
 atcttgaaca
 2101 gcatgctact tctacgagta ggacacaca gacatgggaa aaaatgttgt

agatctgcta
 2161 ctctctcgca tgctcccaac cacaaagaca aagcttcttg ttgcaagtgc
 gaaaatgctc
 2221 cgcagctgtg ttgctctgat attgagtcac aaaagaaatg tacgagtcaa
 tcatgctcgt
 2281 ccgaggtgtg tgttccaaga tgtcaacctg tctcctcggg atcaaagtca
 tgtggaaata
 2341 atcagtgcc agactccgtt gaaaatagtg gttttcattc tcatccccgt
 cctcaatgct
 2401 gctcgtcgaa gatggcttct aaagcatgcc aatctgcagt ttcagaatca
 aagtcagtgt
 2461 gaaataatca gtgccagac tccgttgaaa atagtggttt tcatttcat
 ccccgccctc
 2521 aatgctgctc gtctaagatg gcttctaaag catgccaatc tgcagtttca
 gaatcaaagt
 2581 catgtggaaa taatcagtgc ccagactccg ttgaaaatag tggttttcat
 tctcatcccc
 2641 gtcctcaatg ctgctcgttg aagatggctt ctaaagcatg ccaatctgca
 gtttcagaat
 2701 caaagtcagt tggaaataat cagtgccag actccgttga aaatagtggg
 tttcattctc
 2761 atccccgtcc tcaatgctgc tcgtcgaaga tggttgctaa agcatgccaa
 tctgcagttt
 2821 cagaatcaaa gtcatgtgga aataacaatt gctcggagtc catttacaag
 agtagttgtc
 2881 attctttaac aagttctcta gtatgttctt ccaagatgct tgctccacaa
 tgtcattctg
 2941 ccaactcaag ctccaaatca tgtggaagta ccaagtgctc caacttcagt
 gacaaaaaat
 3001 gttgccaata tgacaaaatt cctcaaactg gctctaccaa gaagtctgct
 ccaggatgct
 3061 aatctgcagt ttctgggtct aaatcatgtg gagatagcaa gtgttcagac
 tcgaaagaca
 3121 atagtagcca tccttcacat cccgatcatc aaatatgac gtctaagttg
 tgtgctccac
 3181 aaagccaatc tgcaacttca agctccagga catgtggaaa tatgaagtgc

tcggacacca
 3241 atagcaagaa ttcttggtat tcacatacca actctgaatc atgctcttca
 aagatgtctg
 3301 gtccagcatg caaaactgct aattcaggtt caaggttatg cggaaataag
 aagtgcctag
 3361 actctgcaaa cgagaacagt tttcattcac ttactaatcc actctgtgag
 gaaaagcttt
 3421 tggagaagga aagcttgat ttagcccgaa aagatagga atcaaatcat
 gatcttagtc
 3481 atggttgctc tgacgaggaa catgatcatc taaatttaga caaggcacat
 gacagttgtg
 3541 ccttacaaga atgttggtat tctgttcaag gcaataaaac tgatgatca
 gaaactggaa
 3601 tccaggaagc tgctcattgt gacagcatca atcaaacatg ccaaactgca
 atttcaggat
 3661 caatgacatg cggaaataat aagagtctgg actctctaag catccatggt
 tgcattcac
 3721 atgatagtcc actccacaag gagagcaact tggagcagaa aagcttgat
 gttgctggag
 3781 aaggtataaa atcacctcat gctgtcggtc aaggctgttc ggacaaggag
 cacaatcact
 3841 cgcattccaga aaaggcgtat gacagttgtg caacagacga ttgttgtttt
 tcagttcaag
 3901 tccatggcat tgacgacgta tcaagaagtg aaattcaaga aactgctcat
 tgtgacagca
 3961 caaacagag cacggtcac cccagcagct gcgaacatga accaaaagat
 caggtaaatc
 4021 actgtggatc tcaactctaaa agtattccaa ctgatgaaga actagccaag
 ctggttagaa
 4081 gatgctgcaa atacaaacca tgccacgatg tccgctctgg ctgcaggaag
 catgctgcag
 4141 aatgtggtcc aaccgttcga tcaaccatca atatcttacg ggacaaccat
 catcatcatc
 4201 tagactgcag tggtcgtaag gtttgttcgc tgttgagaa gagacacatt
 ggtggatgct
 4261 gtgacagctt cagaaaagaa tgttgtgcca agaacaatca ccttgagca
 agttttggag
 4321 gaggtttatc agaaattgct atagagtaga tgcaatctga agtgtacata
 tgttgt

Таблица 1

Мутация	Наименование мутации (WO'913)	Уровень Cd в листе (ч./млн.)	% уменьшения уровня Cd по сравнению с контролем	Уровень Zn в листе (ч./млн.)	% уменьшения уровня Zn по сравнению с контролем
Контроль	E3-277-дикий тип	92,3 ± 26,5 (среднее значение ± SD, n=4)	-	92	
R529*, гомозиготная	E3-277 - мутант (HMA-DT R342*)	7,2 (среднее значение, n=2)	92%	62,3	32%
Контроль	BB16NN (контроль)	~560	-		
E387K, гомозиготная	276B5 (Hma-B E200K)	~160	~71%		
E387K, гомозиготная	276B8 (Hma-B E200K)	~250	~55%		
E387K, гомозиготная	276B18 (Hma-B E200K)	~250	~55%		
Контроль	277S (дикий тип)	525,0	-		
R529*, гетерозиготная	277Htz (HMA-DT R342*)	232,6	56%		
Контроль	425S (дикий тип)	207,0	-		
W265*, гомозиготная	425M (Hma-AS W78*)	36,1	83%		
Контроль	90S (дикий тип)	77,2	-		
L294F, гомозиготная	90M (HMA-AS L107F)	25,7	67%		

Обобщенное представление данных по уровням Cd и Zn в одиночных мутантах по HMA описано в WO 2012/041913A1. Наименование мутантов в WO'913 отличается от наименования мутанта в данном документе, и мутанты описаны в Hermand et al., 2014. Это происходит из-за неполной последовательности, которую применяли в WO'913. В первой колонке используется соответствующий стандарт наименования.

Таблица 2

Мутация	Уровень Cd в побегах (ч./млн.)	% уменьшения уровня Cd по сравнению с контролем	Уровень Zn (ч./млн.)	% уменьшения уровня Zn по сравнению с контролем
Контроль	~135	–	2300	–
P294S, миссенс	~50	63%	2900	0%
E387K, миссенс	~70	48%	1700	26%
W265*, нонсенс	~50	63%	1100	52%
G515R, миссенс	~70	48%	2000	13%
R259*, нонсенс	~60	56%	1500	35%

Обобщенное представление данных отмечено на фиг. 4а и с в Hermand et al. (2014) Metallomics. 6(8): 1427-1440.

Таблица 3. Полевое испытание 1 (участок с умеренным содержанием Cd).

Полевые данные по одиночным мутантам

Мутация	Контроль: уровень Cd в листе (ч./млн.)	Мутант: уровень Cd в листе (ч./млн.)	% уменьшения уровня Cd в мутантах по сравнению с контролем	р-значение	Контроль: уровень Zn в листе (ч./млн.)	Мутант: уровень Zn в листе (ч./млн.)	% уменьшения уровня Zn в мутантах по сравнению с контролем	р-значение
HMA4.1 W265*	0,91 ± 0,1	0,92 ± 0,13	0%	0,9731	19,2 ± 7,4	23,8 ± 6,3	0%	0,9906
HMA4.1 Q561*	0,87 ± 0,11	1 ± 0,09	0%	1,0000	18,6 ± 6,9	16,6 ± 4,7	11%	0,9983
HMA4.2 Q293*	0,85 ± 0,13	0,89 ± 0,12	0%	0,9997	18,9 ± 4,6	17,7 ± 3,7	6%	0,9115
HMA4.2 E296K	0,89 ± 0,07	0,92 ± 0,1	0%	0,9946	24,5 ± 15,8	13,4 ± 3,6	45%	0,1779
HMA4.2 T402I	0,87 ± 0,09	0,93 ± 0,15	0%	0,9984	21,9 ± 5,8	14,4 ± 1,6	34%	0,0557
HMA4.2 G251D	0,88 ± 0,15	0,93 ± 0,07	0%	0,9984	16 ± 3,9	15,1 ± 2,8	6%	0,9700
HMA4.2 G382R	0,93 ± 0,06	0,93 ± 0,09	0%	0,9995	14,8 ± 2,6	17,3 ± 5,7	0%	0,9840
HMA4.2 V351M	0,83 ± 0,11	0,95 ± 0,12	0%	0,9957	17,8 ± 5,4	14,2 ± 2	20%	0,6459

Значения уровней Cd/Zn (среднее значение ± стандартное отклонение) в объединенных образцах из опытных участков с гомозиготными одиночными мутантами и соответствующими им нуль-сегрегантными контрольными растениями, выращенными в ходе полевого эксперимента большого масштаба. % уменьшения уровня Cd/Zn рассчитывают по сравнению с контрольными значениями, р-значение (парный t-критерий) рассчитывают для определения вероятности того, что среднее значение (мутантная линия) случайным образом <0,8* среднее значение (контрольная линия). Для линий со значимым уменьшением уровня Cd/Zn >20% (p < 0,05) р-значения выделены жирным шрифтом. В полевом испытании для семи комбинаций мутаций выращивали соответствующих им одиночных мутантов, двойных мутантов и контрольные растения на шести дублируемых опытных участках (5 для Q293*/Q561*, 4 для E296/Q561* и 3 для Q293*/W265*). Каждая дублируемая единица содержит 10 растений двойных

мутантов, контроль НМА4 WT и два простых мутанта соответственно. Так как мутации Q293* и Q561* проявляются в нескольких комбинациях, данные для этих одиночных мутаций основываются на значениях 8 и 33 опытных участков соответственно. Одиночные мутантные растения не демонстрируют уменьшения биомассы (вес листа) по сравнению с контролем, что можно увидеть на фиг. 6.

Таблица 4. Полевое испытание 1 (участок с умеренным содержанием Cd).

Полевые данные двойных мутантов

Комбинация мутаций (НМА4.1 / НМА4.2)	Контроль : уровень Cd в листе (ч./млн.)	Мутант : уровень Cd в листе (ч./млн.)	% уменьшения уровня Cd в мутантах по сравнению с контролем	р-значение	Контроль : уровень Zn в листе (ч./млн.)	Мутант : уровень Zn в листе (ч./млн.)	% уменьшения уровня Zn в мутантах по сравнению с контролем	Р-значение
Q293*/Q561*	0,82 ± 0,15	0,058 ± 0,008	93%	0	18,6 ± 3	12,9 ± 5,1	31%	0,1204
Q293*/W265*	0,91 ± 0,1	0,069 ± 0,012	92%	0,0013	19,2 ± 7,4	21,6 ± 20	0%	0,6331
E296K/Q561*	0,89 ± 0,07	0,093 ± 0,104	90%	0,0054	24,5 ± 15,8	12,1 ± 4,7	51%	0,0377
T402I/Q561*	0,87 ± 0,09	0,042 ± 0,003	95%	0	21,9 ± 5,8	10 ± 1,9	54%	0,0043
G251D/Q561*	0,88 ± 0,15	0,59 ± 0,13	33%	0,1029	16 ± 3,9	14 ± 2,6	13%	0,9056
G382R/Q561*	0,93 ± 0,06	0,83 ± 0,07	11%	0,9993	14,8 ± 2,6	15,6 ± 4,3	0%	0,9990
V351M/Q561*	0,83 ± 0,11	0,91 ± 0,06	0%	0,9994	17,8 ± 5,4	18,7 ± 5,1	0%	0,9794

Значения уровней Cd/Zn (среднее значение ± стандартное отклонение) в объединенных образцах из опытных участков с гомозиготными двойными мутантами и соответствующими им нуль-сегрегантными контрольными растениями, выращенными в ходе полевого эксперимента большого масштаба. % уменьшения уровня Cd/Zn рассчитывают по сравнению с контрольными значениями, р-значение (парный t-критерий) рассчитывают для определения вероятности того, что среднее значение (мутантная линия) случайным образом <0,8* среднее значение (контрольная линия). Для линий со значимым уменьшением уровня Cd/Zn >20% (p<0,05) р-значения выделены жирным шрифтом. В полевом испытании засевают и подвергают анализу в отношении генотипа сегрегирующие семена из партий семи комбинаций мутаций. Для каждой комбинации мутаций выращивают четыре генотипические группы в шести дублируемых опытных участках (5 для Q293*/Q561*, 4 для E296/Q561* и 3 для Q293*/W265*). Каждая дублируемая единица содержит 10 растений двойных мутантов, контроль НМА4 WT и два простых мутанта соответственно. Данные по фенотипу (вес свежего листа) показаны на фиг. 6.

Таблица 5. Полевое испытание 2 (участок с умеренным содержанием Cd).

Полевые данные двойных мутантов

Комбинация мутаций (HMA4.1/HMA4.2)	Контроль : уровень Cd в листе (ч./млн.)	Мутант : уровень Cd в листе (ч./млн.)	% уменьшения уровня Cd в мутантах по сравнению с контролем	р-значение	Контроль : уровень Zn в листе (ч./млн.)	Мутант : уровень Zn в листе (ч./млн.)	% уменьшения уровня Zn в мутантах по сравнению с контролем	р-значение
Q293*/Q561*	0,61 ± 0,07	0,064 ± 0,021	89%	0	37,4 ± 5,5	13,7 ± 3,6	63%	0,0007
Q293*/W265*	0,49 ± 0,12	0,058 ± 0,005	88%	0,0007	33,5 ± 7,4	13,2 ± 1,7	61%	0,0151
Q464*/Q561*	0,66 ± 0,07	0,043 ± 0,003	94%	0	37,1 ± 7,5	9,4 ± 1,6	75%	0
Q293*/G235E	0,64 ± 0,06	0,04 ± 0	94%	0	33,7 ± 5,9	8,5 ± 1,8	75%	0
E296K/Q561*	0,61 ± 0,12	0,047 ± 0,018	92%	0	33,8 ± 6,9	10,7 ± 2,4	68%	0,0002
T402I/Q561*	0,71 ± 0,14	0,041 ± 0,002	94%	0	39,2 ± 5,3	9,3 ± 0,7	76%	0
G251D/Q561*	0,74 ± 0,13	0,22 ± 0,06	70%	0	34,5 ± 6,7	9,1 ± 1,1	74%	0,0002
Q293*/L223F	0,61 ± 0,11	0,38 ± 0,09	37%	0,0002	36,5 ± 5,6	25,4 ± 3,1	31%	0,0118
Q293*/D234N	0,47 ± 0,03	0,34 ± 0,05	27%	0,1494	30,5 ± 7,1	10,8 ± 0,8	65%	0,0072
A188V/Q561*	0,58 ± 0,06	0,48 ± 0,1	17%	0,5872	36,7 ± 6,5	34,9 ± 7,6	5%	0,9866
G382R/Q561*	0,65 ± 0,12	0,56 ± 0,07	14%	0,8572	36,8 ± 6,4	35,2 ± 5,8	4%	0,9997
Q293*/A369V	0,46 ± 0,04	0,4 ± 0,05	14%	0,9007	33,3 ± 4,3	32 ± 4,1	4%	0,9929
Q293*/A374V	0,47 ± 0,07	0,43 ± 0,06	9%	0,9645	36,5 ± 7,9	31,9 ± 4,8	12%	0,958
V351M/Q561*	0,66 ± 0,05	0,63 ± 0,06	6%	0,9823	34,1 ± 5,2	32,9 ± 4,7	4%	0,9999
T189I/Q561*	0,69 ± 0,09	0,67 ± 0,11	3%	0,9829	40,8 ± 4,4	45,3 ± 7,2	0%	1
Q293*/S27L	0,58 ± 0,09	0,61 ± 0,06	0%	0,9996	32,8 ± 5,2	34,8 ± 7,7	0%	0,9977
Q293*/A188V	0,48 ± 0,07	0,51 ± 0,08	0%	0,9999	30,6 ± 7,7	29,8 ± 3,4	3%	0,9761
G128E/Q561*	0,71 ± 0,08	0,85 ± 0,15	0%	0,9997	36,4 ± 7,4	31,1 ± 5,2	15%	0,9737

Значения уровней Cd/Zn (среднее значение ± стандартное отклонение) в объединенных образцах из опытных участков с гомозиготными двойными мутантами и соответствующими им нуль-сегрегантными контрольными растениями, выращенными в ходе полевого эксперимента большого масштаба. % уменьшения уровня Cd/Zn рассчитывают по сравнению с контрольными значениями, р-значение (парный t-критерий) рассчитывают для определения вероятности того, что среднее значение (мутантная линия) случайным образом <0,8* среднее значение (контрольная линия). Для линий со значимым уменьшением уровня Cd/Zn >20% (p<0,05) р-значения выделены жирным шрифтом. В полевом испытании для 18 комбинаций мутаций выращивали двойных мутантов и соответствующие им контрольные растения в шести дублируемых опытных участках (4 для Q293*/W265* и для Q293*/D234N). Каждая дублируемая единица содержит 20 растений двойных мутантов и контроль HMA4 WT соответственно. Данные по фенотипу (сухой вес листа) показаны на фиг. 7.

Таблица 6. Полевые данные полевых испытаний 3 и 4: участки с высоким содержанием Cd
Поле 3: участок 1 с высоким содержанием Cd

Комбинация мутаций (НМА4.1/НМА4.2)	Контроль : уровень Cd в листе (ч./млн.)	Мутант : уровень Cd в листе (ч./млн.)	% уменьшения уровня Cd в мутантах по сравнению с контролем	р-значение	Контроль : уровень Zn в листе (ч./млн.)	Мутант : уровень Zn в листе (ч./млн.)	% уменьшения уровня Zn в мутантах по сравнению с контролем	р-значение
Q293*/Q561*	3,05 ± 0,71	0,61 ± 0,24	80%	0,0003	94,8 ± 15,5	22,9 ± 5,7	76%	0,0000
Q293*/G235E	3,49 ± 0,79	0,58 ± 0,26	84%	0,0003	114,3 ± 19,1	21,8 ± 5,1	81%	0,0000
E296K/Q561*	3,09 ± 0,82	0,4 ± 0,19	87%	0,0001	112,7 ± 22,8	20,1 ± 4,5	82%	0,0000
T402I/Q561*	2,38 ± 0,8	0,47 ± 0,16	80%	0,0009	81,9 ± 9,7	20,8 ± 2,5	75%	0,0001
G251D/Q561*	2,89 ± 0,75	1,56 ± 0,38	46%	0,0014	107 ± 18,6	25,3 ± 4,6	76%	0,0000

Поле 4: участок 2 с высоким содержанием Cd

Комбинация мутаций (НМА4.1/НМА4.2)	Контроль : уровень Cd в листе (ч./млн.)	Мутант : уровень Cd в листе (ч./млн.)	% уменьшения уровня Cd в мутантах по сравнению с контролем	р-значение	Контроль : уровень Zn в листе (ч./млн.)	Мутант : уровень Zn в листе (ч./млн.)	% уменьшения уровня Zn в мутантах по сравнению с контролем	р-значение
			контролем				контролем	
Q293*/Q561*	2,65 ± 2,52	0,16 ± 0,08	94%	0,0068	32,1 ± 10,7	11,4 ± 1,1	65%	0,0303
Q293*/G235E	3,81 ± 2,88	0,18 ± 0,04	95%	0,0006	38 ± 8,2	12,3 ± 1,6	68%	0,0018
E296K/Q561*	2,9 ± 2,5	0,13 ± 0,02	96%	0,0009	36,3 ± 8,6	14,5 ± 1,6	60%	0,0052
T402I/Q561*	2,81 ± 1,98	0,27 ± 0,11	90%	0,0001	30,7 ± 9,2	16,4 ± 2,7	47%	0,0439
G251D/Q561*	4,01 ± 1,84	2,27 ± 0,97	43%	0,0056	38,8 ± 10,6	14,2 ± 1,8	63%	0,0107

Значения уровней Cd/Zn (среднее значение ± стандартное отклонение) объединенных образцов из опытных участков гомозиготных двойных мутантов и их нуль-сегрегантных контрольных растений, выращенных в ходе двух полевых экспериментов в участках с высоким содержанием кадмия. % уменьшения уровня Cd/Zn рассчитывают по сравнению с контрольными значениями. р-значение (парный t-критерий) рассчитывают для определения вероятности того, что среднее значение (мутантная линия) случайным образом <0,8* среднее значение (контрольная линия). Для линий со значимым уменьшением уровня Cd/Zn >20% (р<0,05) р-значения выделены жирным шрифтом. В полевом испытании для пяти комбинаций мутаций выращивали двойных мутантов и соответствующие им контрольные растения в пяти дублируемых опытных участках. Каждая дублируемая единица содержит 20 растений двойных мутантов и контроль НМА4 WT соответственно. Анализировали только опытные участки с приемлемым для мутанта и контроля показателем роста (5 опытных участков для большинства линий, за исключением: в поле 3: 4 опытных участка для T402I/Q561*; в поле 4: 4 опытных участка для G251D/Q561* и 3 опытных участка для Q293*/Q561*). Данные по фенотипу (вес подсушенного листа) показаны на фиг. 8.

Таблица 7

Аминокислотные остатки	Длина (аминокислот)	Описание
1-90	90	Цитоплазматическая N-концевая последовательность (HMA-домен)
91-112	22	Трансмембранный домен 1
113-115	3	Внеклеточная последовательность
116-135	20	Трансмембранный домен 2
136-142	7	Первая цитоплазматическая петля
143-163	21	Трансмембранный домен 3
164-164	1	Внеклеточная последовательность
165-183	21	Трансмембранный домен 4
186-311	126	Вторая цитоплазматическая петля (A-домен)
312-334	23	Трансмембранный домен 5
335-342	8	Внеклеточная последовательность
343-360	18	Трансмембранный домен 6
361-653	293	Третья цитоплазматическая петля (P-домен и N-домен)
654-673	20	Трансмембранный домен 7
674-677	4	Внеклеточная последовательность
678-697	20	Трансмембранный домен 8
698-1403 (HMA4.1) / 1444 (HMA4.2)	706 (HMA4.1) / 747 (HMA4.2)	Цитоплазматическая C-концевая последовательность

Доменная структура HMA4 была установлена с выравниваний последовательностей с белками HMA2 и HMA4 Arabidopsis и соответствующей им доменной аннотацией с помощью UniProt (AtHMA2: Q9SZW4; AtHMA4: 064474).

Таблица 8. Тепличные данные выбранных двойных мутантов

Комбинация мутаций	Уровень Cd в листе (ч./млн.)	% уменьшения уровня Cd по сравнению с контролем	Уровень Zn в листе (ч./млн.)	% уменьшения уровня Zn по сравнению с контролем
Контроль	0,66 ± 0,24	-	32,5 ± 12,1	-
Q293*/Q561*	0,059 ± 0,015	91%	10,7 ± 3,43	67%
E296K/Q561*	0,051 ± 0,003	92%	8,18 ± 2,61	75%
T402I/Q561*	0,077 ± 0,016	88%	7,99 ± 1,20	75%
G251D/Q561*	0,42 ± 0,12	37%	15,3 ± 13,2	53%
G382R/Q561*	0,55 ± 0,13	(17%)	22,5 ± 5,77	31%
V351M/Q561*	0,53 ± 0,15	(19%)	19,8 ± 4,60	39%

Значения уровней Cd/Zn (среднее значение \pm стандартное отклонение) восьми растений (шесть растений для Q293*/A374V), которые представляют собой гомозиготные двойные мутанты (мутации указаны как "гомозиготные мутации в НМА4.1/ гомозиготные мутации в НМА4.2") и нуль-сегрегантные контрольные растения всех двойных мутантов мутанты (всего 54 растения). % уменьшения уровня Cd/Zn рассчитывают по сравнению с контрольными значениями. Для того, чтобы сделать таблицу менее сложной, все 54 контрольные растения анализируют вместе в вышеприведенной таблице и значения уровня Cd/Zn опытных участков двойных мутантов сравнивают со всеми контрольными растениями. (Рассчитывают t-критерии, и значения в скобках не указывают на значимое уменьшение при $P < 0,05$.) Растения в данном эксперименте выращивают на больших опытных участках в теплице. Указаны морфология растения и урожай, проанализированные после четырех и одиннадцати недель роста в горшках.

Таблица 9. Тепличные данные дополнительно выбранных двойных мутантов

Комбинация Мутаций	Уровень Cd в листе (ч./млн.)	% уменьшения уровня Cd по сравнению с контролем	Уровень Zn в листе (ч./млн.)	% уменьшения уровня Zn по сравнению с контролем
Контроль	0,31 \pm 0,09	-	33,9 \pm 4,57	-
H438Y/W265*	0,13 \pm 0,06	58%	12,2 \pm 2,4	64%
L36F/Q561*	0,38 \pm 0,16	0%	28,8 \pm 5,34	15%

Значения уровней Cd/Zn в листе (среднее значение \pm стандартное отклонение 9 параллелей растений для H438Y/W265* и 6 параллелей растений для L36F/Q561*) двух дополнительных комбинаций гомозиготных мутантов по НМА4 (мутации указаны как "гомозиготные мутации в НМА4.1/ гомозиготные мутации в НМА4.2") и такого же числа нуль-сегрегантных контрольных растений для каждого двойного мутанта. % уменьшения уровня Cd/Zn рассчитывают по сравнению с контрольными значениями.

Таблица 10

Экзон	а/к измене ние	Показ атель WT SIFT	Показ атель Mut. SIFT	Показа тель SIFT/ WT SIFT	Экзон	а/к измене ние	Показ атель WT SIFT	Показ атель Mut. SIFT	Показа тель SIFT/ WT SIFT
HMA4.1- экз. 1	S16R	1	0,022	0,022	HMA4.2- экз. 1	M7I	0,377	0,359	0,954
HMA4.1- экз. 1	V30I	0,454	0,074	0,164	HMA4.2- экз. 1	D19N	1	0,008	0,008
HMA4.1- экз. 1	L36F	1	0,003	0,003	HMA4.2- экз. 1	S27L	1	0,018	0,018
HMA4.1- экз. 1	E44K	1	0,291	0,291	HMA4.2- экз. 1	L31F	1	0,028	0,028
HMA4.1- экз. 1	T50I	0,277	0,066	0,238	HMA4.2- экз. 1	L62F	1	0,033	0,033
HMA4.1- экз. 2	E78K	1	0,167	0,167	HMA4.2- экз. 2	G106E	0,513	0,238	0,465
HMA4.1- экз. 2	A98V	1	0,540	0,540	HMA4.2- экз. 2	L145F	1	0,165	0,165
HMA4.1- экз. 2	G128E	1	0,029	0,029	HMA4.2- экз. 4/5	A188V	1	0,003	0,003
HMA4.1- экз. 2	P130L	0,095	0,281	2,948	HMA4.2- экз. 4/5	P200L	1	0,005	0,005
HMA4.1- экз. 2	A138V	1	0,184	0,184	HMA4.2- экз. 4/5	S221N	0,545	0,096	0,176
HMA4.1- экз. 4/5	A188V	1	0,004	0,004	HMA4.2- экз. 4/5	L223F	1	0,019	0,019
HMA4.1- экз. 4/5	T189I	1	0,015	0,015	HMA4.2- экз. 4/5	A224V	1	0,152	0,152
HMA4.1- экз. 4/5	A191T	1	0,093	0,093	HMA4.2- экз. 4/5	D234N	1	0	0
HMA4.1- экз. 4/5	V217I	1	0,280	0,280	HMA4.2- экз. 4/5	G235E	1	0,001	0,001
HMA4.1- экз. 4/5	G251D	1	0	0	HMA4.2- экз. 4/5	G251D	1	0	0
HMA4.1- экз. 4/5	A266T	1	0,005	0,005	HMA4.2- экз. 4/5	W265*			Останов ка
HMA4.1- экз. 4/5	A287V	0,635	1	1,575	HMA4.2- экз. 6	P331T	0,120	0,038	0,318
HMA4.1- экз. 4/5	Q293*			Остано вка	HMA4.2- экз. 6	P331S	0,120	0,019	0,154
HMA4.1- экз. 4/5	E296K	1	0	0	HMA4.2- экз. 6	T349M	0,286	0,021	0,075
HMA4.1- экз. 4/5	C312Y	1	0,348	0,348	HMA4.2- экз. 6	V364V	1	0,089	0,089
HMA4.1- экз. 6	T349I	0,153	0,101	0,658	HMA4.2- экз. 6	A369V	1	0,001	0,001
HMA4.1- экз. 6	V351M	1	0,003	0,003	HMA4.2- экз. 6	A374V	1	0,008	0,008
HMA4.1- экз. 6	S376F	1	0,017	0,017	HMA4.2- экз. 6	G419D	0,583	1	1,715
HMA4.1- экз. 6	G382R	1	0,002	0,002	HMA4.2- экз. 7/8	S452F	1	0,005	0,005
HMA4.1- экз. 6	T402I	1	0	0	HMA4.2- экз. 7/8	D476Y	1	0,001	0,001
HMA4.1- экз. 6	E407K	1	0,340	0,340	HMA4.2- экз. 7/8	G506R	1	0,006	0,006
HMA4.1- экз. 7/8	S434N	1	0,018	0,018	HMA4.2- экз. 7/8	V509F	1	0,057	0,057
HMA4.1- экз. 7/8	G437S	0,161	1	6,219	HMA4.2- экз. 7/8	G510E	1	0,401	0,401
HMA4.1- экз. 7/8	H438Y	1	0	0	HMA4.2- экз. 7/8	P518S	0,459	0,187	0,407
HMA4.1- экз. 7/8	A448T	1	0,003	0,003	HMA4.2- экз. 7/8	A519V	1	0,562	0,562
HMA4.1- экз. 7/8	Q464*			Остано вка	HMA4.2- экз. 7/8	G523S	1	0,759	0,759
HMA4.1- экз. 7/8	R474K	0,366	1	2,731	HMA4.2- экз. 7/8	T546I	1	0,061	0,061
HMA4.1- экз. 7/8	M478I	0,243	0,028	0,117	HMA4.2- экз. 7/8	Q561*			Останов ка
HMA4.1- экз. 7/8	T494I	0,651	0,145	0,222					
HMA4.1- экз. 7/8	V496I	1	0,181	0,181					
HMA4.1- экз. 7/8	H559Y	1	0,429	0,429					

Список идентифицированных и подтвержденных мутаций в HMA4.1 и HMA4.2. Указаны аминокислотные изменения и соответствующие им показатели SIFT. Вызывающие интерес мутации выделены

жирным шрифтом (нонсенс-мутация или миссенс-мутация с показателем SIFT замененных а/к <0,05 исходного показателя SIFT).

Таблица 11. Примеры комбинаций мутаций, которые, как ожидается, снижают уровень содержания Cd в листе

Другие возможные комбинации	Мутация в НМА4.1	Мутация в НМА4.2
Комбинация 1	Q464*	W265*
Комбинация 2	Q464*	L223F
Комбинация 3	Q464*	D234N
Комбинация 4	Q464*	G235E
Комбинация 5	E296K	W265*
Комбинация 6	E296K	L223F
Комбинация 7	E296K	D234N
Комбинация 8	E296K	G235E
Комбинация 9	T402I	W265*
Комбинация 10	T402I	L223F
Комбинация 11	T402I	D234N
Комбинация 12	T402I	G235E
Комбинация 13	G251D	W265*
Комбинация 14	G251D	L223F
Комбинация 15	G251D	D234N
Комбинация 16	G251D	G235E
Комбинация 17	H438Y	Q561*
Комбинация 18	H438Y	L223F
Комбинация 19	H438Y	D234N
Комбинация 20	H438Y	G235E

Таблица 12. Примеры комбинаций мутаций, которые, как ожидается, снижают уровень содержания Cd в листе

Другие возможные комбинации	Мутация в НМА4.2	Мутация в НМА4.1
Комбинация 1	Q464*	W265*
Комбинация 2	Q464*	L223F
Комбинация 3	Q464*	D234N
Комбинация 4	Q464*	G235E
Комбинация 5	E296K	W265*
Комбинация 6	E296K	L223F
Комбинация 7	E296K	D234N
Комбинация 8	E296K	G235E
Комбинация 9	T402I	W265*
Комбинация 10	T402I	L223F
Комбинация 11	T402I	D234N
Комбинация 12	T402I	G235E
Комбинация 13	G251D	W265*
Комбинация 14	G251D	L223F
Комбинация 15	G251D	D234N
Комбинация 16	G251D	G235E
Комбинация 17	H438Y	Q561*
Комбинация 18	H438Y	L223F
Комбинация 19	H438Y	D234N
Комбинация 20	H438Y	G235E

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мутантное растение или его часть с уменьшенной экспрессией или активностью по меньшей мере двух АТФаз тяжелого металла (НМА) по меньшей мере на 10 % по сравнению с контрольным растением, где указанные две НМА содержат:

(i) полипептиды по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2;

(ii) полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, изложенные в (i); или

(iii) полинуклеотиды по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, кодирующие НМА;

где мутантное растение или его часть проявляет по меньшей мере 27% уменьшение, по сравнению с контрольным растением, накопления кадмия в листе, когда мутантное растение выращено в поле в присутствии кадмия.

(a) уменьшение экспрессии или активности двух АТФаз тяжелого металла (НМА) по меньшей мере на 10% по сравнению с контрольным растением, при этом указанные две НМА содержат:

(i) полипептиды по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2;

(ii) полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, изложенные в (i); или

(iii) полинуклеотиды по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, кодирующие НМА,

при этом уменьшение экспрессии или активности НМА осуществляют с помощью мутагенеза или редактирования генома;

(b) выращивание растения в поле; и

(c) идентификация растения, в котором содержание кадмия, имеющегося в нем, уменьшено по сравнению с контрольным растением, в котором экспрессия или активность НМА не были уменьшены, при этом растение или его часть проявляют по меньшей мере 27% уменьшение, по сравнению с контрольным растением, накопления кадмия в листе, когда растение выращивают в поле в присутствии кадмия; при этом фенотип мутантного растения или его части во время сбора является таким же, как у контрольного растения в такое же время сбора, при этом мутантное растение или его часть не демонстрируют уменьшения биомассы (например, веса листа) во время сбора по сравнению с контрольным растением в такое же время сбора.

8. Способ по п.7, в котором необязательно до стадии (c) осуществляют измерение содержания кадмия в растении, полученном на стадии (b).

9. Способ идентификации одного или более генетических изменений в выращенном в поле растении, которые коррелируют с уменьшенными уровнями кадмия в листе по меньшей мере на 27% по сравнению с выращенным в поле контрольным растением, которое не содержит одного или более генетических изменений, при этом указанный способ включает стадии:

(a) идентификация растения с уменьшенными по меньшей мере на 10% уровнями кадмия в листьях при выращивании в поле по сравнению с контрольным растением, выращенным в поле, при этом растение или его часть не демонстрируют уменьшения биомассы (например, веса листа) во время сбора по сравнению с контрольным растением в такое же время сбора;

(b) получение образца нуклеиновой кислоты из растения, идентифицированного на стадии (a); и

(c) идентификация в образце нуклеиновой кислоты из стадии (b) одного или более генетических изменений в полинуклеотидных последовательностях, кодирующих НМА по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с немутированными, представленными в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, или в полинуклеотидной последовательности по меньшей мере с 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

10. Способ по п.9, в котором необязательно на стадии (a) фенотип растения или его части во время сбора является таким же, как у контрольного растения в такое же время сбора.

11. Растительный материал, полученный из мутантного растения или его части по любому из пп.1-6 или из мутантного растения или его части, полученных с помощью способа по любому из пп.7-10, для изготовления табачных продуктов, при этом растительный материал является подсушенным или высушенным растительным материалом, при этом фенотип мутантного растения или его части во время сбора является таким же, как у контрольного растения в такое же время сбора, при этом мутантное растение или его часть не демонстрируют уменьшения биомассы (например, веса листа) во время сбора по сравнению с контрольным растением в такое же время сбора.

12. Способ получения растительного материала с уменьшенным накоплением кадмия в листе при выращивании в поле по сравнению с выращенным в поле контрольным растением, при этом указанный способ включает стадии:

(a) обеспечение мутантного растения или его части по любому из пп.1-6;

(b) выращивание растения в поле; и

(c) сбор растительного материала с растения, при этом фенотип мутантного растения или его части во время сбора является таким же, как у контрольного растения в такое же время сбора, при этом мутантное растение или его часть не демонстрируют уменьшения биомассы (например, веса листа) во время сбора по сравнению с контрольным растением в такое же время сбора.

13. Мутантное растение или его часть, полученные с помощью способа по п.9, для изготовления табачных продуктов, при этом фенотип мутантного растения или его части во время сбора является таким же, как у контрольного растения в такое же время сбора, при этом мутантное растение или его часть не демонстрируют уменьшения биомассы (например, веса листа) во время сбора по сравнению с контрольным растением в такое же время сбора.

14. Растительный материал для изготовления табачных продуктов, полученный из мутантного растения или его части по п.13.

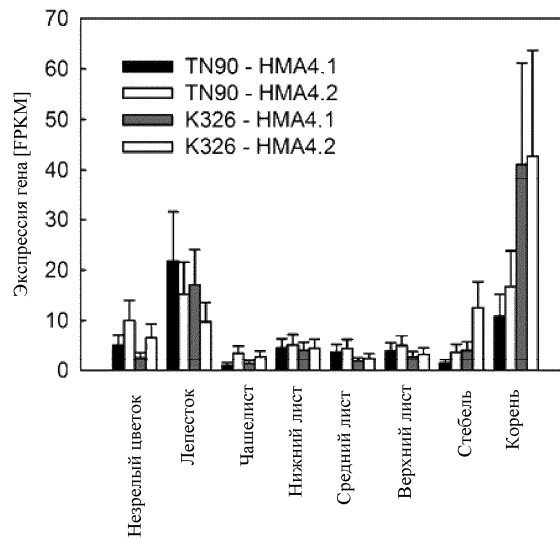
15. Растительный продукт для изготовления табачных продуктов, содержащий по меньшей мере часть мутантного растения или его части по любому из пп.1-6 или п.13 или растительный материал по п.11 или 14.

16. Табачный продукт, содержащий мутантное растение или его часть по любому из пп.1-6 или п.13, или растительный материал по п.11 или 14, или растительный продукт по п.15.

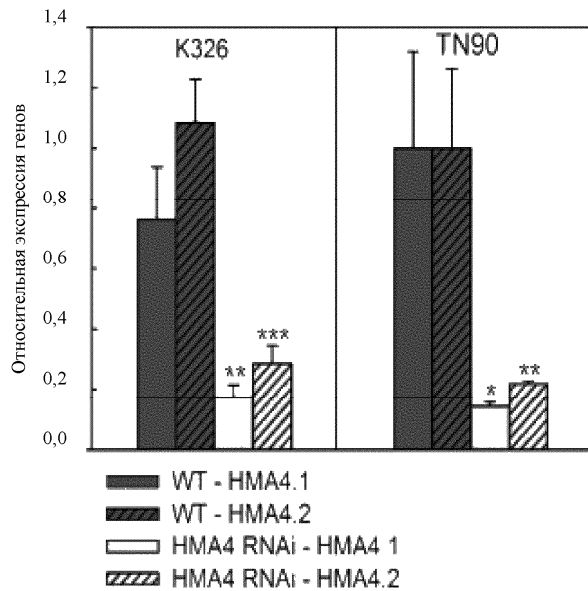
17. Курительное изделие, содержащее мутантное растение или его часть по любому из пп.1-6 или п.13, или растительный материал по п.11 или 14, или растительный продукт по п.15.

18. Потребительский продукт, содержащий мутантное растение или его часть по любому из пп.1-6 или п.13, или растительный материал по п.11 или 14, или растительный продукт по п.15, где потребительский продукт включает материалы, образующие аэрозоль и/или табачные продукты.

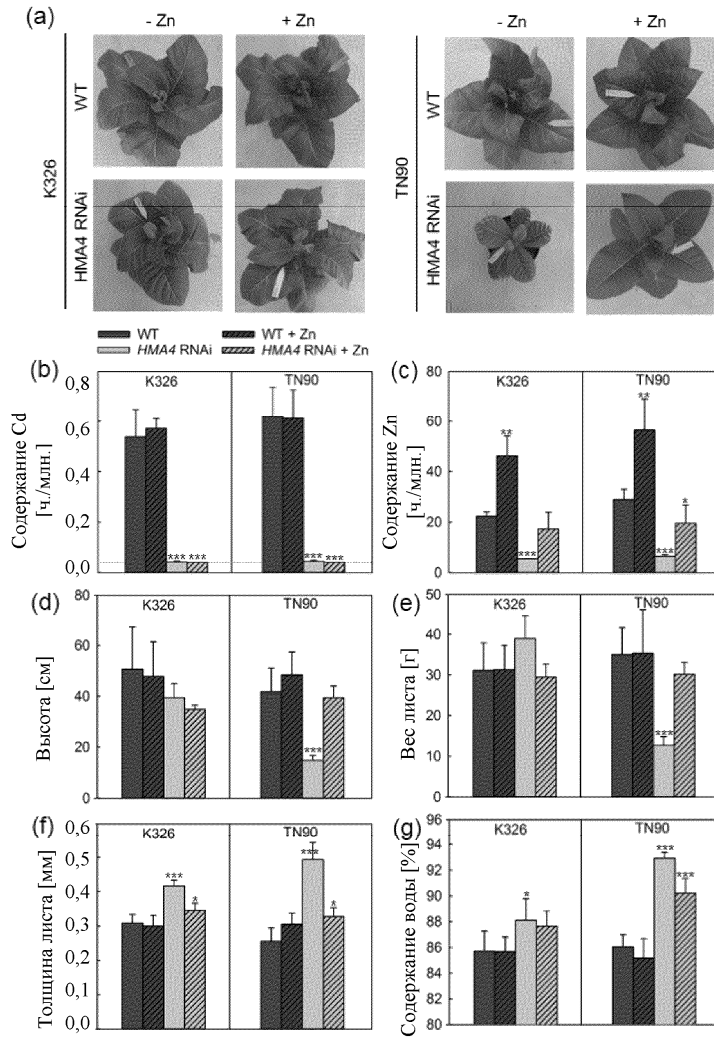
19. Потребительский продукт, содержащий мутантное растение или его часть по любому из пп.1-6 или п.13, или растительный материал по п.11 или 14, или растительный продукт по п.15, где потребительский продукт включает устройства, образующие аэрозоль, и/или курительные изделия.



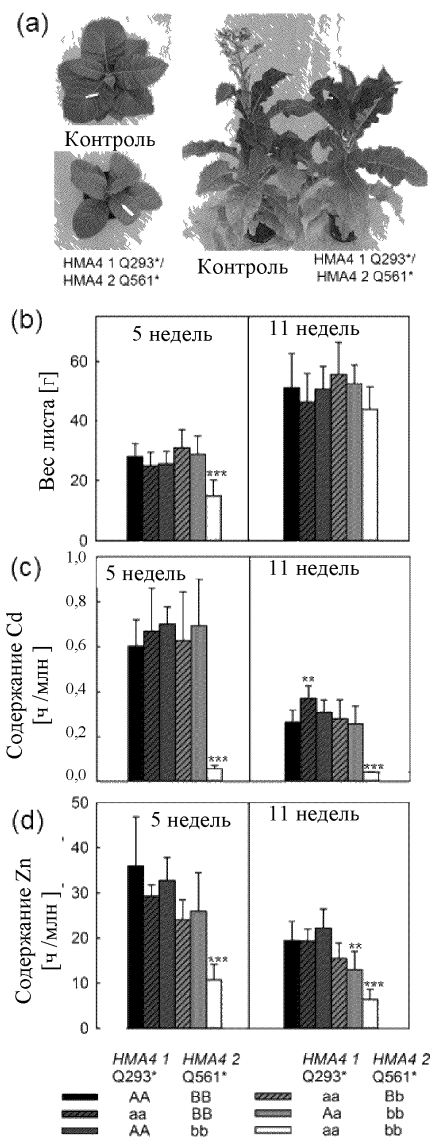
Фиг. 1



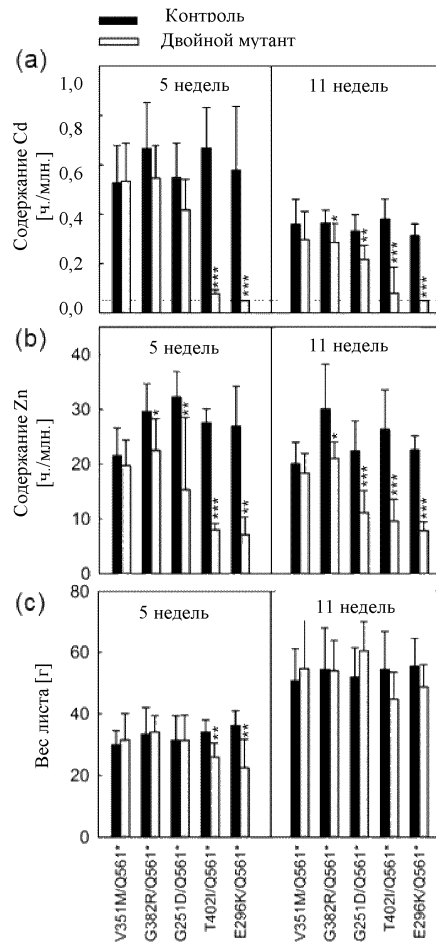
Фиг. 2



Фиг. 3

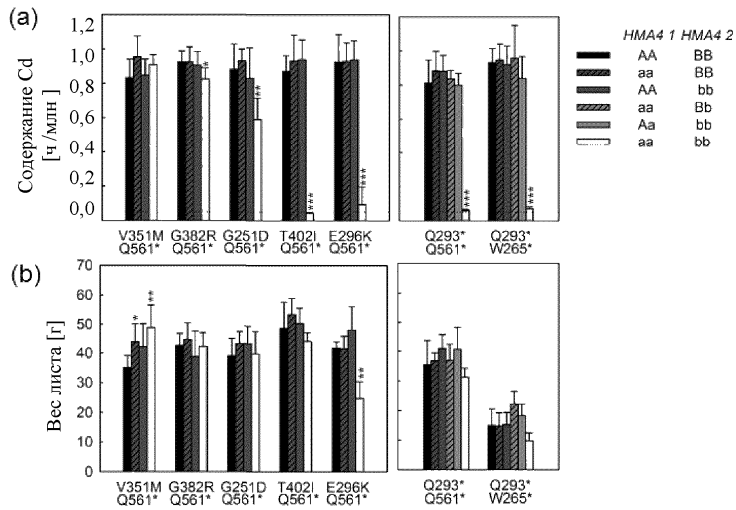


Фиг. 4

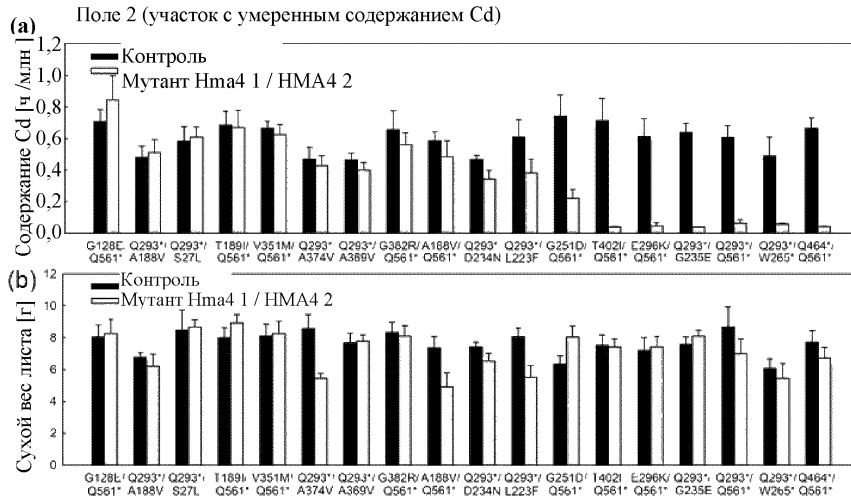


Фиг. 5

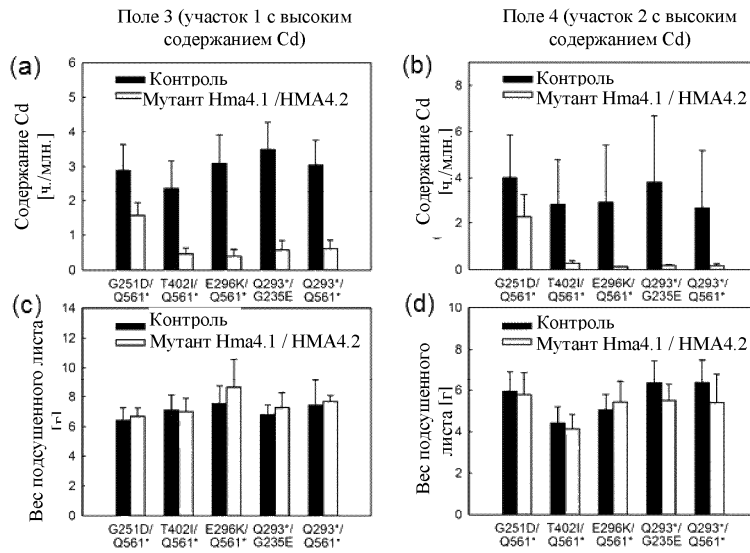
Поле 1 (участок с умеренным содержанием Cd)



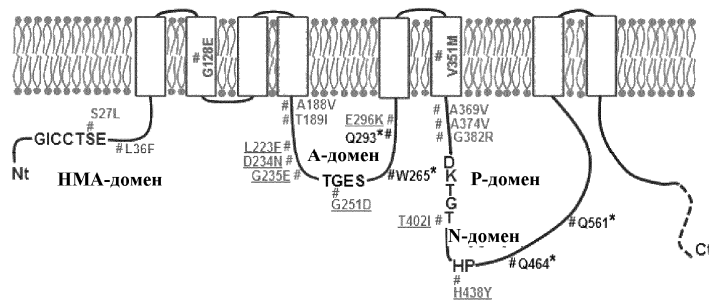
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

