

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491309 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.11.08

(51) Int. Cl. C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2023.01.05

(54) ВЛИЯНИЕ ФРУКТОЗЫ НА РАСТЕНИЯ И СВЯЗАННЫЙ С НЕЙ СИГНАЛИНГ

(31) 22150603.3

(32) 2022.01.07

(33) EP

(86) PCT/EP2023/050160

(87) WO 2023/131639 2023.07.13

(88) 2023.08.17

(71) Заявитель:

КВС СААТ СЕ ЭНД КО. КГАА;
ЗЮДЦУКЕР АГ (DE)

(72) Изобретатель:

Кхан Азкия, Неухаус Эккехард,
Поммерениг Бенджамин, Людвиг
Франк (DE)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение направлено на использование механизмов воздействия фруктозы и связанного с фруктозой сигналинга у растений для улучшения их свойств. В частности, изобретение относится к вектору или мобильному генетическому элементу, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, где указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует протонно-фруктозный симпортер тонопласта. Дополнительно изобретение относится к клетке-хозяину, растению, семени, способу получения растения, способу повышения выхода запасаемого вещества растения, способу повышения засухоустойчивости у растений, применению протонно-фруктозного симпортера тонопласта в растении для повышения концентрации запасаемого вещества растения или способу выбора растения с повышенным уровнем фруктозы.

A1

202491309

202491309

A1

ВЛИЯНИЕ ФРУКТОЗЫ НА РАСТЕНИЯ И СВЯЗАННЫЙ С НЕЙ СИГНАЛИНГ

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к обеспечению и созданию растений, обладающих
5 благоприятными характеристиками. В частности, изобретение относится к
обеспечению и созданию культурных растений, которые производят повышенное
количество биомассы и/или повышенное количество желаемого запасаемого вещества
(веществ) растения, например, сахаров, таких как сахароза, крахмала, липидов и/или
белков, и/или обладают повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям
10 окружающей среды, таким как засуха.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что повышение
концентрации фруктозы в цитозоле растения изменяет связанную с сахарами
передачу сигналов в растении, например, в листе растения, что приводит к изменению
транспорта на большие расстояния сахаров, таких как сахароза, во флоэме растения.
15 В частности, транспорт на большие расстояния в растении меняется таким образом,
что больше сахаров транспортируется из участков синтеза углеводов (источника)
растения к участкам хранения (резервуару) запасаемых веществ растения. В органах
растения, которые служат в качестве резервуара запасаемых веществ растения, такие
вещества могут превращаться в другие запасаемые вещества растения. Например,
20 сахара могут превращаться в крахмал или целлюлозу в органе растения. Запасаемые
вещества растения могут включать, но не ограничиваются указанными, сахара, такие
как сахароза, крахмал, белки и/или липиды. Кроме того, авторы изобретения
обнаружили, что повышение концентрации фруктозы в цитозоле растения, в
частности, в результате гиперэкспрессии протонно-фруктозного симпортера
25 тонопласта, например, EDRL4, приводит к повышению биомассы растения.

Наблюдения авторов изобретения дают веские основания предполагать, что
повышение уровня фруктозы в цитозоле может восприниматься растением в
различных его компартментах, приводя таким образом к изменению транспорта
сахаров на большие расстояния, что оказывает положительный эффект на продукцию
30 биомассы, засухоустойчивость и, в частности, накопление запасаемого (запасного)
вещества растения, например, сахарозы, в органах растения, таких как плод, семя,

корень или запасающий орган. Повышение количества сахарозы в компартментах запасаения сахарозы растения является, в частности, желаемым в случае культурных растений, таких как сахарная свекла. Соответственно, как будет очевидно специалисту в данной области техники, любой способ повышения концентрации фруктозы в цитозоле растения может применяться для достижения благоприятных эффектов, описанных в настоящей заявке.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно одному аспекту, изобретение относится к вектору или мобильному генетическому элементу, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, где указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует протонно-фруктозный симпортер тонопласта. В частности, молекула нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из: а) молекулы нуклеиновой кислоты, обладающей последовательностью, по меньшей мере на 50% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из любой из последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 40, 39, 1 и 129-152, б) молекулы нуклеиновой кислоты, обладающей последовательностью нуклеиновой кислоты, которая комплементарна или гибридизуется при жестких условиях с молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с а), и с) молекулы нуклеиновой кислоты, обладающей последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, обладающий аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 50% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из любой из последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 58, 57, 22 и 77-128.

Согласно дополнительному аспекту, изобретение включает клетку-хозяина, содержащую вектор или мобильный генетический элемент.

Изобретение также включает растение или часть растения, содержащую по меньшей мере одну клетку-хозяина, как описано в настоящей заявке. Растение согласно изобретению может быть генетически модифицированным. Растение может представлять собой трансгенное растение.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, предложено растение, где указанное растение было генетически модифицировано таким образом, что оно содержит повышенный уровень фруктозы в цитозоле по сравнению с

растением дикого типа, из которого оно получено. У растения согласно изобретению может наблюдаться гиперэкспрессия протонно-фруктозного симпортера тонопласта по сравнению с растением дикого типа, из которого оно получено.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, растение
5 согласно изобретению имеет следующие характеристики:

- i) растение содержит модифицированный промотор эндогенного гена, кодирующего гиперэкспрессирующийся протонно-фруктозный симпортер тонопласта таким образом, чтобы происходила гомологичная гиперэкспрессия указанного протонно-фруктозного симпортера тонопласта,
- 10 ii) растение содержит по меньшей мере одну дополнительную копию нуклеиновой кислоты, кодирующей гиперэкспрессирующийся протонно-фруктозный симпортер тонопласта, таким образом, чтобы происходила гомологичная гиперэкспрессия указанного протонно-фруктозного симпортера тонопласта, или
- 15 iii) растение содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный протонно-фруктозный симпортер тонопласта, таким образом, чтобы происходила гетерологичная гиперэкспрессия указанного протонно-фруктозного симпортера тонопласта.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, растение
20 содержит вектор или мобильный генетический элемент согласно изобретению. Вектор или мобильный генетический элемент может быть введен в растение, как описано в настоящей заявке и в цитированных ссылках, и любым другим способом, известным специалисту в данной области техники.

Изобретение также включает семя растения согласно изобретению. Семя может быть
25 посажено с получением растения согласно изобретению. Растение может быть выращено для решения технических проблем, описанных в настоящей заявке, например, для повышения выхода запасаемого вещества растения, для увеличения биомассы, для повышения концентрации запасаемого вещества растения по меньшей мере в одном органе растения или для повышения засухоустойчивости растения.

Согласно дополнительному аспекту, изобретение включает способ получения растения, включающий следующие этапы: а) генетическое модифицирование по меньшей мере одной клетки растения таким образом, чтобы была получена по меньшей мере одна клетка растения, которая содержит повышенный уровень
5 фруктозы в цитозоле по сравнению с клеткой растения дикого типа, из которой она получена; и б) восстановление растения из генетически модифицированной клетки растения из этапа а), где указанное растение содержит повышенный уровень фруктозы в цитозоле по сравнению с растением дикого типа, из которого оно получено.

10 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, генетическое модифицирование по меньшей мере одной клетки растения, например, на этапе а), включает:

i) модифицирование промотора эндогенного гена, кодирующего протонно-фруктозный симпортер тонопласта, таким образом, чтобы происходила
15 гиперэкспрессия указанного протонно-фруктозного симпортера тонопласта,

ii) введение в клетку растения по меньшей мере одной дополнительной копии нуклеиновой кислоты, кодирующей протонно-фруктозный симпортер тонопласта, таким образом, чтобы происходила гомологичная гиперэкспрессия указанного протонно-фруктозного симпортера тонопласта, или

20 iii) введение в клетку растения гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей гетерологичный протонно-фруктозный симпортер тонопласта, таким образом, чтобы происходила гетерологичная гиперэкспрессия указанного протонно-фруктозного симпортера тонопласта.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, вектор или
25 мобильный генетический элемент согласно изобретению вводят по меньшей мере в одну клетку растения.

Изобретение также включает способ повышения выхода запасаемого вещества растения, включающий повышение концентрации фруктозы в цитозоле растения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, растение,
30 которое производит запасаемое вещество растения, получают, как описано в настоящей заявке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

изобретения, растение, которое производит запасаемое вещество растения, представляет собой растение, описанное в настоящей заявке. Концентрация фруктозы в цитозоле растения может быть повышена, как описано в настоящей заявке.

5 Запасаемое вещество растения может быть выбрано из сахара, предпочтительно сахарозы, крахмала, белка или липида. В частности, сахар может представлять собой сахар, присутствующий в сахарной свекле, сое или плоде томата, липид может представлять собой липид, присутствующий в семени подсолнечника или масличного рапса, белок может представлять собой белок, присутствующий в сое. Предпочтительно, запасаемое вещество растения представляет собой сахарозу.

10 Способ повышения выхода запасаемого вещества растения может включать следующие характеристики:

i) повышается биомасса по меньшей мере одного органа растения, который содержит запасаемое вещество растения, где указанный орган растения предпочтительно представляет собой плод, семя, корень или запасующий орган; или

15

ii) повышается концентрация запасаемого вещества растения по меньшей мере в одном органе растения, где указанный орган растения предпочтительно представляет собой плод, семя, корень или запасующий орган.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, выход запасаемого вещества растения повышают путем увеличения биомассы по меньшей мере одного органа растения, такого как плод, семя, корень или запасующий орган.

20

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, выход запасаемого вещества растения повышают путем увеличения концентрации запасаемого вещества растения по меньшей мере в одном органе растения, таком как плод, семя, корень или запасующий орган.

25

Согласно дополнительному аспекту, изобретение обеспечивает способ повышения засухоустойчивости у растений, включающий повышение концентрации фруктозы в цитозоле растения. Способ может включать следующие пункты:

i) растение, которое обладает повышенной засухоустойчивостью, получают в соответствии со способами согласно изобретению; и/или

30

ii) растение, которое обладает повышенной засухоустойчивостью, представляет собой растение согласно изобретению.

Растение может представлять собой культурное растение. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, растение выбрано из группы, состоящей из сахарной свеклы (*Beta vulgaris*), капусты (*Brassica rapa*), масличного рапса (*Brassica napus*), подсолнечника (*Helianthus annuus*), картофеля (*Solanum tuberosum*), кукурузы (*Zea mays*), риса (*Oryza* sp., например, *Oryza sativa*), ячменя (*Hordeum vulgare*), ржи (*Secale cereale*) или сорго (*Sorghum* sp., например, *Sorghum bicolor*), предпочтительно растение представляет собой сахарную свеклу.

10 Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения, растение представляет собой сахарную свеклу, орган растения представляет собой стержневой корень сахарной свеклы, и запасаемое вещество растения представляет собой сахарозу.

Изобретение также обеспечивает применение протонно-фруктозного симпортера тонопласта в растении для повышения концентрации запасаемого вещества растения в органе растения, где указанное запасаемое вещество растения необязательно выбрано из сахара, предпочтительно сахарозы, крахмала, белка или липида и растение выбрано из группы, состоящей из сахарной свеклы (*Beta vulgaris*), капусты (*Brassica rapa*), масличного рапса (*Brassica napus*), подсолнечника (*Helianthus annuus*), картофеля (*Solanum tuberosum*), кукурузы (*Zea mays*), риса (*Oryza* sp., например *Oryza sativa*), ячменя (*Hordeum vulgare*), ржи (*Secale cereale*) или сорго (*Sorghum* sp., например *Sorghum bicolor*), предпочтительно растение представляет собой сахарную свеклу, и орган растения представляет собой стержневой корень сахарной свеклы.

Изобретение также обеспечивает способ выбора растения с повышенным уровнем фруктозы в цитозоле указанного растения, включающий этапы:

i) выращивания растения;

ii) измерения уровня фруктозы по меньшей мере в одной клетке растения;

iii) сравнения измеренного уровня фруктозы по меньшей мере с одним референсным уровнем фруктозы; и

iv) выбора растения с повышенным уровнем фруктозы по сравнению по меньшей мере с одним референсными уровнем.

Референсный уровень может представлять собой уровень фруктозы в цитозоле референсного растения. Референсное растение может представлять собой растение, из которого получено указанное растение. Референсное растение может представлять собой растение того же вида. Например, референсное растение может представлять собой растение дикого типа, из которого получено указанное растение, если оно было генетически модифицировано. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, растение представляет собой растение согласно изобретению, например, содержащее вектор или генетический элемент, как описано в настоящей заявке. В растении может также наблюдаться гиперэкспрессия протонно-фруктозного симпортера тонопласта, как описано в настоящей заявке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, референсный уровень фруктозы определяется в том же органе растения и/или том же типе клеток растения.

15 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1. Филогенетическое дерево семейства транспортеров MST (Фигура 1A). Фигура взята из источника Rommengenig et al. (2018). Филогенетическое дерево из 53 белков семейства MST растения *Arabidopsis* на основе их нуклеотидных последовательностей. Числа около узлов показывают значения поддержки. Показаны только значения <100. Для подсемейств MST использовали следующие аббревиатуры: PMT (POLYOL MONOSACCHARIDE TRANSPORTERs) – транспортеры полиолмоносахаридов; VGTs (VACUOLAR GLUCOSE TRANSPORTERs) – вакуолярные глюкозные транспортеры; TSTs (TONOPLAST SUGAR TRANSPORTERs) – сахарные транспортеры тонопласта; ERDLs (EARLY-RESPONSE TO DEHYDRATION SIX-LIKE PRONEINS) – SIX-подобные белки раннего ответа на дегидратацию; STPs (SUGAR TRANSPORTERs) – сахарные транспортеры; pHTs (PLASTIDIC HEXOSE TRANSPORTERs) – гексозные транспортеры пластид; INTs (INOSITOL TRANSPORTERs) – транспортеры инозитола. Названия отдельных транспортных белков приведены вместе с их идентификатором для *Arabidopsis* (в круглых скобках). Буквы за пределами круга указывают на внутриклеточную локализацию белков: PM – плазматическая мембрана; T – тонопласт; C – хлоропласт; G – аппарат Гольджи. Звездочки указывают на предсказанную локализацию в хлоропласте благодаря идентификации хлоропласт-транзиторных пептидных

последовательностей (ChloroP 1.1; Emanuelsson et al. 1999). Буквы в круглых скобках указывают на предполагаемую локализацию, например, когда локализация была показана в гетерологичных системах. Вопросительные знаки указывают на неизвестную внутриклеточную локализацию. Для каждого подсемейства
5 перечислены исследованные и предполагаемые субстраты транспорта. Более крупный размер шрифта указывает на более высокую аффинность членов подсемейств в отношении субстрата. Нуклеотидные последовательности MST были получены из базы данных ARAMEMNON (Schwacke et al. 2003). Множественное выравнивание последовательностей для всех последовательностей MST было выполнено с
10 использованием программы Clustal Omega (Sievers et al. 2011). Байесовский филогенетический анализ осуществляли с помощью программы MrBayes версии 3.2.6 (Ronquist и Huelsenbeck 2003) с использованием модели HKY + I + G. Анализ с помощью MrBayes осуществляли путем проведения двух параллельных анализов на основе сопряженного с алгоритмом Метрополиса метода Монте-Карло с марковскими
15 цепями с использованием четырех цепей для 2 миллионов генераций. SD разделения частот составляло <0,01. Деревья из файла визуализировали с использованием программы FigTree v.1.4.3. На Фигуре 1В показана крупным планом часть, включающая ген AtERDL4.

Фигура 2. Расположение в тонопласте белка N-концевого слияния ERDL4 с GFP. А-
20 F) Конфокальные изображения протопластов растительной ткани табака, трансформированного конструктом PromoterUBQ10-ERDL4-GFP. Масштабные линейки представляют собой 10 мкм А-F) Изображения протопласта табака, экспрессирующего белок слияния ERDL4-GFP. Показаны изображения одного и того же протопласта, полученные с помощью различных конфокальных каналов. А) Светлопольное изображение, В) вызванная хлорофиллом автофлуоресценция, указывающая на положение хлоропластов (сферы), С) вызванная GFP флуоресценция, указывающая на положение белка слияния ERDL4-GFP, D) наложение флуоресценции от хлорофилла и GFP. Е и F) изображения лизированного протопласта, проявляющего флуоресценцию ERDL4-GFP, Е) вызванная GFP
25 флуоресценция в вакуолярной мембране (тонопласт), F) наложение флуоресценции от GFP и светлопольного изображения. Белые треугольники на С-F указывают на тонопласт. G) Схематичное изображение 2D структуры белка ERDL4, слитого с GFP на С-конце белка ERDL4. Различные номера в структуре белка указывают на разные
30

трансмембранные спирали в белке ERDL4. Черные треугольники указывают на предсказанные сайты фосфорилирования – остатки серина или треонина.

Фигура 3. Схематичное изображение расположения ERDL4 и его предполагаемой функции. TST2- и VGT1/2-зависимый транспорт сахаров глюкозы (glc), фруктозы (frc) и сахарозы (suc) стимулируется фруктозой в цитозоле. Вакуолярная frc, полученная в результате импорта через TST или в результате гидролиза вакуолярной suc, транспортируется через ERDL4 в цитозоль и возбуждает активность TST2 и VGT1/2 (указано с помощью звездочек над схематичными изображениями транспортеров TST2 и VGT1/2). Благодаря высокой специфичности ERDL4 в отношении frc в вакуолях накапливается высокая суммарная концентрация suc и glc, но не frc.

Фигура 4. Фенотипы и сырая масса различных erdl4-мутантов и растений с гиперэкспрессией ERDL4. А) Фенотипы четырехнедельных растений WT, 35S-ERDL4 и растений с нокаутом erdl4, выращенных в почвенном субстрате в условиях короткого дня. В) Количественная оценка биомассы побега на основе сырой массы растений, изображенных на рисунке (А). Столбики показывают среднее от n=12 независимых растений \pm SE. Звездочки указывают значимые различия по сравнению с WT в соответствии с t-критерием Стьюдента (* $p < 0,05$).

Фигура 5. Характеристика параметров корней различных erdl4-мутантов и растений с гиперэкспрессией ERDL4. А) Примеры изображений розеток и корней от 5-недельных растений WT, 35S-ERDL4 и растений с нокаутом erdl4, выращенных в гидропонной культуре. Растения с гиперэкспрессией ERDL4 имеют более длинные корни с более высокой биомассой. В) Сухая биомасса корней растений, изображенных на рисунке (А). Столбики показывают среднее от n=6 корней \pm SE. Звездочки указывают на значимые различия по сравнению с WT в соответствии с t-критерием Стьюдента. С) Длина первичных корней от растений WT и 35S-ERDL4, измеренная в течение временного периода, составляющего шесть дней.

Фигура 6. Масса тысячи семян повышена у растений с гиперэкспрессией ERDL4. Масса 1000 семян для сухих зрелых семян растений WT, мутантов с нокаутом erdl4 и растений с гиперэкспрессией ERDL4. Столбики представляют собой среднее значение массы 1000 семян от n=6 растений на линию. Звездочки указывают на значимые различия в соответствии с t-критерием Стьюдента (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Фигура 7. Содержание липидов в семенах для сухих зрелых семян мутантов с нокаутом *erd14* и растений с гиперэкспрессией ERDL4. Столбики представляют собой среднее от $n=6$ растений на линию. Звездочки указывают на значимые различия в соответствии с t-критерием Стьюдента (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

5 **Фигура 8.** Повышенный ток сахаров во флоэме в отсоединенных листьях растений с гиперэкспрессией ERDL4. Сахар измеряли как эквиваленты гексозы в экссудатах флоэмы, собранных из отсоединенных листьев пятидневных растений WT, 35S-ERDL4 и растений с нокаутом по *erd14*. Столбики представляют собой среднее от по меньшей мере $n=12$ листьев \pm SE. Звездочки указывают на значимые различия по сравнению с WT в соответствии с t-критерием Стьюдента.

Фигура 9. Общее и внутриклеточное накопление сахара в растениях WT, растениях с гиперэкспрессией ERDL4 и мутантных растениях. А) Содержание глюкозы (glc), фруктозы (frc), сахарозы (suc) в побегах. В-D) Внутриклеточное содержание глюкозы (В), фруктозы (С), сахарозы (D) в вакуолях, хлоропластах и цитозольной фракции побегов растений WT, растений с гиперэкспрессией ERDL4 и мутантных растений, полученных с помощью безводного фракционирования. Столбики представляют собой среднее от $n=5$ растений \pm SE. Различные буквы над столбиками обозначают значимые различия в соответствии с однофакторным дисперсионным анализом с апостериорным критерием Тьюки ($p < 0,05$). nd = не выявлено поддающегося количественному определению количества.

Фигура 10. Фруктоза повышает экспрессию СРК6, которая также повышена в линиях с гиперэкспрессией ERDL4. А) Относительная экспрессия СРК6 (*At4g30960*) и TST2 (*At4g35300*) в ответ на различные сахара или маннит. Обработку сахарами осуществляли путем инкубации листовых дисков, вырезанных из исходных листьев *Arabidopsis thaliana*, в разбавленной вдвое MS-среде с добавлением или без добавления (контроль) соответствующего 2% сахара или маннита. Экспрессию количественно оценивали с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией и нормировали к экспрессии *AtACT2*. В) Относительная экспрессия СРК6 (*At4g30960*) в растениях WT и двух линиях 35S-ERDL4. А-В) Столбики обозначают среднее от $n=4$ повторов \pm SE. Звездочки указывают на значимые различия в соответствии с t-критерием Стьюдента (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,001$).

Фигура 11. Кинетика содержания сахаров при акклиматизации и деакклиматизации к холоду в листьях *Arabidopsis thaliana*. Зависимость от времени регистрировали для линии Col-0, мутанта с двойным нокаутом *tst1-2* и двух линий с гиперэкспрессией *BvIMP2* (=BvERDL4;2) при холодовом стрессе (4°C) и деакклиматизации (20°C). А) Содержание глюкозы, В) содержание фруктозы, С) содержание сахарозы. Каждая временная точка представляет собой среднее значение по меньшей мере от трех растений на линию. Планки погрешностей показывают SE. Звездочки обозначают значимые изменения для линий с гиперэкспрессией *BvIMP2* по сравнению с WT в данной точке времени. Разные цвета звездочек указывают на принадлежность соответствующей линии (серый = *BvIMP2* OX1, черный = *BvIMP2* OX2).

Фигура 12. Сырая масса растений, выращенных в контрольных условиях и в условиях засухи. Линию *Arabidopsis thaliana* Col-0 (Wt, контроль), две линии с гиперэкспрессией *ERDL4* (Oex1, Oex2) и линии с нокаутом *erdl4* (KO 1, KO2) подвергали стрессу, вызванному засухой, на основе полевой влагоемкости (field capacity, FC) почвенного субстрата: (А) 100% FC = контроль, условия с хорошим водоснабжением; (В) 60% FC = умеренный стресс, вызванный засухой, (С) 40% FC = сильный стресс, вызванный засухой. Растения подвергали стрессу через семь дней роста при 100% FC и растили при соответствующих значениях FC в течение 3,5 недель. Столбики представляют собой среднее по меньшей мере от n=6 растений ± SE. Звездочки обозначают значимые различия по сравнению с WT в соответствии с t-критерием Стьюдента (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,001$).

Фигура 13. Диаграмма Венна и корреляционный анализ между дифференциально экспрессирующимися генами (differentially expressed genes, DEGs) от растений с гиперэкспрессией *ERDL4* и растений WT и от инкубированных с фруктозой (Frc) или глюкозой (Glc) и маннитом (Man = контроль) листовых дисков. А) и С) показывают диаграммы Венна для DEGs. Числа в кружках представляют собой количество DEGs (значимость при $p < 0,001$ в соответствии с двусторонним t-критерием от трех повторов). Было обнаружено 484 35S-*ERDL4*-зависимых DEGs, 4340 Frc-зависимых DEGs и 5148 Glc-зависимых DEGs. А) Диаграмма, показывающая перекрытие DEGs от растений 35S-*ERDL4* и листовых дисков, обработанных Frc. Было обнаружено 130 DEGs, регулируемых как гиперэкспрессией *ERDL4*, так и Frc. В) Корреляция между относительной экспрессией (на основе \log_2 -кратного изменения) 130 DEGs для 35S-*ERDL4* (по сравнению с WT) и Frc (по сравнению с Man). $r =$

коэффициент Пирсона, рассчитанный для матриц ERDL4/WT и Frc/Man. C) Диаграмма, показывающая перекрытие DEGs от растений 35S-ERDL4 и листовых дисков, обработанных Glc. Было обнаружено 155 DEGs, регулируемых как гиперэкспрессией ERDL4, так и Glc. D) Корреляция между относительной экспрессией (на основе \log_2 -кратного изменения) 155 DEGs для 35S-ERDL4 (по сравнению с WT) и Glc (по сравнению с Man). r = коэффициент Пирсона, рассчитанный для матриц ERDL4/WT и Glc/Man.

Фигура 14. На Фигуре 14 изображена геномная последовательность гена ERDL4 *Beta vulgaris* (BvERDL4 ;2 (BvIMP2; Bv6_128840_qhip.t1), SEQ ID NO:76). Промоторный участок изображен курсивом, участки 5'-UTR и 3'-UTR выделены полужирным шрифтом, CDS-участки подчеркнуты.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Все публикации, включая, но не ограничиваясь патентами, патентными заявками и научными публикациями, цитированными в данном описании, включены в настоящую заявку посредством ссылки для всех целей, как если бы было конкретно и отдельно указано, что каждая отдельная публикация включена посредством ссылки.

Если иное не указано, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют значение, обычно используемое специалистом в данной области техники.

При использовании в настоящей заявке предполагается, что употребление предметов в единственном числе включает также множественное число указанных предметов, если иное явно не следует из контекста.

При использовании в настоящей заявке «и/или» включает и относится к любым и всем возможным комбинациям одного или более из связанных перечисленных пунктов, в также отсутствию указанных комбинаций при интерпретации в альтернативном варианте («или»).

Использование термина «содержащий», а также других грамматических форм, таких как «содержит» и «содержащийся», не является ограничивающим. Следует понимать, что термины «содержащий», «содержит» и «содержащийся» относятся к открытому описанию варианта реализации настоящего изобретения, который может, но не

должен включать дополнительные технические характеристики помимо четко обозначенных технических характеристик. Таким же образом, термин «вовлекающий», а также другие соответствующие грамматические формы, такие как «вовлекает» и «вовлеченный», не являются ограничивающими. То же самое применимо для термина «включающий» и других грамматических форм, таких как «включает» и «включенный».

Заголовки разделов на протяжении описания приведены исключительно для организации. В частности, предполагается, что они не ограничивают различные варианты реализации, описанные в настоящей заявке. Следует понимать, что варианты реализации (и описанные в них признаки), описанные под одним подзаголовком, можно свободно объединять с вариантами реализации (и описанными в них признаками), описанными под другим подзаголовком.

Кроме того, термины «содержащий», «вовлекающий» и «включающий» и их любые грамматические формы не следует интерпретировать как относящиеся исключительно к вариантам реализации, включающим непосредственно перечисленные дополнительные признаки. Указанные термины в равной степени относятся к вариантам реализации, которые состоят только из тех признаков, которые непосредственно указаны.

При использовании в настоящей заявке термин «нуклеиновая кислота» относится к олигомеру или полимеру встречающихся в природе или модифицированных нуклеотидов. Нуклеиновая кислота может также содержать нуклеотидные замены по сравнению с референсной последовательностью. Например, нуклеиновая кислота может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидных замен. Нуклеиновая кислота может обладать последовательностью, на 100 %, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% или 50% идентичной референсной последовательности. Референсная последовательность может представлять собой нуклеиновую кислоту с последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 152. Нуклеиновая кислота может представлять собой рибонуклеиновую кислоту (РНК) или дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или гибрид РНК и ДНК. Нуклеиновая кислота может быть одно- или двуцепочечной. Двуцепочечная нуклеиновая кислота может представлять собой РНК-РНК, РНК-ДНК (гибрид) или ДНК-ДНК. Образование двуцепочечной молекулы происходит, например, с помощью водородных связей в соответствии со спариванием оснований по Уотсону-Крику. Нуклеиновая кислота

может содержать один или два 3'-липких конца. Нуклеиновая кислота может содержать один или два 5'-липких конца. Нуклеиновая кислота может содержать один или два тупых конца. Комбинации перечисленных выше липких концов или тупых концов также включены.

- 5 Нуклеиновая кислота может быть определена по последовательности нуклеотидов, указанной с использованием общепризнанного буквенного кода для основания нуклеотида: А (аденин), С (цитозин), G (гуанин), Т (тимин) и U (урацил). «Последовательность» при использовании в настоящей заявке относится к последовательности нуклеотидов или последовательности аминокислот.
- 10 Последовательность аминокислот может быть на 100 %, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% или 50% идентичной референсной последовательности и/или может содержать аминокислотную замену по сравнению с референсной последовательностью.

- 15 При использовании в настоящей заявке термин «гибридизуется при жестких условиях» означает способность к гибридизации при жестких условиях, например, при условиях, которые соответствуют T_m (температуре плавления), равной или большей чем примерно 50°C, 51°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C или 70°C.

- 20 «Повышение концентрации сахарозы» или «повышенная концентрация сахарозы» или «более высокая концентрация сахарозы в запасующем сахарозу органе растения» означает повышение средней концентрации сахарозы на основе сырой массы запасующего сахарозу органа по сравнению с референсным растением, культивируемым при идентичных условиях, составляющее по меньшей мере 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8% или 1%, предпочтительно по меньшей мере 1,2%, 1,4%, 1,6%, 1,8%
- 25 или 2%, в частности, предпочтительно по меньшей мере 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 6%, 7%, 8% или 10%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 15%.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, повышение выхода запасаемого вещества растения представляет собой повышение концентрации сахарозы.

- 30 «Повышение выхода запасаемого вещества растения» означает, что выход повышен по сравнению с референсным растением. Референсное растение может представлять

собой референсное растение, как определено в настоящей заявке, например, растение дикого типа, из которого получено растение с повышенным выходом. Растение с повышенным выходом может быть генетически модифицированным, например, растение может содержать вектор или мобильный генетический элемент согласно изобретению. Выход запасаемого вещества растения определяется обычным в данной области техники образом. Например, выход может представлять собой массу запасаемого вещества растения на культивируемую площадь.

Запасающий орган представляет собой орган растения, который накапливает запасаемое вещество растения. Запасающий орган может представлять собой запасующий сахар орган. «Запасающий сахар орган» при использовании в настоящей заявке представляет собой часть растения, в которой указанное растение запасает сахар, такой как сахароза, и который может быть собран. В частности, запасующие сахар органы могут представлять собой корнеплод свеклы или плоды, такие как кукурузное зерно.

«Растение» может представлять собой культурное растение, в частности, сахарную свеклу (*Beta vulgaris*), капусту (*Brassica rapa*), масличный рапс (*Brassica napus*), подсолнечник (*Helianthus annuus*), картофель (*Solanum tuberosum*), кукурузу (*Zea mays*), рис (*Oryza sp.*, например, *Oryza sativa*), ячмень (*Hordeum vulgare*), рожь (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum sp.*, например *Sorghum bicolor*), *Brassica oleracea capitata*, богатые белком растения, такие как соя (*Glycine max*) и горох (*Pisum sativum*), другие зерновые, включая пшеницу (*Triticum aestivum*), силосные культуры, такие как люцерна (*Medicago satvia*), междупосевные культуры, такие как горчица белая (*Sinapis alba*), редька посевная (*Raphanus sativus*), цветущие растения, такие как *Phacelia*, гречиха (*Fagopyrum esculentum*), сурепка (*Brassica rapa*), или другие овощи, включая шпинат (*Spinacia oleracea*), свеклу красную (*Beta vulgaris ssp. vulgaris*), листовую свеклу (*Beta vulgaris ssp. vulgaris*), томаты (*Lycopersicon esculentum*), зеленую фасоль (*Phaseolus vigna spp.*), перцы (*Capsicum annuum*), огурцы (*Cucumis sativus*), арбузы (*Citrullus lanatus*) и дыни (*Cucumis melo*). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, растение представляет собой трансгенное растение. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, растение было модифицировано, в частности, генетически модифицировано. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, модифицирование растения приводит к повышенному уровню фруктозы

в цитозоле растения, в частности, по сравнению с референсным растением, таким как растение дикого типа, из которого получено модифицированное растение. Повышение уровня фруктозы может быть достигнуто путем гиперэкспрессии протонно-фруктозного симпортера тонопласта, такого как любой из протонно-фруктозных симпортеров тонопласта, описанных в настоящей заявке.

Термин «наблюдается гиперэкспрессия протонно-фруктозного симпортера тонопласта» означает, что количество указанного протонно-фруктозного симпортера тонопласта в растении, клетке растения или тонопласте является более высоким по сравнению с референсным растением, клеткой растения или тонопластом растения, которое не было модифицировано для гиперэкспрессии. Например, если в растении наблюдается гиперэкспрессия протонно-фруктозного симпортера тонопласта по сравнению с растением дикого типа, из которого оно получено, то указанное растение содержит более высокое количество протонно-фруктозного симпортера тонопласта в растении, клетке растения или тонопласте по сравнению с растением, клеткой растения или тонопластом растения дикого типа.

«Протонно-фруктозный симпортер тонопласта» представляет собой белок-котранспортер, который расположен в тонопласте и транспортирует протоны и фруктозу из вакуоли в цитозоль.

Изобретение включает вектор или мобильный генетический элемент, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, где указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует протонно-фруктозный симпортер тонопласта и где молекула нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из:

а) молекулы нуклеиновой кислоты, обладающей последовательностью, по меньшей мере на 50% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из любой из последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 40, 39, 1 и 129-152,

б) молекулы нуклеиновой кислоты, обладающей последовательностью нуклеиновой кислоты, которая комплементарна или гибридизуется при жестких условиях с молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с а),

в) молекулы нуклеиновой кислоты, обладающей последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, обладающий аминокислотной

последовательностью, по меньшей мере на 50% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из любой из последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 58, 57, 22 и 77-128.

5 Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты, содержащаяся в векторе или мобильном генетическом элементе, обладает последовательностью, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичной последовательности нуклеиновой
10 кислоты, выбранной из группы, состоящей из любой из последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 40, 39, 1 и 129-152.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, белок, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, обладает аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей
15 мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из любой из последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 58, 57, 22 и 77-128.

Вектор или мобильный генетический элемент может дополнительно содержать одну
20 или более из любых из последовательностей нуклеиновых кислот в соответствии с SEQ ID NO: 1-152 или молекулу нуклеиновой кислоты, обладающую последовательностью, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по
25 меньшей мере на 95% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из любой из последовательностей нуклеиновых кислот в соответствии с SEQ ID NO: 1-152.

Вектор или мобильный генетический элемент может дополнительно содержать одну
30 или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих любую из аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 1-152, или одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей

мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из любой из аминокислотных последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 1-152.

Вектор или мобильный генетический элемент может применяться согласно способам и применениями, описанным в настоящей заявке, например, для достижения гиперэкспрессии протонно-фруктозного симпортера тонопласта. Например, вектор или мобильный генетический элемент может применяться для получения клетки-хозяина, как описано в настоящей заявке, таким образом, чтобы указанная клетка-хозяин, например, клетка растения, содержала вектор или мобильный генетический элемент. Вектор или мобильный генетический элемент может применяться для получения растения, как описано в настоящей заявке. В частности, растение, описанное в настоящей заявке, может содержать вектор или мобильный генетический элемент. Вектор или мобильный генетический элемент может применяться для повышения выхода запасаемого вещества растения. Вектор или мобильный генетический элемент может применяться для повышения биомассы растения, в частности, биомассы по меньшей мере одного органа растения. Вектор или мобильный генетический элемент может применяться для повышения концентрации по меньшей мере одного запасаемого вещества растения по меньшей мере в одном органе указанного растения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, выход запасаемого вещества растения может быть повышен путем повышения биомассы по меньшей мере одного органа растения или путем повышения концентрации запасаемого вещества растения по меньшей мере в одном органе растения, или комбинации повышения биомассы и концентрации запасаемого вещества. Дополнительно, вектор или мобильный генетический элемент может применяться для повышения концентрации сахарозы в запасующем сахарозу органе растения, как описано в настоящей заявке, в частности, путем применения указанного вектора или мобильного генетического элемента в способе повышения концентрации сахарозы в запасующем сахарозу органе растения, как описано в настоящей заявке. Вектор или мобильный генетический элемент также может применяться согласно описанному способу применения протонно-фруктозного симпортера тонопласта в растении для повышения концентрации сахарозы в запасующем сахарозу органе растения, например, путем введения указанного вектора или мобильного

генетического элемента в клетку указанного растения. Вектор или мобильный генетический элемент также может найти применение в описанном способе повышения биомассы растения. В частности, гиперэкспрессия протонно-фруктозного симпортера тонопласта, как описано в настоящей заявке, закодированного молекулой нуклеиновой кислоты, содержащейся в векторе или мобильном генетическом элементе, приводит к повышенной продукции биомассы растения, которое содержит указанный вектор или мобильный генетический элемент. Содержание в растении вектора или мобильного генетического элемента также приводит к повышению концентрации сахарозы, как описано в настоящей заявке.

- 10 Вектор или мобильный генетический элемент можно вводить в клетку, такую как эукариотическая или прокариотическая клетка, путем трансформации, трансфекции или другого способа, известного в данной области техники. Например, вектор или мобильный генетический элемент можно вводить в клетку растения путем инфицирования указанной клетки растения бактерией *Agrobacterium tumefaciens*,
15 которая содержит вектор или мобильный генетический элемент. Вектор или мобильный генетический элемент также можно вводить в клетку растения путем биолистического переноса или трансформации протопласта. Предпочтительно, вектор или мобильный генетический элемент стабильно поддерживается в клетке путем встраивания вектора или мобильного генетического элемента в геном клетки.
20 Стабильное встраивание вектора или мобильного генетического элемента в геном клетки, такой как клетка растения, позволяет восстановление растения из клетки, стабильно экспрессирующей вектор или мобильный генетический элемент, с получением таким образом трансгенного растения.

- Редактирование генома может применяться для введения вектора или мобильного генетического элемента в геном растения. Редактирование генома может применяться для модифицирования промотора эндогенного гена, кодирующего протонно-фруктозный симпортер тонопласта таким образом, чтобы происходила гиперэкспрессия протонно-фруктозного симпортера тонопласта. Редактирование генома включает генное редактирование CRSIPR, например, с использованием
30 CRISPR-нуклеазных систем.

Согласно дополнительному аспекту, изобретение направлено на клетку-хозяина, содержащую вектор или мобильный генетический элемент. Клетка-хозяин может

представлять собой клетку, как описано в настоящей заявке, в частности, клетку растения, как описано в настоящей заявке.

Согласно дополнительному аспекту, изобретение направлено на растение или часть растения, содержащую по меньшей мере одну клетку-хозяина, где указанная клетка-хозяин предпочтительно содержит вектор или мобильный генетический элемент, как описано в настоящей заявке.

Растение, описанное в настоящей заявке, в частности, характеризуется тем, что является генетически модифицированным таким образом, что указанное растение содержит повышенный уровень фруктозы в цитозоле по сравнению с растением дикого типа, из которого оно получено. Уровень фруктозы в цитозоле растения может превышать по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 110%, по меньшей мере на 120%, по меньшей мере на 130%, по меньшей мере на 140%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 160%, по меньшей мере на 170%, по меньшей мере на 180%, по меньшей мере на 190%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 350%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 450% или по меньшей мере на 500% уровень фруктозы в цитозоле растения дикого типа.

Повышенный уровень фруктозы в цитозоле растения, например, трансгенного растения, можно достигать различными путями. Например, повышенный уровень фруктозы в цитозоле растения можно достигать любым путем, который приводит к гиперэкспрессии протонно-фруктозного симпортера тонопласта, в частности, протонно-фруктозного симпортера тонопласта, описанного в настоящей заявке.

Гиперэкспрессия протонно-фруктозного симпортера тонопласта может, например, достигаться путем активации промотора эндогенного гена протонно-фруктозного симпортера тонопласта. Для достижения гиперэкспрессии может быть модифицирован ТАТА-бокс промотора. Для достижения гиперэкспрессии можно вводить цис-регуляторные элементы, например, путем редактирования генома, как описано в настоящей заявке и как известно специалисту в данной области техники.

Активация промотора у растений может достигаться, например, как описано в европейском патенте EP 3 546 582.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, гиперэкспрессия протонно-фруктозного симпортера тонопласта достигается путем введения по меньшей мере одной дополнительной копии протонно-фруктозного симпортера тонопласта в клетку растения. Дополнительная копия протонно-фруктозного симпортера тонопласта может представлять собой дополнительную копию эндогенного протонно-фруктозного симпортера тонопласта или дополнительную копию гетерологичного протонно-фруктозного симпортера тонопласта.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, протонно-фруктозный симпортер тонопласта может представлять собой любой из протонно-фруктозных симпортеров тонопласта, описанных в настоящей заявке, например, ERDL4 *Arabidopsis thaliana* (At) (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 22), VvIMP свеклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) (Bv) (SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 57), VvIMP2 свеклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) (SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 58) или любую из последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 77-128. Предпочтительно, протонно-фруктозный симпортер тонопласта может представлять собой любой из кандидатов, идентифицированных в примерах в настоящей заявке. Более предпочтительно, протонно-фруктозный симпортер тонопласта может представлять собой ERDL4 *Arabidopsis thaliana*, VvIMP свеклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) или VvIMP2 свеклы обыкновенной (*Beta vulgaris*).

Согласно особо предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения, растение представляет собой свеклу обыкновенную (*Beta vulgaris*), в которой наблюдается гиперэкспрессия протонно-фруктозного симпортера тонопласта, такого как VvIMP или VvIMP2.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, протонно-фруктозный симпортер тонопласта содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичную любой из аминокислотных последовательностей

протонно-фруктозного симпортера тонопласта, описанных в настоящей заявке, в частности, SEQ ID NO: 58, 57, 22 и 77-128.

Помимо гиперэкспрессии протонно-фруктозного симпортера тонопласта другие способы также могут применяться для повышения уровня фруктозы в цитозоле для
5 достижения благоприятных эффектов согласно настоящему изобретению.

Например, отрицательная регуляция экспрессии сахарного транспортера SWEET17 (Sugars Will Eventually be Exported Transporter 17) может также повышать количество фруктозы в цитозоле. SWEET17 способен транспортировать фруктозу через тонопласт. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения,
10 гиперэкспрессию протонно-фруктозного симпортера тонопласта можно комбинировать с отрицательной регуляцией экспрессии SWEET17. Отрицательная регуляция экспрессии SWEET17 может достигаться различными способами, например, генетическим нокаутом гена SWEET17 или использованием РНК-интерференции. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения,
15 SWEET17 представляет собой SWEET17 *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 5, 28) или SWEET17 свеклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) (SEQ ID NO: 45, 64). Отрицательная регуляция SWEET17 может применяться для любого растения, в частности, культурного растения, которое имеет ортолог SWEET17.

Уровень фруктозы в цитозоле может также быть повышен путем снижения
20 активности фруктокиназ и/или гексокиназ, которые фосфорилируют фруктозу и снижают количество свободной фруктозы в цитозоле. Таким образом, предполагается снижать уровень экспрессии фруктокиназ и/или гексокиназ (например, путем отрицательной регуляции или нокаута) для повышения уровня фруктозы в цитозоле. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, фруктокиназы
25 и/или гексокиназы выбраны из группы фруктокиназ и/или гексокиназ, описанных в настоящей заявке. Предпочтительно, снижение уровня экспрессии фруктокиназ и/или гексокиназ можно комбинировать с гиперэкспрессией протонно-фруктозного симпортера тонопласта и/или отрицательной регуляцией экспрессии SWEET17.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, для
30 идентификации мутантных растений, которые обладают повышенным уровнем фруктозы в цитозоле, может применяться поиск индуцированных локальных повреждений в геномах, TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes), с

использованием химического мутагена, такого как этилметансульфонат (EMS). Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, TILLING может применяться для идентификации растений, в которых наблюдается гиперэкспрессия протонно-фруктозного симпортера тонопласта, такого как ERDL4, VvIMP или VvIMP2.

Повышение выхода запасаемого вещества растения относится к повышению выхода запасаемого вещества растения по сравнению с соответствующим растением, которое не представляет собой растение, описанное в настоящей заявке, в частности, соответствующим растением с более низким уровнем фруктозы в цитозоле и/или растением, которое не было модифицировано в соответствии с настоящим техническим описанием. Соответствующее растение представляет собой растение того же вида.

Способы и применения согласно изобретению, например, способ получения растения, способ повышения выхода запасаемого вещества растения и способ повышения засухоустойчивости у растений, может включать этап выращивания растения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Гиперэкспрессия ERDL4 повышает уровень фруктозы в цитозоле

Гиперэкспрессия расположенного в тонопласте транспортера, называемого ERDL4 (Early Response to Dehydration-Like 4) – протонного симпортера, принадлежащего к большой подгруппе семейства транспортеров MST (Фигура 1; Büttner, 2007), который экспортирует фруктозу из вакуоли в цитозоль (Фигура 2 и 3), – приводит к повышению фруктозы в цитозоле. Происходит ли также транспорт других сахаров, остается еще невыясненным.

Для того, чтобы восприниматься и вносить, таким образом, вклад в ядерный сигналинг, фруктоза должна присутствовать в цитозоле. В противном случае не будет происходить регуляции транскрипции, поскольку вакуоль может рассматриваться как ‘внецитозольная’ область клетки, а ядро не воспринимает внецитозольные сигналы. В эксперименте по безводному фракционированию (NAF) может быть показано, что содержание фруктозы в растениях *Arabidopsis thaliana* с гиперэкспрессией ERDL4 специфично повышается в цитозоле (Фигура 9).

Создание линий ERDL4 Oex.:

Полноразмерный кодирующий участок ERDL4 амплифицировали с использованием прямого праймера ERDL4_Fwd: (5'-ggggacaagtttgtaaaaaagcaggcttaATGAGTTTTAGGGATGATAATAACG-3') и обратного праймера ERDL4_Rev: (5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtaTCATCTGAACAAAGCTTGGATCTC-3') и клонировали в pDON/Zeo и субклонировали в вектор pK2GW7 Gateway™ (Karimi et al., 2002) для создания линий с гиперэкспрессией на фоне Col-0. Для трансформации использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Растения *Arabidopsis* Col-0 трансформировали с помощью метода погружения растения (Clough and Bent, 1998). Проводили скрининг ERDL4-положительных линий на основе устойчивости к антибиотику канамицину и дополнительно использовали ОТ-ПЦР для селекции самых сильных линий.

Количественная оценка метаболита

15 Экстрагирование растворимых сахаров проводили с помощью 1 мл 80% этанола, добавленного к 100 мг замороженного тонкоизмельченного растительного материала при 80°C в течение 30 мин. Экстракты собирали и выпаривали в вакуумном центрифужном концентраторе Vacufuge (Eppendorf, Hamburg, Германия). Полученные осадки растворяли в ddH₂O и количественно оценивали с использованием НАДФ-зависимого ферментативного теста (Stitt et al., 1989) с помощью считывателя для 96-луночных планшетов (Tecan Infinite 200; Tecan Group).

Пример 2: Повышение фруктозы в цитозоле является благоприятным для продукции биомассы растения

25 Растения *Arabidopsis thaliana* с гиперэкспрессией ERDL4 имеют более крупную розетку листьев (Фигура 4), а также повышенную биомассу корней (Фигура 5), повышенную массу 1000 семян (Фигура 6) и более высокое содержание липидов в семенах по сравнению с контрольными растениями (Фигура 7). Кроме того, поток сахаров, экспортируемых из листьев через флоэму, выше, чем в контрольных растениях (Фигура 8).

30 Увеличенный размер розеток, биомасса корня и масса семян растений с гиперэкспрессией ERDL4:

Размер розеток определяли путем измерения сырой массы розеток от четырехнедельных растений, выращенных на почвенном субстрате ED73 (Patzert Einheitserde, Синнталь Альтенгронау, Германия) в условиях короткого дня (10 ч свет/14 ч темнота) при 21°C. Розетки срезали выше гипокотилия и очищали от частиц почвы.

- 5 Биомассу корня определяли у 4-недельных растений, выращенных в гидропонной системе. Растения удаляли из гидропонной системы и корни отдельных растений срезали ниже гипокотилия. Срезанные корневища перекачивали на бумажном полотенце для удаления избытка воды. Сырую массу корней определяли с использованием аналитических весов (Sartorius, Геттинген, Германия). После
- 10 определения сырой массы корни сушили в печи при 55°C в течение ночи и снова взвешивали.

- Для определения массы семян растения различных линий растили в течение пяти недель в условиях короткого дня (10 ч света/14 ч темноты) при 21°C и затем переводили в условия длинного дня (18 ч света/6 ч темноты) при 21°C до созревания
- 15 семян. Подсчитывали и затем взвешивали примерно 1000 зрелых семян по меньшей мере от четырех растений линий WT, двух линий с гиперэкспрессией ERDL4 и двух мутантных по *erd14* линий. Массу 1000 семян рассчитывали путем деления массы собранных семян на количество семян и умножения значения на 1000.

Определение содержания липидов:

- 20 Количественную оценку липидов проводили в соответствии с ранее оптимизированными протоколами (Reiser et al., 2004). 100 мг семян гомогенизировали в ступке с жидким азотом. 1,5 мл изопропанола добавляли к гомогенату и семена дополнительно гомогенизировали. Затем гомогенат переносили в пробирки Eppendorf на 1,5 мл и инкубировали при 4°C в течение 12 часов с вращением при 100 об./мин.
- 25 Образцы центрифугировали при 13,000 g в течение 10 минут. Затем супернатант переносили в предварительно взвешенные пробирки Eppendorf на 1,5 мл и позволяли ему выпариваться при 60°C в течение 8 часов. Количественную оценку оставшегося липидного осадка проводили гравиметрическим путем.

Измерение экссудата флоэмы:

- 30 Экссудаты флоэмы собирали в соответствии с протоколом от Ксу и соавторов (Xu et al., 2019) с несколькими модификациями. Исходные листья на одной стадии развития

от 6-недельных хорошо снабжаемых водой растений срезали с помощью острого лезвия бритвы в основании черешка. Черешки погружали в 20 мМ раствор К2-ЭДТА. Листья одной линии складывали вместе и черешки снова отрезали в то время, пока они были погружены в раствор ЭДТА. Листья затем переносили в пробирки Eppendorf на 1,5 мл с 500 мкл раствора ЭДТА. Экссудаты собирали в течение 6 часов в темной и влажной камере. Листья взвешивали и экссудаты сушили в вакуум-концентраторе. Для количественной оценки сахара осадки солубилизировали в 100 мкл ddH₂O.

Пример 3: Повышение фруктозы в цитозоле может восприниматься ядром и запускать регуляцию транскрипции

10 Гиперэкспрессия ERDL4 приводит к повышению фруктозы в цитозоле, которое воспринимается ядром. Происходит дерегуляция транскрипции некоторых генов в результате присутствия повышенного уровня фруктозы в цитозоле. Одним примером такого гена является СРК6 (Calcineurin B-like protein (CBL) interacting protein kinase 6, взаимодействующая с кальцинеурин В-подобным белком протеинкиназа 6; Фигура 10), белок которого активирует TST2 (Tonoplast Sugar Transporter 2, сахарный транспортер тонопласта 2) посредством фосфорилирования, который затем импортирует больше моносахаридов в вакуоль (Deng et al., 2020). Может ли эта активация TST2 частично объяснять повышение биомассы в результате восприятия фруктозы, остается прояснить. Для проверки этого можно было бы использовать гиперэкспрессию СРК6. С другой стороны, нокаут СРК6 в растениях с гиперэкспрессией ERDL4, вероятно, привел бы к разделению транскрипционной и посттранскрипционной активации TST2 и мог бы подсказать, является ли какая-либо из этих активностей критичной или которая из них является критичной для фенотипа гиперэкспрессии ERDL4. Однако гиперэкспрессия TST в *Arabidopsis thaliana*, как было показано, приводит к сходному фенотипу с повышенной биомассой (Wormit et al., 2006; Wingenter et al., 2010). Деререгуляция других генов также наблюдается в растениях с гиперэкспрессией ERDL4 и/или в растениях с высоким уровнем фруктозы в цитозоле, что также может частично объяснять очевидный фенотип.

Для анализа с помощью секвенирования РНК (RNASeq) выделяли РНК с использованием набора RNEasy KIT (Qiagen, Хильден, Германия) из исходных листьев шестинедельных растений, выращенных в условиях короткого дня (10 ч света, 14 ч темноты при температуре 21°C) на почвенном субстрате ED73 (Einheitserde Patzer, Синнталь Альтенгронау, Германия). Вкратце, примерно 100 мг замороженной

и измельченной ткани экстрагировали с помощью 1,5 мл лизирующего реагента Qiazol в пробирках Eppendorf на 2 мл и центрифугировали при 12 000 g при температуре 4°C. Супернатант очищали с использованием спин-колонок RNEasy. Концентрацию РНК рассчитывали с использованием спектрофотометра Nanodrop 5 2000/2000c (Thermo Fisher, Германия). Примерно пять микрограмм тотальной РНК отправляли в компанию NOVOGENE (Кембридж, Великобритания) для создания библиотеки РНК и биоинформатического анализа данных RNAseq (<https://en.novogene.com>).

Пример 4: Повышение фруктозы в цитозоле путем снижения активности 10 фруктокиназы и гексокиназы для повышенной продукции биомассы растения

Кроме того, существует несколько ферментов, которые фосфорилируют фруктозу до 15 ФБР для ее обратного включения в метаболизм углерода, таким образом, снижение активности конкретных фруктокиназ (FrcK) и гексокиназ (HxK) путем нокаута или отрицательной регуляции экспрессии также может приводить к более высокому уровню фруктозы и, таким образом, к восприятию фруктозы и повышенной 15 продукции биомассы растения.

Пример 5: Гиперэкспрессия ERDL4 и отрицательная регуляция SWEET17 обеспечивает синергические эффекты и приводит к повышенному уровню в цитозоле 20 фруктозы для повышенной продукции биомассы растения

Кроме того, сахарный транспортер SWEET17 (Sugars Will Eventually be Exported 20 Transporter 17) Arabidopsis способен транспортировать фруктозу через тонопласт. Однако поскольку SWEET17 является скорее помощником, а не активированным транспортером, фруктоза не может накапливаться в цитозоле (Chardon et al., 2013; Guo et al., 2014; Klemens et al., 2014; Valifard et al., 2021). Возможно только выравнивание 25 потенциального градиента фруктозы по разные стороны тонопласта (концентрация фруктозы в вакуоли по сравнению с цитозолем). Таким образом, ожидается, что одновременная гиперэкспрессия ERDL4 и отрицательная регуляция SWEET17 приведет к еще более высокому уровню фруктозы в цитозоле. Например, в случае сахарной свеклы BvERDL4;2 (см. последовательность в приложении) и BvSWEET17 30 (последовательность ближайшего ортолога SWEET17 из Arabidopsis thaliana приведена в приложении) можно модифицировать для повышения уровня фруктозы в цитозоле.

Пример 6: Гиперэкспрессия гомологов ERDL4 в культурных растениях для повышенной продукции биомассы растения

- Гиперэкспрессия с использованием трансгена

В качестве примера эксперименты, предусмотренные для культуры, предназначенной для усовершенствования, будут описаны для сахарной свеклы. Однако усовершенствование других культур также предполагается. Ожидается, что гиперэкспрессия ортолога ERDL4 *Arabidopsis thaliana* из сахарной свеклы приведет к повышению биомассы и выхода. Вероятно, VvERDL4;2 (VvIMP2) представляет собой соответствующий ортолог с надлежащей функцией, поскольку гиперэкспрессия VvIMP2 приводит к экспорту фруктозы из вакуоли (Эксперимент 7; Фигура 11). Предполагается, что экспрессия VvIMP2 под контролем конститутивного промотора (например, промотора 35S-CaMV или промотора убиквитина) или под контролем специфичного для листьев или для ткани зеленых листьев промотора (например, промотора хлорофилл a/b-связывающего белка или StLS1 соответственно) будет имитировать фенотип *Arabidopsis thaliana* с гиперэкспрессией ERDL4.

- Гиперэкспрессия путем активации промотора эндогенного гена

Альтернативой GM подходу, описанному выше, является активация промотора VvIMP2 путем модификации коровых элементов промотора типа ТАТА-бокса или путем введения цис-регуляторных элементов посредством редактирования генома. Такой модифицированный промотор затем приводил бы к более высокой экспрессии VvIMP2, которая, в свою очередь, приводила бы к фенотипу, описанному выше.

- TILLING-мутанты, приводящие к гиперэкспрессии ERDL4

Помимо этого, активацию промотора можно также осуществлять с помощью мутагенеза, например, одной точечной мутации, приводящей к улучшению корового элемента промотора. Кроме того, мутагенез кодирующей последовательности или других прилежащих регуляторных последовательностей (еще не определенных) может приводить к улучшенной активности, усиливая экспорт фруктозы из вакуоли.

- Мутагенез VvERDL4;1 для приобретения функции транспорта фруктозы

Поскольку последовательность VvERDL4;1 (VvIMP) сходна с VvIMP2, кажется обоснованным, что путем мутагенеза можно обеспечить его функцией транспорта

фруктозы. Такой экстра-экспортер фруктозы мог бы привести к повышению фруктозы в цитозоле и к фенотипу, подобному описанному выше.

- Гиперэкспрессия ERDL4 и дополнительная отрицательная регуляция/нокаут SWEET17

5 Подобно вышеописанному, гиперэкспрессия VvIMP2 на фоне мутанта *sweet17* (полученного путем мутагенеза или редактирования генома) может приводить к еще более высокому содержанию фруктозы в цитозоле (см. эксперимент 4). Альтернативно, гиперэкспрессия VvIMP2 и использование РНК-интерференции против VvSWEET17 можно объединять для достижения этой цели.

10 • Скрининг популяций растений для поиска природных растений с гиперэкспрессией ERDL4 с последующим обогащением аллели в селекционном пуле

Будет проведен скрининг популяций отборной сахарной свеклы (и других культур) или материала экзотического скрещивания для поиска генотипов с повышенной экспрессией VvIMP2. Такой скрининг будет проведен с помощью RNAseq листьев.

15 Выявление природных растений с гиперэкспрессией будет использоваться для скрещивания с отборным материалом для повышения соответствующей аллели в селекционном пуле, что в конечном итоге должно привести к повышенному выходу.

Пример 7: Гиперэкспрессия потенциального гомолога ERDL4 сахарной свеклы в *Arabidopsis* вызывает экспорт фруктозы из вакуоли

20 Анализ динамики содержания сахаров и крахмала в *Arabidopsis thaliana* (Col-0, *attst1-2*, VvIMP2 OX1 и OX2) при холодовом стрессе (4°C) и реакклиматизации (20°C; Фигура 11) показал, что ортологу AtERDL4 из сахарной свеклы, VvIMP2 (Vv6_128840_qlip.t1), можно присвоить функцию экспорта фруктозы из вакуоли.

Показано содержание глюкозы (a), фруктозы (b), сахарозы (c) и крахмала (d) через 14
25 дней. Содержание фруктозы в VvIMP2 OX1 и OX2 не достигает уровня фруктозы контрольных растений и снижается раньше, чем в контрольных растениях. Это указывает на то, что VvIMP2 экспортирует фруктозу из вакуоли (помимо эндогенного AtERDL4). Фруктоза в цитозоле может затем вовлекаться в метаболизм и использоваться для анаболических реакций. Вероятно, в данном случае избыточная
30 фруктоза является предшественником для образования крахмала.

Для анализа содержания сахаров и крахмала в *Arabidopsis thaliana* (Col-0, attst1-2, VvIMP2 OX1 и OX2) при холодовом стрессе (4°C) и реакклиматизации (20°C) растения культивировали на стандартизированной почве (ED-73; DIN1154080T), смешанной с 15 л песка на 50 л почвы. До эксперимента растения выращивали при 20°C (10 ч света/14 ч темноты) при показателях дыхания почвы 110 мкмоль CO₂/м²с в течение 21 дня. Через три недели растения переносили в условия с температурой 4°C при таком же режиме свет/темнота. Материал растений собирали до обработки при 4°C, через один, два, четыре и семь дней после переноса в условия с температурой 4°C. После обработки при 4°C в течение полных семи дней оставшиеся растения переносили обратно на 20°C и материал растений собирали через четыре и семь дней после обратного переноса. Четыре биологических повтора, каждый из которых состоял из пула из 4 розеток растения, собирали в 10 утра сразу после включения света. Собранный материал растений переносили в жидкий азот, измельчали в порошок и хранили при -80°C до применения.

Растворимые сахара экстрагировали из замороженного материала. Для этого примерно 50 мг измельченного в порошок материала растения взвешивали в 1 мл раствора 80% EtOH и экстрагировали с помощью 1 мл раствора 80% EtOH при 80°C в течение одного часа при встряхивании при 350 об./мин два раза. После каждого этапа экстракции нерастворимые компоненты центрифугировали при 14,000 об./мин в течение десяти минут и супернатанты объединяли в реакционных пробирках на 2 мл. Объединенные экстракты метаболитов затем выпаривали в вакуумном концентраторе Concentrator plus Vacofuge (Eppendorf, Гамбург, Германия). После выпаривания осадки растворяли в 1 мл ddH₂O и хранили при -20°C до проведения измерения. Осадки, оставшиеся после экстракции, промывали 500 мкл 80% EtOH и 1 мл ddH₂O и использовали для экстракции крахмала.

Для экстракции крахмала промытые осадки, оставшиеся после экстракции растворимых метаболитов, смешивали с 200 мкл ddH₂O и затем автоклавировали при 121°C в течение 40 мин. Цепи крахмала, присутствующие в осадке, затем подвергали гидролитическому расщеплению. Для гидролитического расщепления крахмала к автоклавированному осадку добавляли 200 мкл смеси ферментов (5 Ед. α-амилазы, Sigma-Aldrich, Мюнхен, Германия; 5 Ед. аимлоглюкозидазы, Roche, Мангейм, Германия; 200 мМ ацетата натрия; pH 4,8) и инкубировали при 37°C в течение по меньшей мере четырех часов. Для остановки ферментативных реакций образец затем

нагревали до 95°C в течение десяти минут. После конечного центрифугирования при 14 000 об./мин в течение десяти минут супернатант использовали для количественной оценки крахмала.

5 Концентрацию сахара (глюкозы, фруктозы, сахарозы) и гидролизованного крахмала измеряли с помощью НАД⁺-сопряженного ферментативного анализа, как описано в источнике Stitt et al., 1989. Для этой цели 190 мкл предварительно при-
 10 готовленной смеси добавляли к 10-20 мкл образца. Проводили фотометрическое измерение глюкозы, фруктозы и сахарозы при длине волны 340 нм в считывателе для микропланшетов Infinite® M Nano (Tecan, Меннедорф, Швейцария) после добавления ферментов гексокиназы (Roche, Мангейм, Германия), фосфоглюкоизомеразы (Roche, Мангейм, Германия) и инвертазы (Sigma-Aldrich, Мюнхен, Германия). Содержание сахара затем рассчитывали в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера.

15 Состав предварительно приготовленной смеси для количественной оценки сахара: 100 мМ HEPES (pH 7,5), 10 мМ MgCl₂, 2 мМ АТФ, 1 мМ НАДФ и 0,5 Ед. глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы из *Leuconostoc mesenteroides*.

Таблица 1. Анализируемые линии

Название	Линия	Фоновый генотип	Модификация	Ссылка
<i>attst1-2</i>	<i>tst1-2::tDNA</i>	Col-0	Скрещивание <i>tmt1::tDNA</i> и <i>tmt2::tDNA</i>	(Wormit et al., 2006)
<i>BvIMP2 OX1</i>	<i>35S::BvIMP2 #1-8</i>	Col-0	<i>35S-BvIMP2cgs</i> <i>35S-BvIMP2cgs</i>	(Zierer, Wolfgang; FAU Erlangen)
<i>BvIMP2 OX2</i>	<i>35S::BvIMP2 #4-5</i>	Col-0		

Пример 8: Гиперэкспрессия ERDL4 для повышенной засухоустойчивости

20 Растения *Arabidopsis* с гиперэкспрессией ERDL4 имеют более высокую биомассу уже при контрольных условия в присутствии достаточного количества воды (100% полевая влагоемкость; см. Фигуру 4 для сравнения). При подвержении растений умеренному (60% полевая влагоемкость) или сильному (40% полевая влагоемкость) стрессу, вызванному засухой, сырая биомасса снижается. Однако снижение биомассы было менее выраженным в растениях с гиперэкспрессией по сравнению с

контрольными растениями (Фигура 12). Расчет отношения сырой массы растений с гиперэкспрессией к сырой массе контрольных растений показал следующие значения:

100% полевая влагоемкость – $O_{ex1}/W_t = 1,38$; $O_{ex2}/W_t = 1,29$

60% полевая влагоемкость – $O_{ex1}/W_t = 1,72$; $O_{ex2}/W_t = 2,01$

5 40% полевая влагоемкость – $O_{ex1}/W_t = 1,66$; $O_{ex2}/W_t = 1,49$

10 Благоприятный эффект гиперэкспрессии ERDL4 для засухоустойчивости может объясняться улучшенным ростом корня (см. Фигуру 5 для сравнения) растений с гиперэкспрессией, которые могут лучше использовать свою удлиненную корневую систему для поиска воды по сравнению с контрольными растениями или даже erdl4-мутантами (KO1, KO2). Следовательно, мутанты с более маленькой корневой системой, в частности, чувствительны к засухе.

Подвержение растений, выращенных на почвенном субстрате, стрессу, вызванному засухой:

15 Растения подвергали условиям засухи на основе полевой влагоемкости почвы (FC) (Bouzid et al., 2019). Растения поддерживали при определенном содержании воды в почве (контроль=100%, 60%, 40% FC) с интервалом между поливами, составляющим 48 ч, до сбора. Семена линий дикого типа и линий с гиперэкспрессией ERDL4 проращивали на стандартной почве (ED-73; Einheitserde Patzer; Синнталь Альтенгронау, Германия) и растения растили в течение одной недели до переноса в 20 почву с 60% влажностью/полевой влагоемкостью (FC) по сравнению с контрольной почвой (100%). Для предотвращения осмотического шока всходы не переносили непосредственно из условий 100% FC в 40% FC. Вместо этого двухнедельные всходы, которые растили в течение одной недели при 100% FC и в течение одной недели при 60% FC, не поливали до достижения 40% влажности в почве. После этого влажность 25 почвы поддерживали на постоянном уровне путем мониторинга массы горшка (с помощью аналитических весов при точности 0,01 г) с интервалами в 48 часов (Xt). Для расчета полевой влагоемкости почвы три горшка заполняли соответствующей почвой, затем сушили в печи в течение 4 дней при 60 °C для определения массы сухой почвы (X0) в каждом горшке. Соответственно, три дополнительных горшка заполняли 30 таким же количеством почвы, как описано для высушивания с последующим увлажнением почвы до насыщения водой (Xf). После этого горшки переносили в

камеру для выращивания. Через 48 ч горшки снова взвешивали (X_t). Процентную полевую влагоемкость почвы рассчитывали с использованием следующей формулы: $[(X_t - X_0)/(X_f - X_0)] * 100$ (Bouزيد et al., 2019).

5 Стрессу, вызванному засухой, подвергали на основе полевой влагоемкости почвы (100%, 60%, 40%). Растения подвергали стрессу через 7 дней после прорастания. Условия стресса поддерживали в течение 3,5 недель. Сырую массу определяли путем оценки сырой массы розеток сразу после сбора.

Пример 9: Многие гены, для которых наблюдается дерегуляция в растениях с гиперэкспрессией ERDL4 *Arabidopsis thaliana*, также дерегулированы в погруженных во фруктозу, но не погруженных в глюкозу листовых дисках *Arabidopsis thaliana*

10 Гиперэкспрессия ERDL4 приводит к повышенному уровню фруктозы и глюкозы в цитозоле. Целесообразно проверить последствия для глобальной экспрессии генов, вызванные измененным внутриклеточным распределением сахаров, с помощью RNASeq-анализа. Для проверки того, были ли вызваны изменения транскриптома растений с гиперэкспрессией ERDL4 внутриклеточным накоплением глюкозы или фруктозы, проводили контрольные эксперименты, в которых диски, отрезанные от зрелых листьев *Arabidopsis*, инкубировали в течение ночи в 0,5 MС-буферном растворе, рН 5,7, с добавлением 1% глюкозы, 1% фруктозы или 1% маннита (в качестве осмотического контроля). При указанных условиях добавленный сахар диффундирует через апоплазму к интактным клеткам паренхимы, где он импортируются в цитозоль. Было показано, что такая заливка чистым сахаром определенного вида вызывает специфичные для конкретного сахара ответы на уровень экспрессии генов (Wormit et al., 2006; Luo et al., 2012). Гены, для которых наблюдаются значительные различия в экспрессии между разными линиями растений или между различными обработками, называются «дифференциально экспрессирующимися генами» (DEGs, differentially expressed genes). DEGs между растениями с гиперэкспрессией ERDL4 и растениями дикого типа (WT) были идентифицированы путем анализа значимых различий в экспрессии отдельных генов с помощью двустороннего t-критерия. DEGs между дисками листьев, которые инкубировали в присутствии фруктозы и в присутствии маннита или между дисками листьев, которые инкубировали в присутствии глюкозы и в присутствии маннита, были идентифицированы путем анализа значимых различий в экспрессии отдельных генов с помощью двустороннего t-критерия. С помощью условного анализа были

идентифицированы DEGs, перекрывающиеся для растений с гиперэкспрессией ERDL4 и листовых дисков, обработанных фруктозой, или DEGs, перекрывающиеся для растений с гиперэкспрессией ERDL4 и листовых дисков, обработанных глюкозой (Фигура 13). В общем было идентифицировано 130 общих DEGs для гиперэкспрессии ERDL4 и фруктозы и 155 общих DEGs для гиперэкспрессии ERDL4 и глюкозы (Фигура 13). Корреляционный анализ на основе индивидуальных амплитуд изменений экспрессии генов для 130 общих DEGs для гиперэкспрессии ERDL4 и обработки фруктозой и 155 общих DEGs для гиперэкспрессии ERDL4 и обработки глюкозой выявил коэффициенты корреляции, составляющие $r = 0,48$ ($r^2 = 0,23$) и $r = 0,15$ ($r^2 = 0,0225$) для растений с гиперэкспрессией ERDL4 и обработки фруктозой и растений с гиперэкспрессией ERDL4 и обработки глюкозой соответственно. Анализ выявил в десять раз более высокую корреляцию между зависимыми от гиперэкспрессии ERDL4 и зависимыми от фруктозы изменениями экспрессии генов по сравнению с зависимой от гиперэкспрессии ERDL4 и зависимой от глюкозы экспрессией генов и показал, что изменения транскрипции, зарегистрированные в растениях с гиперэкспрессией ERDL4, были вызваны изменением связанной с фруктозой передачи сигналов, а не изменением связанной с глюкозой передачи сигналов.

Пример 10: Идентификация ортологичных AtERDL4 последовательностей у нескольких видов двусемядольных и односемядольных культур

Для идентификации генов культур, ортологичных гену ERDL4 *Arabidopsis thaliana*, проводили серию сравнений по последовательности с использованием соответствующих белковых (аминокислотных) последовательностей указанных генов. Анализировали гены/белки нескольких культур: сахарной свеклы (*Beta vulgaris*), капусты (*Brassica rapa*), масличного рапса (*Brassica napus*), подсолнечника (*Helianthus annuus*), картофеля (*Solanum tuberosum*), кукурузы (*Zea mays*), риса (*Oryza sativa*), ячменя (*Hordeum vulgare*), ржи (*Secale cereale*) и сорго (*Sorghum bicolor*). Для того чтобы продемонстрировать, что белки *Arabidopsis thaliana* можно отличить друг от друга с использованием поиска BLAST (Altschul et al., 1997; при стандартных условиях: Ожидаемое значение: 10; Матрица: BLOSUM62, производящая попарные выравнивания), сначала проводили сравнение между AtERDL4, 6 и 7 (Таблица 2 и Фигура 1 для сравнения). Чем выше балл, тем более сходными являются последовательности. Причиной для включения ERDL6 и 7 в анализ является то, что

ERDL6 представляет собой наиболее сходный паралог ERDL4 в *Arabidopsis thaliana*, и ERDL7 является одним из вторых по наибольшему сходству, но уже достаточно отличающимся от ERDL4 и 6 (для сравнения также Фигура 1).

Таблица 2: Сравнение ERDL4, 6 и 7 *Arabidopsis thaliana* друг с другом

	AtERDL4	AtERDL6	AtERDL7
AtERDL4	947	880	417
AtERDL6	880	951	414
AtERDL7	417	414	904

AtERDL4, 6 и 7 отличимы друг от друга.

Для определения предполагаемых ортологов AtERDL4 в *Brassica rapa* проводили 3 поиска BLAST против белковых последовательностей генома *Brassica rapa* с использованием (i) AtERDL4, (ii) AtERDL6 и (iii) AtERDL7 соответственно в качестве искомых последовательностей. Полученные в результате поиска BLAST баллы перечислены в Таблице 3.

Таблица 3: Сравнение AtERDL4, AtERDL6 и AtERDL7 соответственно с белками *Brassica rapa*

	AtERDL4	AtERDL6	AtERDL7
BrA	910	882	406
BrB	904	866	405
BrC	865	912	410
BrD	860	903	412
BrE	860	901	416
BrF	414	411	856

BrA и BrB (см. все последовательности в приложении) являются кандидатами ортологов AtERDL4 у капусты, а BrC, BrD и BrE – кандидатами ортологов AtERDL6. BrF является кандидатом ортолога AtERDL7. Дополнительные последовательности из *Arabidopsis thaliana* могут быть включены в анализы (Фигура 1). Однако целью сравнения последовательностей в настоящей заявке является только определение наиболее вероятных кандидатов ортологов AtERDL4 (а не всех белков AtERDL).

Для определения предполагаемых ортологов AtERDL4 в *Brassica napus* проводили 3 поиска BLAST против белковых последовательностей генома *Brassica napus* с использованием (i) AtERDL4, (ii) AtERDL6 и (iii) AtERDL7 соответственно в качестве

искомых последовательностей. Полученные в результате поиска BLAST баллы перечислены в Таблице 4.

Таблица 4: Сравнение AtERDL4, AtERDL6 и AtERDL7 соответственно с белками *Brassica napus*

	AtERDL4	AtERDL6	AtERDL7
BnA	911	884	408
BnB	910	882	406
BnC	907	870	405
BnD	901	865	407
BnE	863	905	413
BnF	862	910	409
BnG	862	904	413
BnH	861	902	417
BnI	724	759	325
5 BnJ	416	414	857

BnA, BnB, BnC и BnD являются кандидатами ортологов AtERDL4 у масличного рапса. BnE, BnF, BnG и BnH, более вероятно, являются ортологами AtERDL6. BnI и BnJ, вероятно, не являются кандидатами ортологов для AtERDL4.

10 Для определения предполагаемых ортологов AtERDL4 в свекле обыкновенной (*Beta vulgaris*) проводили 3 поиска BLAST против белковых последовательностей генома свеклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) с использованием (i) AtERDL4, (ii) AtERDL6 и (iii) AtERDL7 соответственно в качестве искомых последовательностей. Полученные в результате поиска BLAST баллы перечислены в Таблице 5.

15 **Таблица 5:** Сравнение AtERDL4, AtERDL6 и AtERDL7 соответственно с белками свеклы обыкновенной (*Beta vulgaris*)

	AtERDL4	AtERDL6	AtERDL7
VvIMP	775	789	409
VvIMP2	710	720	394
VvC	420	427	665

20 VvIMP и VvIMP2 являются кандидатами для ортологов AtERDL4 (и AtERDL6) в сахарной свекле. VvC, вероятно, не является кандидатом ортолога AtERDL4 или 6. Указанные данные подтверждаются функциональным анализом VvIMP2, который указывает, что VvIMP2 представляет собой функциональный ортолог AtERDL4 (см. Фигуру 11).

Для определения предполагаемых ортологов AtERDL4 в *Helianthus annuus* проводили 3 поиска BLAST против белковых последовательностей генома *Helianthus* с использованием (i) AtERDL4, (ii) AtERDL6 и (iii) AtERDL7 соответственно в качестве искомых последовательностей. Полученные в результате поиска BLAST баллы перечислены в Таблице 6.

Таблица 6: Сравнение AtERDL4, AtERDL6 и AtERDL7 соответственно с белками *Helianthus annuus*

	AtERDL4	AtERDL6	AtERDL7
HaA	773	786	391
HaB	763	771	396
HaC	682	680	384
HaD	422	421	695

HaA и HaB являются кандидатами ортологов AtERDL4 (и AtERDL6) у подсолнечника. HaD, вероятно, не является кандидатом ортолога AtERDL4 или 6.

Для определения предполагаемых ортологов AtERDL4 в *Solanum tuberosum* проводили 3 поиска BLAST против белковых последовательностей генома *Solanum tuberosum* с использованием (i) AtERDL4, (ii) AtERDL6 и (iii) AtERDL7 соответственно в качестве искомых последовательностей. Полученные в результате поиска BLAST баллы перечислены в Таблице 7.

Таблица 7: Сравнение AtERDL4, AtERDL6 и AtERDL7 соответственно с белками *Solanum tuberosum*

	AtERDL4	AtERDL6	AtERDL7
StA	780	779	408
StB	780	796	402
StC	714	723	412
StD	691	698	399
StE	575	583	334
StF	422	419	525

StA и StB являются кандидатами ортологов AtERDL4 (и AtERDL6) в картофеле. StF, вероятно, не является кандидатом ортолога для AtERDL4 или 6.

Для того, чтобы определить предполагаемые ортологи AtERDL4 в нескольких видах односемядольных, для каждого проводили 3 поиска BLAST против белковых последовательностей генома нескольких видов односемядольных с использованием

(i) AtERDL4, (ii) AtERDL6 и (iii) AtERDL7 соответственно в качестве искомым последовательностей. Полученные в результате поиска BLAST баллы перечислены в следующих таблицах. Для определения предполагаемых ортологов AtERDL4 в *Zea mays* проводили 3 поиска BLAST против белковых последовательностей генома *Zea mays* с использованием (i) AtERDL4, (ii) AtERDL6 и (iii) AtERDL7 соответственно в качестве искомым последовательностей. Полученные в результате поиска BLAST баллы перечислены в следующей далее Таблице 8.

Таблица 8: Сравнение AtERDL4, AtERDL6 и AtERDL7 соответственно с белками *Zea mays*

	AtERDL4	AtERDL6	AtERDL7
ZmA	710	707	406
ZmB	689	684	397
ZmC	595	595	389
ZmD	594	603	381
ZmE	566	562	342
ZmF	424	413	488

ZmA и ZmB являются наилучшими кандидатами для ортологов AtERDL4 (и AtERDL6) в кукурузе. ZmF не является кандидатом ортолога AtERDL4 или 6.

Для определения предполагаемых ортологов AtERDL4 в *Oryza sativa* проводили 3 поиска BLAST против белковых последовательностей генома *Oryza sativa* с использованием (i) AtERDL4, (ii) AtERDL6 и (iii) AtERDL7 соответственно в качестве искомым последовательностей. Полученные в результате поиска BLAST баллы перечислены в Таблице 9.

Таблица 9: Сравнение AtERDL4, AtERDL6 и AtERDL7 соответственно с белками *Oryza sativa*

	AtERDL4	AtERDL6	AtERDL7
OsA	720	710	397
OsB	691	692	374
OsC	658	654	374
OsD	408	410	570
OsE	367	377	514
OsF	367	371	501

OsA, OsB и OsC являются кандидатами ортологов AtERDL4 (и AtERDL6) в рисе. OsD, OsE и OsF, менее вероятно, являются кандидатами ортологов AtERDL4 (и AtERDL6).

Для определения предполагаемых ортологов AtERDL4 в *Hordeum vulgare* проводили 3 поиска BLAST против белковых последовательностей генома *Hordeum vulgare* с использованием (i) AtERDL4, (ii) AtERDL6 и (iii) AtERDL7 соответственно в качестве искомых последовательностей. Полученные в результате поиска BLAST баллы
5 перечислены в Таблице 10.

Таблица 10: Сравнение AtERDL4, AtERDL6 и AtERDL7 соответственно с белками *Hordeum vulgare*

	AtERDL4	AtERDL6	AtERDL7
HvA	686	684	385
HvB	684	681	383
HvC	660	652	372
HvD	401	400	514

HvA, HvB или HvC являются кандидатами ортологов AtERDL4 (и AtERDL6) в ячмене.
10 HvD не является кандидатом ортологов AtERDL4 (и AtERDL6).

Для определения предполагаемых ортологов AtERDL4 в *Secale cereale* проводили 3 поиска BLAST против белковых последовательностей генома *Secale cereale* с использованием (i) AtERDL4, (ii) AtERDL6 и (iii) AtERDL7 соответственно в качестве искомых последовательностей. Полученные в результате поиска BLAST баллы
15 перечислены в Таблице 11.

Таблица 11: Сравнение AtERDL4, AtERDL6 и AtERDL7 соответственно с белками *Secale cereale*

	AtERDL4	AtERDL6	AtERDL7
ScA	698	697	394
ScB	677	674	379
ScC	672	668	378
ScD	658	648	374
ScE	407	405	539

ScA, ScB или ScC являются кандидатами ортологов AtERDL4 (и AtERDL6) у ржи. ScD
20 и, в частности, ScE, менее вероятно, являются кандидатами ортологов AtERDL4 (и AtERDL6).

Для определения предполагаемых ортологов AtERDL4 в *Sorghum bicolor* проводили 3 поиска BLAST против белковых последовательностей генома *Sorghum bicolor* с использованием (i) AtERDL4, (ii) AtERDL6 и (iii) AtERDL7 соответственно в качестве

искомых последовательностей. Полученные в результате поиска BLAST баллы перечислены в Таблице 12.

Таблица 12: Сравнение AtERDL4, AtERDL6 и AtERDL7 соответственно с белками *Sorghum bicolor*

	AtERDL4	AtERDL6	AtERDL7
SbA	704	701	407
SbB	680	675	397
SbC	673	674	371
SbD	610	609	365
5 SbE	422	416	482

SbA, SbB или SbC являются кандидатами ортологов для AtERDL4 (и AtERDL6) в сорго. SbD и, в частности, SbE, менее вероятно, являются кандидатами ортологов AtERDL4 (и AtERDL6).

10 Вышеизложенные примеры приведены для иллюстрации настоящего изобретения и не ограничивают настоящее изобретение до описанных в них вариантов реализации. Несмотря на то, что изобретение было подробно описано со ссылкой на предпочтительные варианты реализации, существуют вариации и модификации в пределах объема и сущности изобретения, как описано и определено в следующей далее формуле изобретения.

15 Ссылки:

- 1) In concert: Orchestrated changes in carbohydrate homeostasis are critical for plant abiotic stress tolerance; Pommerrenig B et al. (2018), DOI: 10.1093/pcp/pcy037
- 2) ChloroP, a neural network based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites; Emanuelsson O et al., (2008), DOI: 10.1110/ps.8.5.978
- 20 3) ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins; Schwacke R et al. (2003), DOI: 10.1104/pp.011577
- 4) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega; Sievers F et al. (2011), DOI: 10.1038/msb.2011.75
- 5) MrBayes: Bayesian phylogenetic inference under mixed models; Ronquist F &
25 Huelsenbeck JP (2003), DOI: 10.1093/bioinformatics/btg180

- 6) The monosaccharide transporter(-like) gene family in Arabidopsis; Büttner M (2007), DOI: 10.1016/j.febslet.2007.03.016
- 7) GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation; Karimi M et al. (2002), DOI: 10.1016/S1360-1385(02)02251-3
- 5 8) "Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana; Clough S & Bent AF (1998), DOI: 10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x
- 9) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves; Stitt M (1989), DOI: 10.1016/0076-6879(89)74035-0
- 10 10) Molecular physiological analysis of the two plastidic ATP/ADP transporters from Arabidopsis; Reiser J et al (2004), DOI: 10.1104/pp.104.049502
- 11) Regulation of sucrose transporters and phloem loading in response to environmental cues; Xu Q et al (2018), DOI: 10.1104/pp.17.01088
- 12) The Calcium Sensor CBL2 and Its Interacting Kinase CIPK6 Are Involved in Plant Sugar Homeostasis via Interacting with Tonoplast Sugar Transporter TST2(1); Deng JW et al. (2020), DOI: 10.1104/pp.19.01368
- 15 13) Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from Arabidopsis involved in vacuolar sugar transport; Wormit A et al. (2006), DOI: 10.1105/tpc.106.047290
- 14) Increased Activity of the Vacuolar Monosaccharide Transporter TMT1 Alters Cellular Sugar Partitioning, Sugar Signaling, and Seed Yield in Arabidopsis; Wingenter K et al 20 (2010), DOI: 10.1104/pp.110.162040
- 15) Leaf Fructose Content Is Controlled by the Vacuolar Transporter SWEET17 in Arabidopsis; Chardon F et al (2013), DOI: 10.1016/j.cub.2013.03.021
- 16) SWEET17, a Facilitative Transporter, Mediates Fructose Transport across the Tonoplast 25 of Arabidopsis Roots and Leaves; Guo, WJ et al. (2014), DOI: 10.1104/pp.113.232751
- 17) Overexpression of a proton-coupled vacuolar glucose exporter impairs freezing tolerance and seed germination; Klemens, PAW et al. (2014), DOI: 10.1111/nph.12642

18) Vacuolar fructose transporter SWEET17 is critical for root development and drought tolerance; Valifard M et al (2021), DOI: 10.1093/plphys/kiab436

19) Arabidopsis species deploy distinct strategies to cope with drought stress; Bouzid M et al. (2019), DOI: 10.1093/aob/mcy237

5 20) An autoregulatory feedback loop involving PAP1 and TAS4 in response to sugars in Arabidopsis; Luo, QJ et al. (2012), DOI: 10.1007/s11103-011-9778-9

21) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs; Altschul, SF et al. (1997), DOI: 10.1093/nar/25.17.3389

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вектор или мобильный генетический элемент, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, где указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует протонно-фруктозный симпортер тонопласта и где указанная молекула нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из:
 - а) молекулы нуклеиновой кислоты, которая имеет последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из любой из последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 40, 39, 1 и 129-152,
 - б) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, которая комплементарна или гибридизуется при жестких условиях с молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с а), и
 - в) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, обладающий аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 50% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из любой из последовательностей в соответствии с SEQ ID NO: 58, 57, 22 и 77-128.
2. Клетка-хозяин, содержащая вектор или мобильный генетический элемент по п. 1.
3. Растение или часть растения, содержащая по меньшей мере одну клетку-хозяина по п. 2.
4. Растение, модифицированное таким образом, что указанное растение содержит повышенный уровень фруктозы в цитозоле по сравнению с растением дикого типа, из которого оно получено.
5. Растение по п. 4, отличающееся тем, что в указанном растении наблюдается гиперэкспрессия протонно-фруктозного симпортера тонопласта по сравнению с растением дикого типа, из которого оно получено.
6. Растение по п. 5, отличающееся тем, что

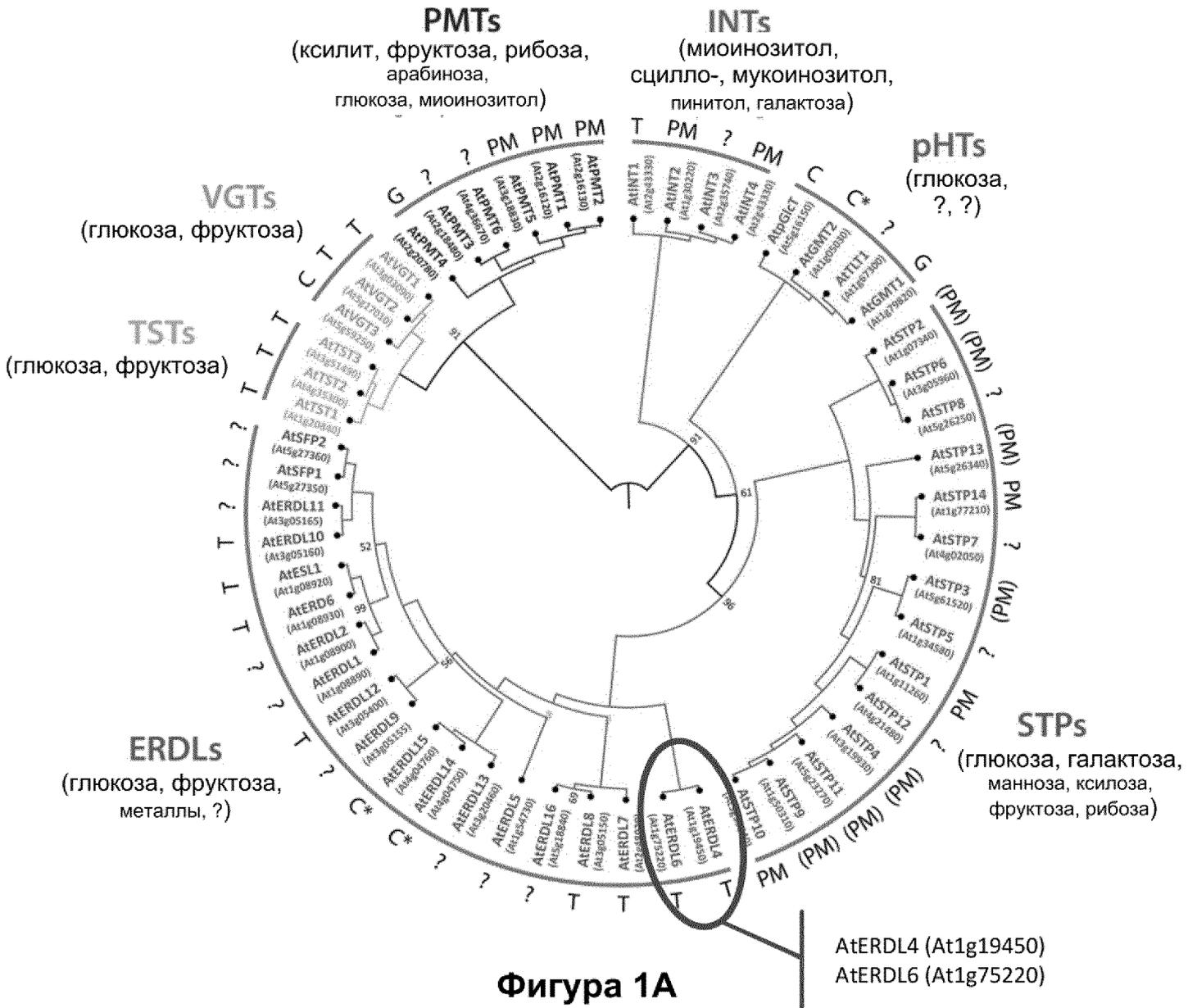
- i) указанное растение содержит модифицированный промотор эндогенного гена, кодирующего гиперэкспрессирующийся протонно-фруктозный симпортер тонопласта таким образом, чтобы происходила гомологичная гиперэкспрессия указанного протонно-фруктозного симпортера тонопласта,
- 5 ii) растение содержит по меньшей мере одну дополнительную копию нуклеиновой кислоты, кодирующей гиперэкспрессирующийся протонно-фруктозный симпортер тонопласта, таким образом, чтобы происходила гомологичная гиперэкспрессия указанного протонно-фруктозного симпортера тонопласта, или
- 10 iii) растение содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный протонно-фруктозный симпортер тонопласта, таким образом, чтобы происходила гетерологичная гиперэкспрессия указанного протонно-фруктозного симпортера тонопласта.
7. Растение по любому из пп. 4 - 6, отличающееся тем, что указанное растение
- 15 содержит вектор или мобильный генетический элемент по п. 1.
8. Семя растения по любому из пп. 3 - 7.
9. Способ получения растения, включающий следующие этапы:
- a) модифицирование по меньшей мере одной клетки растения таким образом, чтобы была получена по меньшей мере одна клетка растения, которая
- 20 содержит повышенный уровень фруктозы в цитозоле по сравнению с клеткой растения дикого типа, из которой она получена; и
- b) восстановление растения из модифицированной клетки растения из этапа а), где указанное растение содержит повышенный уровень фруктозы в цитозоле по сравнению с растением дикого типа, из которого оно получено.
- 25 10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что модифицирование по меньшей мере одной клетки растения на этапе а) включает
- i) модифицирование промотора эндогенного гена, кодирующего протонно-фруктозный симпортер тонопласта, таким образом, чтобы происходила гиперэкспрессия протонно-фруктозного симпортера тонопласта,

- ii) введение в клетку растения по меньшей мере одной дополнительной копии нуклеиновой кислоты, кодирующей протонно-фруктозный симпортер тонопласта, таким образом, чтобы происходила гомологичная гиперэкспрессия указанного протонно-фруктозного симпортера тонопласта, или
- 5 iii) введение в клетку растения гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей гетерологичный протонно-фруктозный симпортер тонопласта, таким образом, чтобы происходила гетерологичная гиперэкспрессия указанного протонно-фруктозного симпортера тонопласта.
11. Способ по п. 9 или 10, отличающийся тем, что вектор или мобильный
10 генетический элемент по п. 1 вводят по меньшей мере в одну клетку растения.
12. Способ повышения выхода запасаемого вещества растения, включающий повышение концентрации фруктозы в цитозоле растения.
13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что
- 15 i) растение, которое продуцирует запасаемое вещество растения, получают согласно любому из пп. 9 - 11, и/или
- ii) растение, которое продуцирует запасаемое вещество растения, представляет собой растение по любому из пп. 3 - 7.
14. Способ по любому из пп. 12 - 13, отличающийся тем, что запасаемое вещество растения выбрано из сахара, предпочтительно сахарозы, крахмала, белка или липида.
- 20 15. Способ по любому из пп. 12 - 14, отличающийся тем, что
- i) биомасса по меньшей мере одного органа растения, который содержит запасаемое вещество растения, повышена, где указанный орган растения предпочтительно представляет собой плод, семя, корень или запасающий орган, или
- 25 ii) концентрация запасаемого вещества растения по меньшей мере в одном органе растения повышена, где указанный орган растения предпочтительно представляет собой плод, семя, корень или запасающий орган.

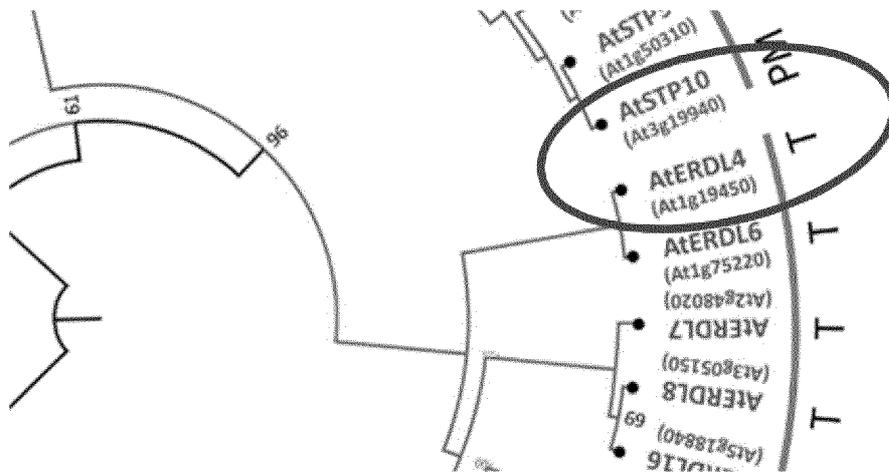
16. Способ повышения засухоустойчивости у растений, включающий повышение концентрации фруктозы в цитозоле растения.
17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что
- 5 i) растение, которое обладает повышенной засухоустойчивостью, получают согласно любому из пп. 9 - 11, и/или
- ii) растение, которое обладает повышенной засухоустойчивостью, представляет собой растение по любому из пп. 3 - 7.
18. Растение по любому из пп. 3 - 7 и способ по любому из пп. 9 - 17, отличающиеся тем, что растение выбрано из группы, состоящей из сахарной свеклы (*Beta vulgaris*),
10 капусты (*Brassica rapa*), масличного рапса (*Brassica napus*), подсолнечника (*Helianthus annuus*), картофеля (*Solanum tuberosum*), кукурузы (*Zea mays*), риса (*Oryza sp.*, например, *Oryza sativa*), ячменя (*Hordeum vulgare*), ржи (*Secale cereale*) или сорго (*Sorghum sp.*), предпочтительно растение представляет собой сахарную свеклу.
19. Способ по любому из пп. 12 - 15, отличающийся тем, что растение
15 представляет собой сахарную свеклу, орган растения представляет собой стержневой корень сахарной свеклы и запасаемое вещество растения представляет собой сахарозу.
20. Применение протонно-фруктозного симпортера тонопласта в растении для
20 повышения концентрации запасаемого вещества растения в органе указанного растения, где указанное запасаемое вещество растения необязательно выбрано из сахара, предпочтительно сахарозы, крахмала, белка или липида, и растение выбрано из группы, состоящей из сахарной свеклы (*Beta vulgaris*), капусты (*Brassica rapa*), масличного рапса (*Brassica napus*), подсолнечника (*Helianthus annuus*), картофеля (*Solanum tuberosum*), кукурузы (*Zea mays*), риса (*Oryza sp.*, например *Oryza sativa*),
25 ячменя (*Hordeum vulgare*), ржи (*Secale cereale*) или сорго (*Sorghum sp.*), предпочтительно растение представляет собой сахарную свеклу, и орган растения представляет собой стержневой корень сахарной свеклы.
21. Способ выбора растения с повышенным уровнем фруктозы в цитозоле
растения, включающий этапы:
- 30 i) выращивания растения;

- ii) измерения уровня фруктозы по меньшей мере в одной клетке растения;
- iii) сравнения измеренного уровня фруктозы по меньшей мере с одним референсным уровнем фруктозы; и
- iv) выбора растения с повышенным уровнем фруктозы по сравнению по меньшей мере с одним референсным уровнем.

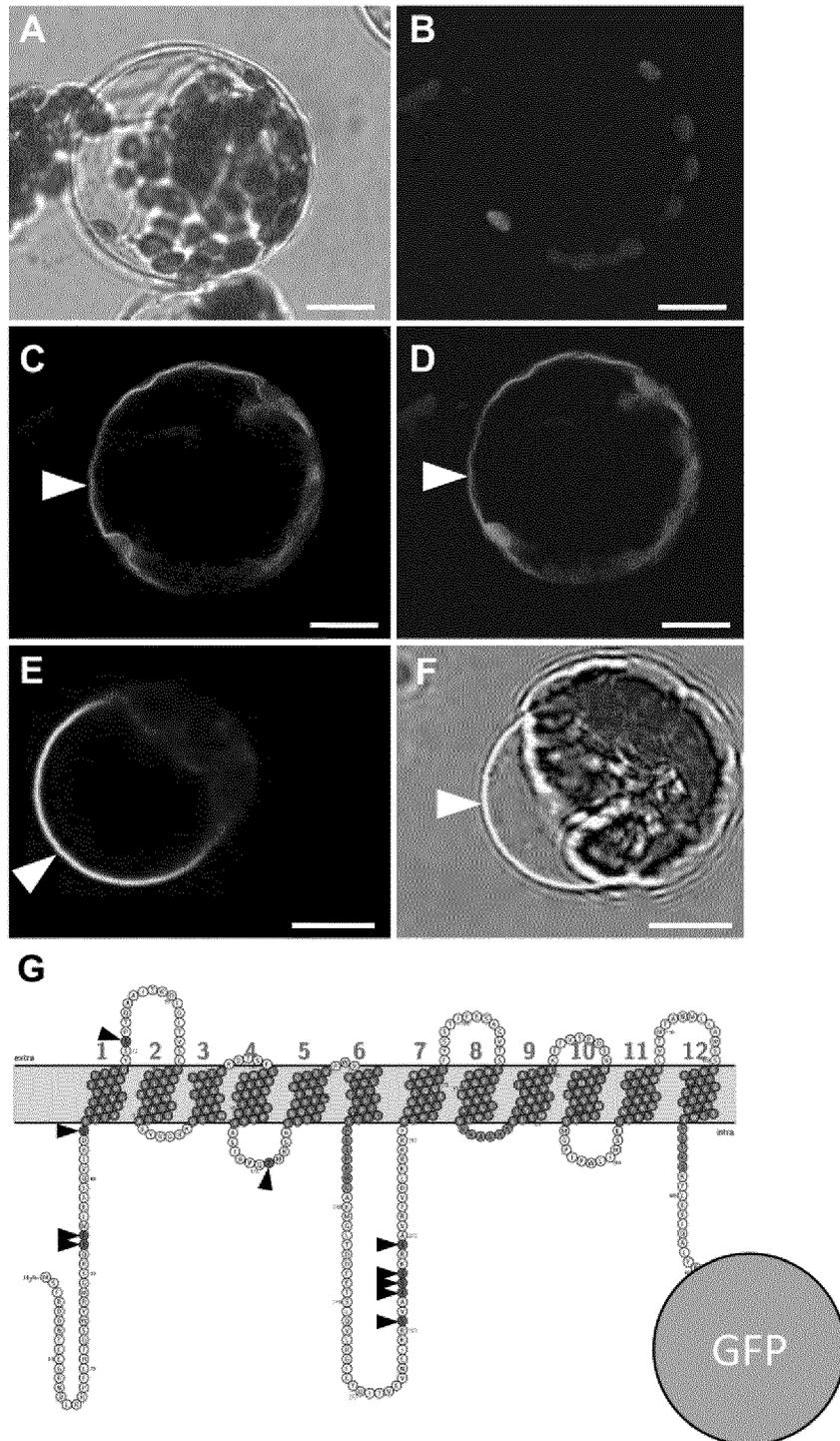
5



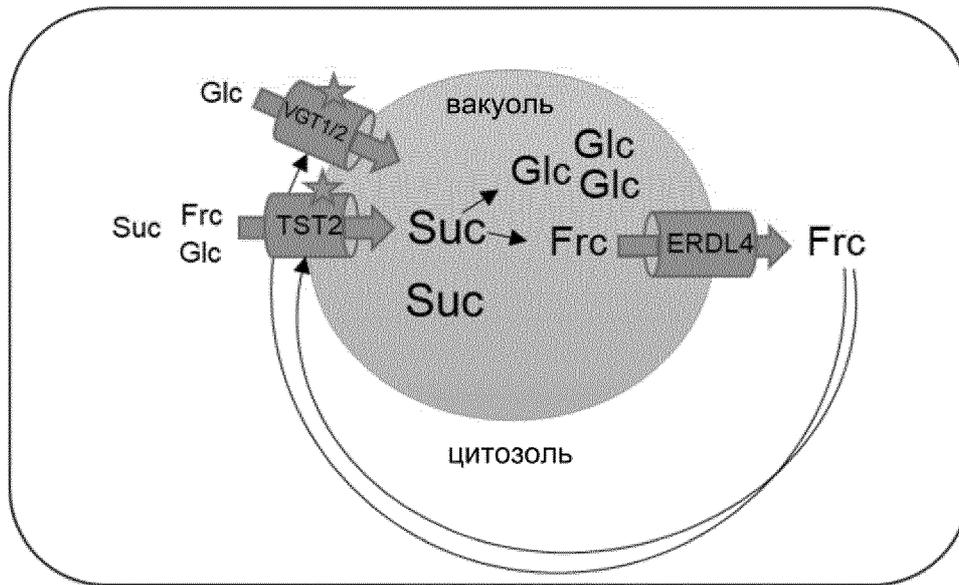
Фигура 1А



Фигура 1В

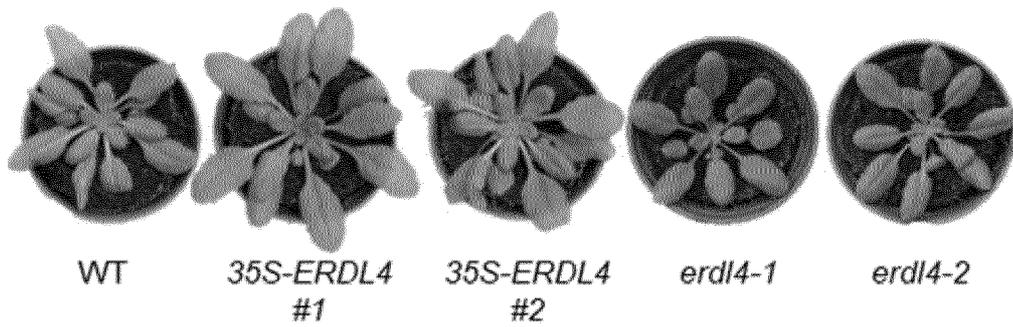


Фигура 2

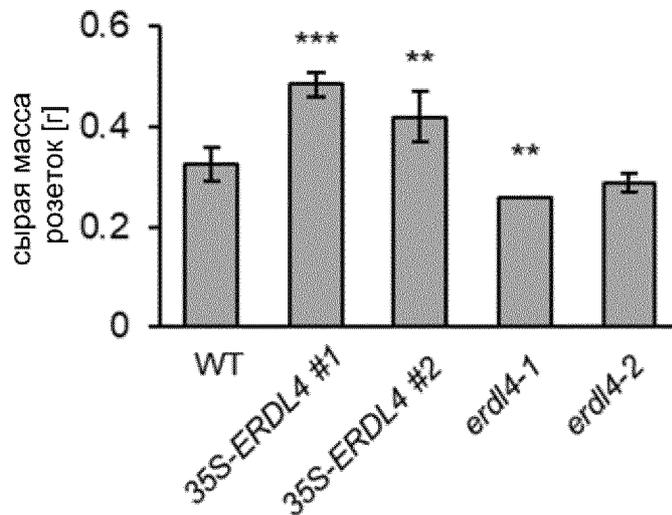


Фигура 3

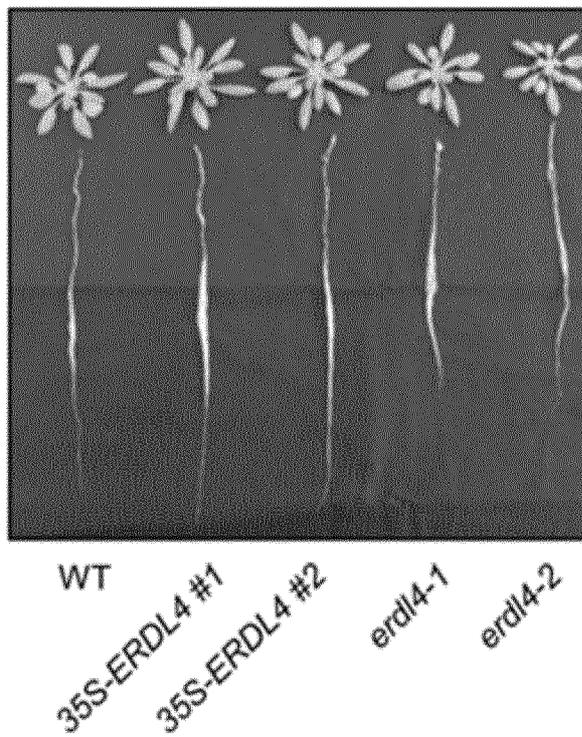
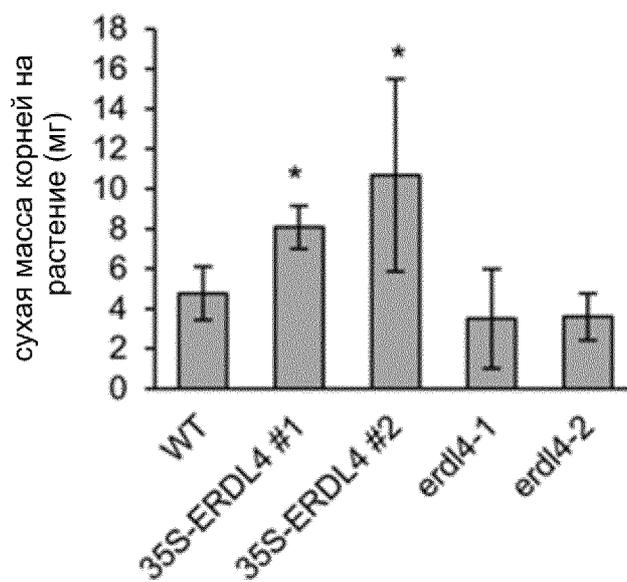
A



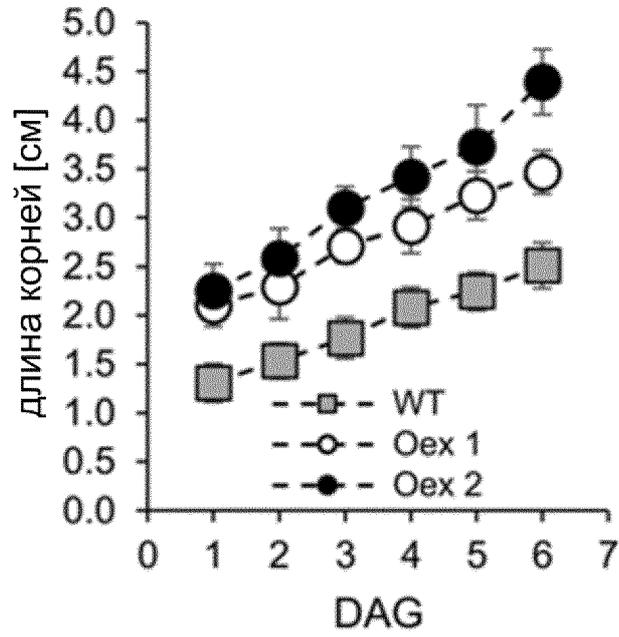
B



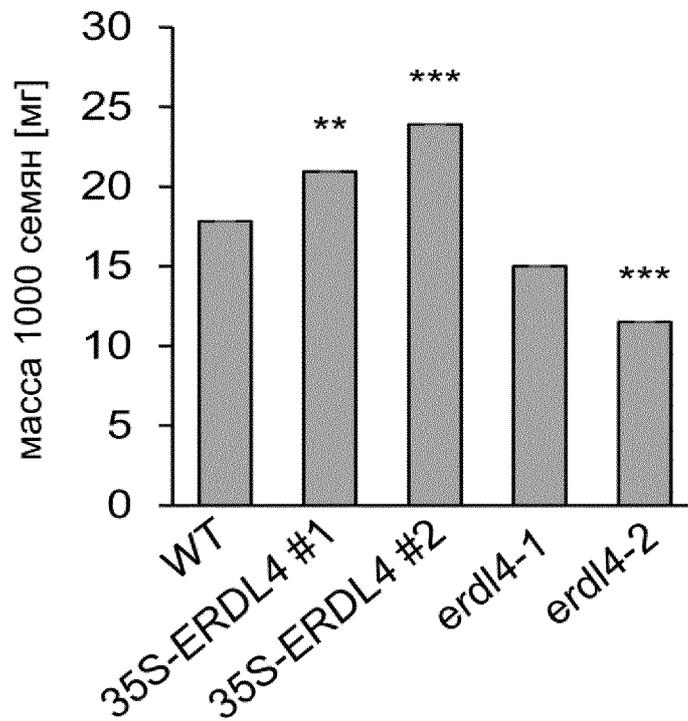
Фигура 4

A**B****Фигура 5**

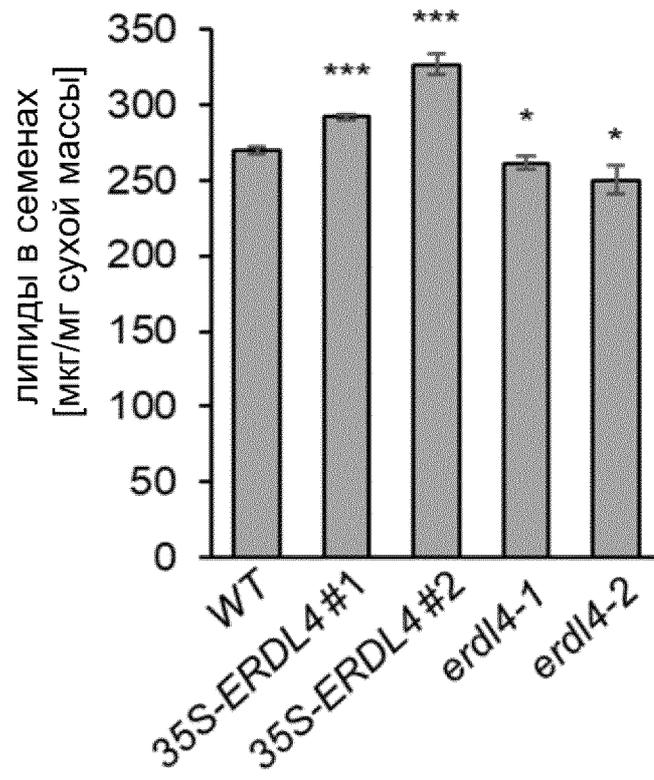
С



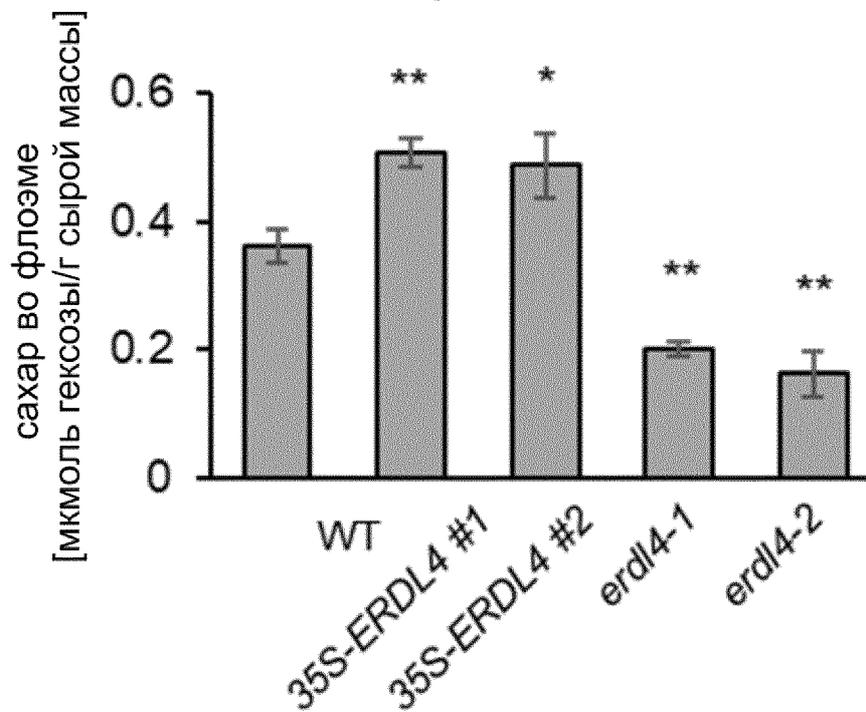
Фигура 5 (продолж.)



Фигура 6

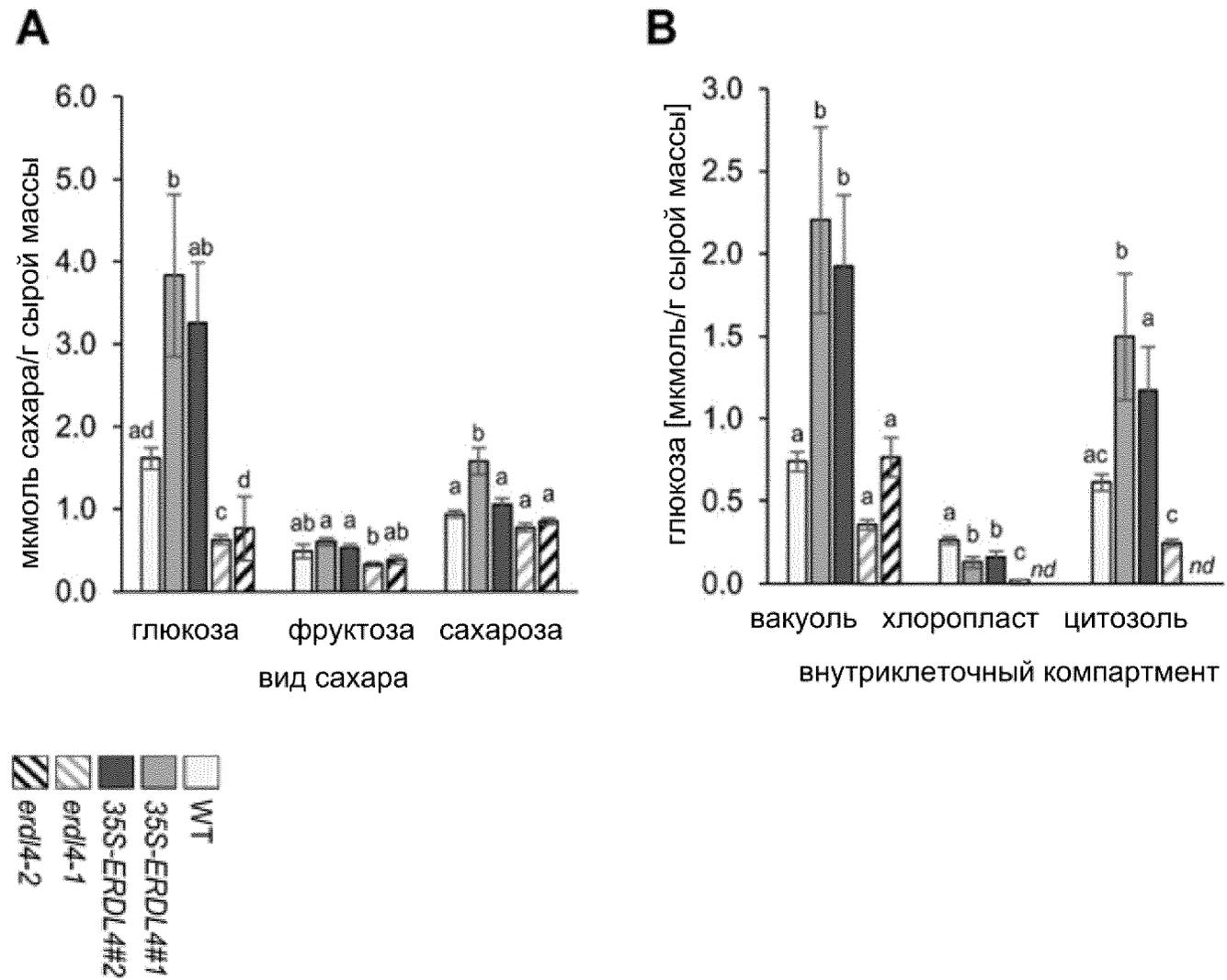


Фигура 7

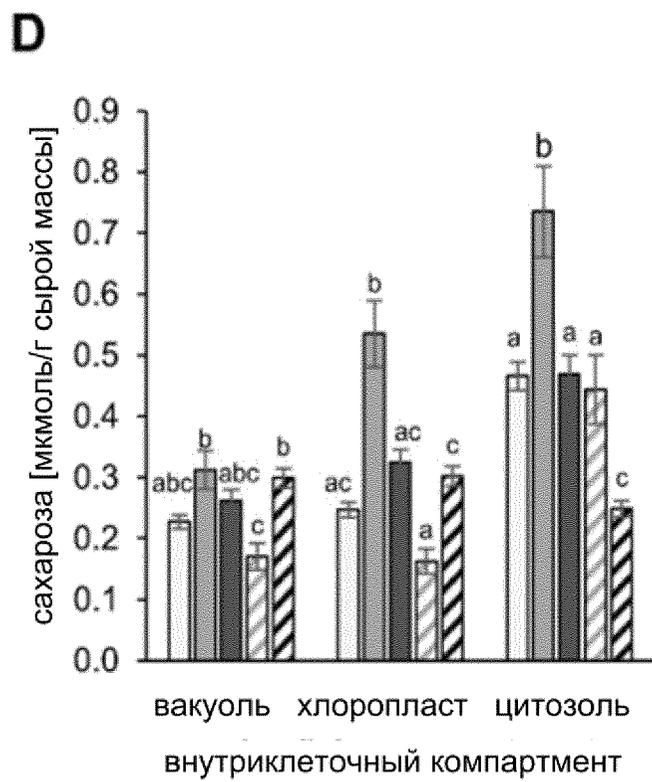
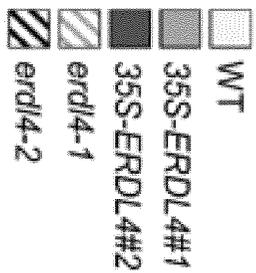
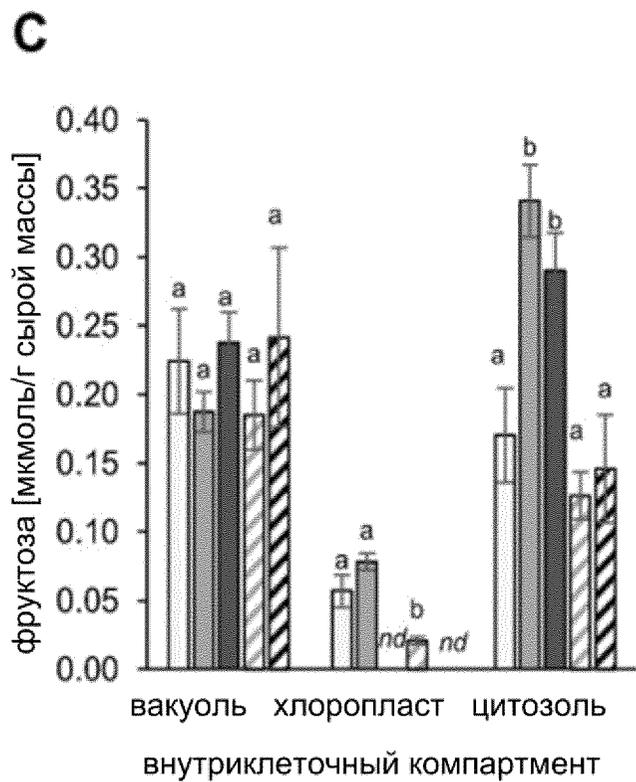


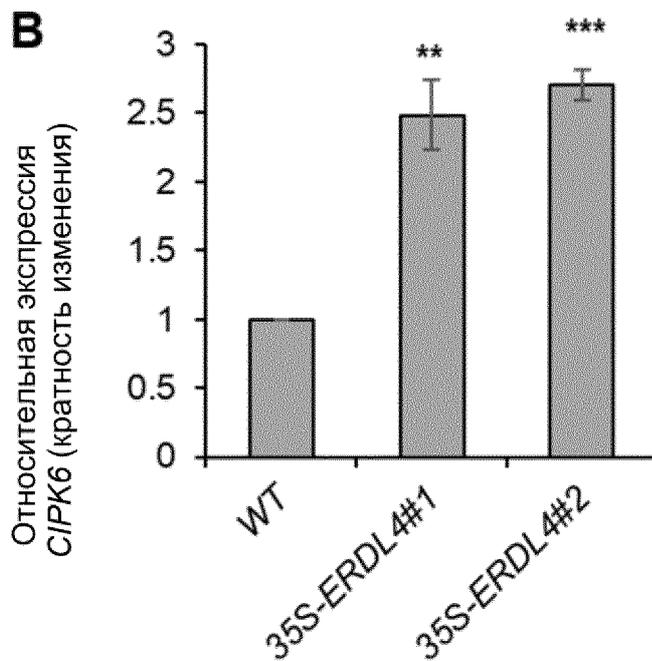
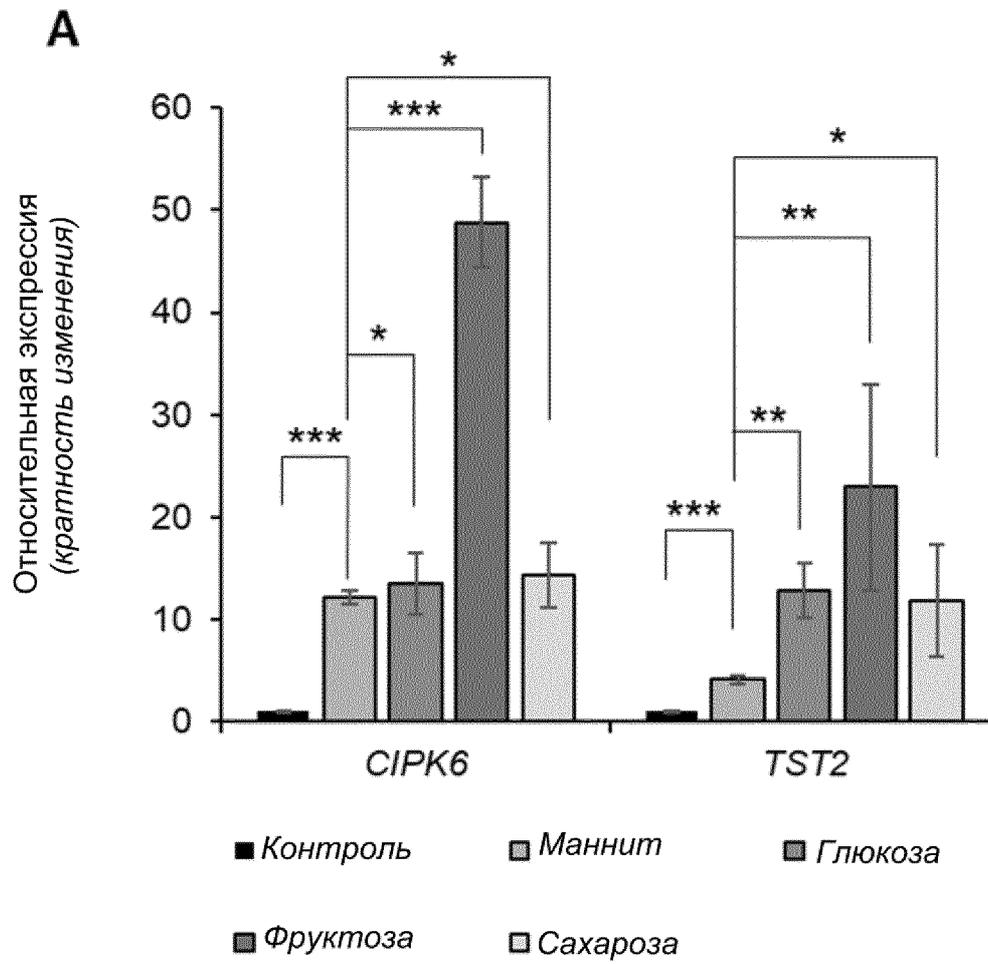
Фигура 8

Фигура 9

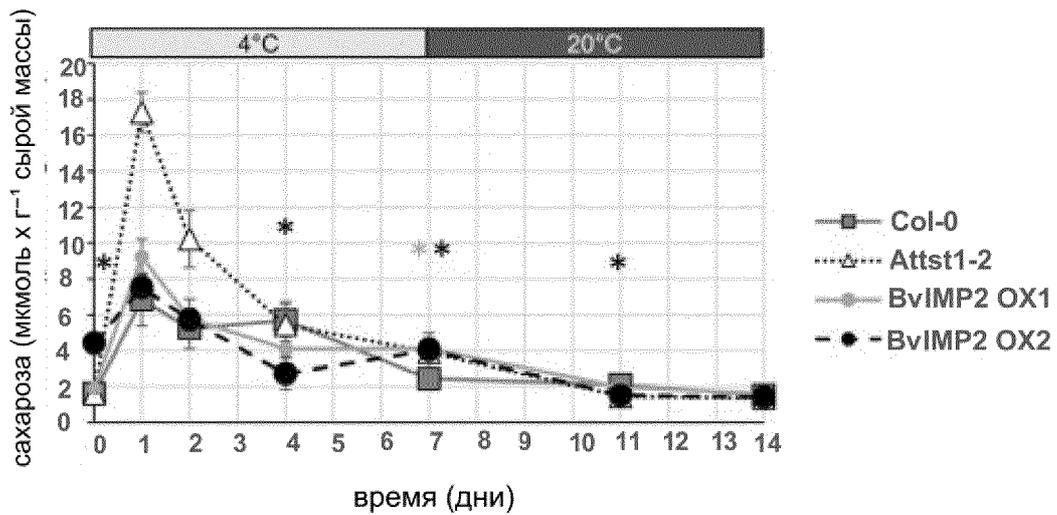
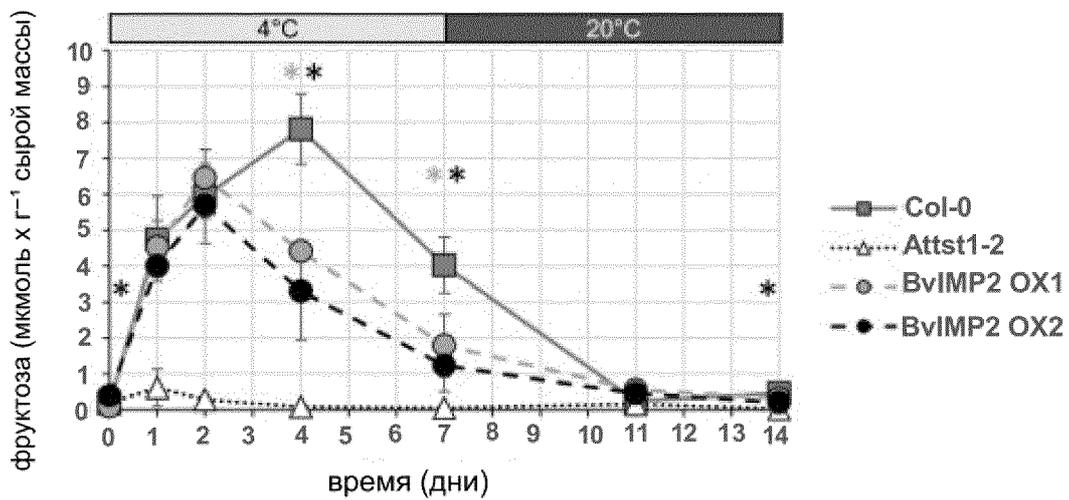
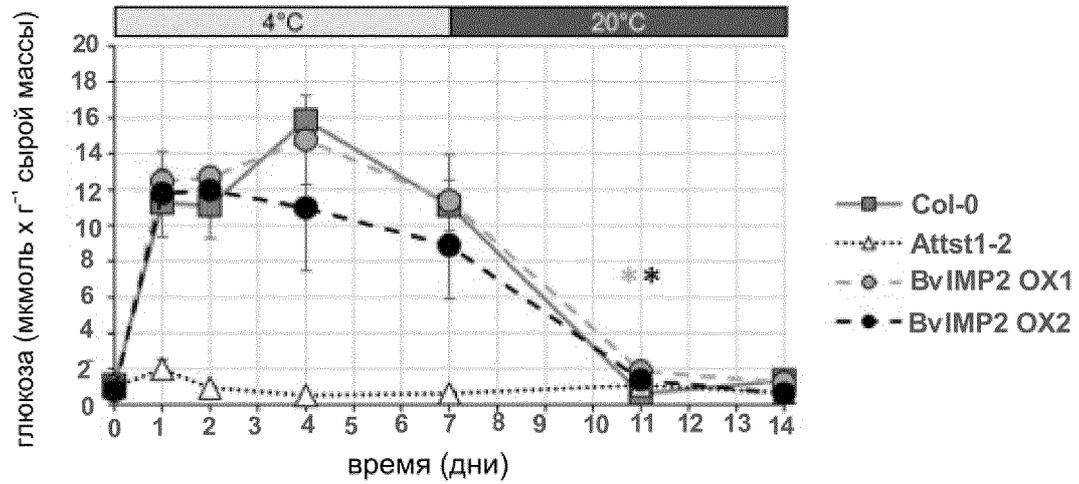


Фигура 9 (продолж.)

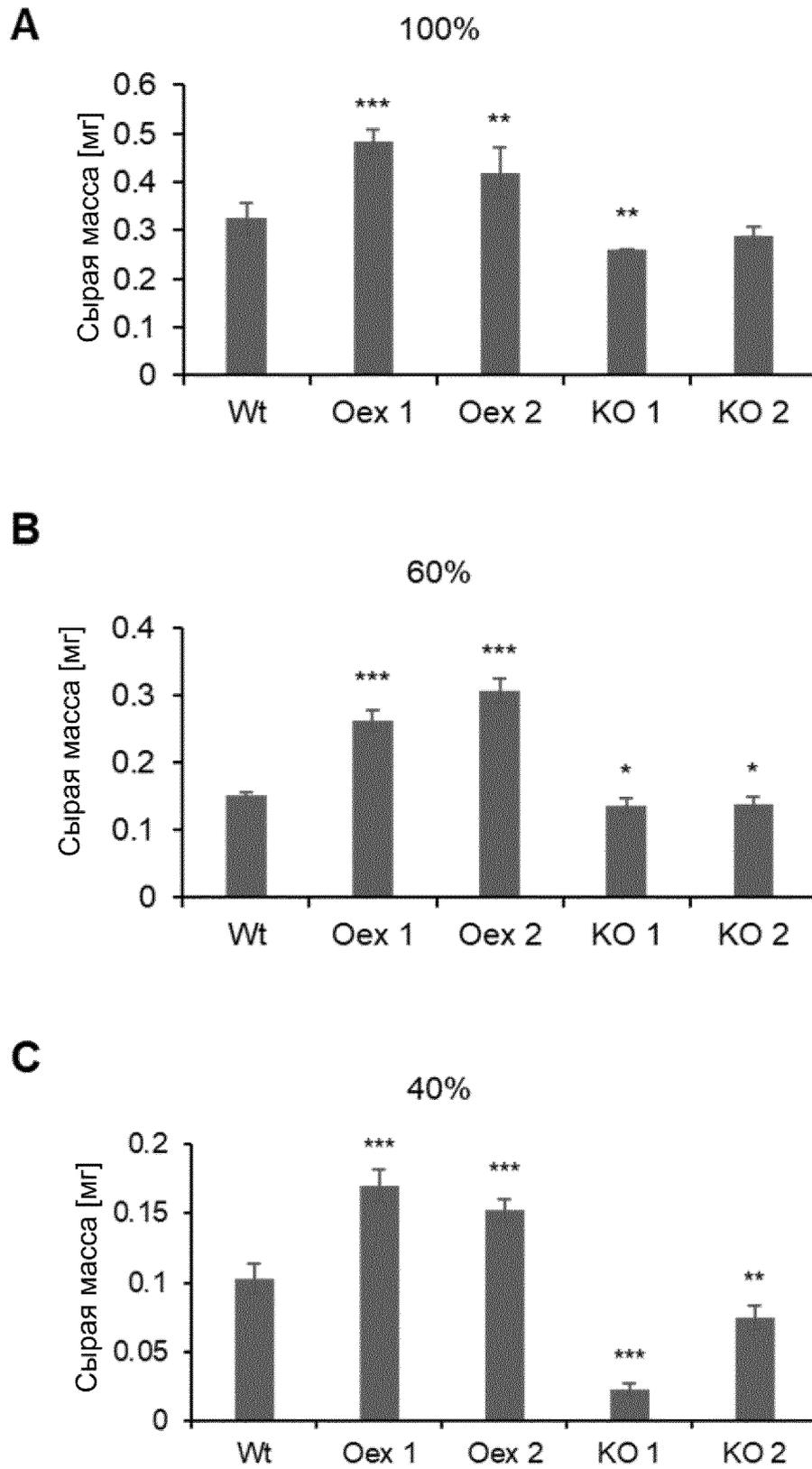




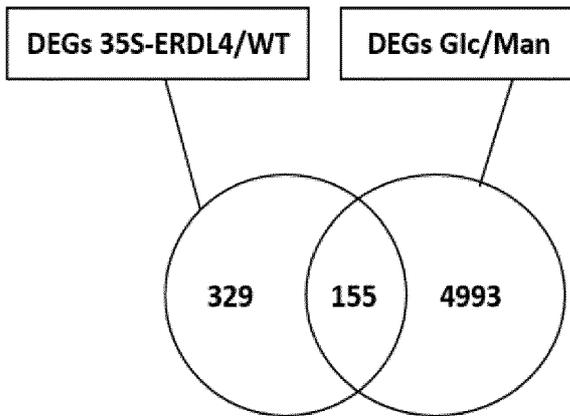
Фигура 10



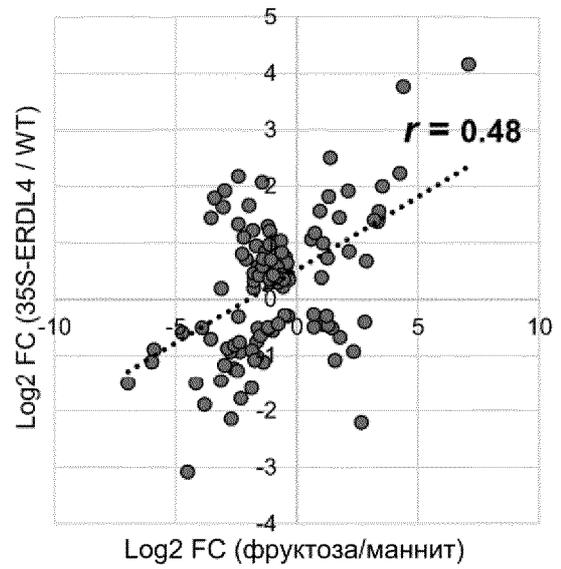
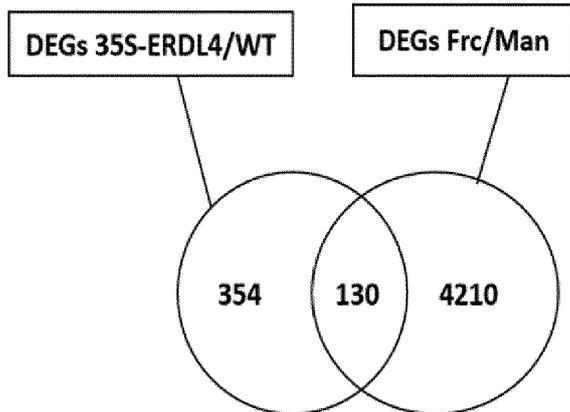
Фигура 11



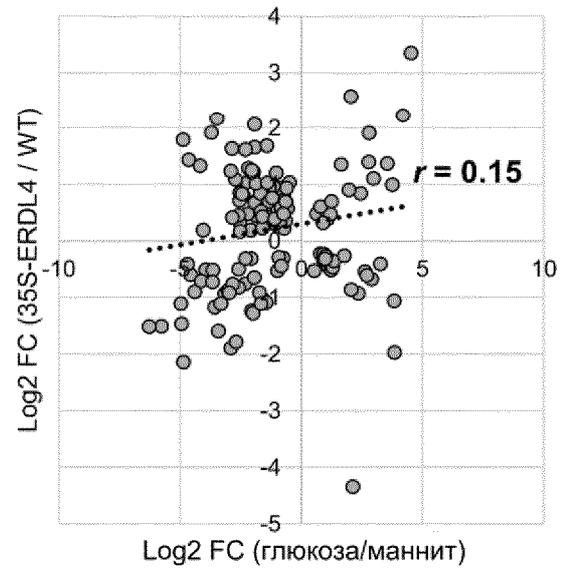
Фигура 12

A**B**

35S-ERDL4/WT vs Frc/Man

**C****D**

35S-ERDL4/WT vs Glc/Man)

**Фигура 13**

(SEQ ID NO:76)

CTGGCCCACT TTCAAAAATA CTGCCAAAAG CCAGCCACAT GGCAAAGTGT AGGATGCTCA TCCTACACAT
 CGGTGTAGGA TCTAATTTGC GCAACATGGG ACCCACAAAA CAAAACATTA AACTCCACGT GAGCTATGCA
 ATTGGATATT TAAAATTTTC TCATTTGTTT AACCAACCAT ATGGTGACAC ATGGCACAAA CTAATACAAT
 TACAAAAGTT TTCTATACTT CTTGTAACCG TTTAATGATC TTTTCTTAA AATTTTTTTA AAAAGATGGT
 AATAATTTAT TTTCTAACAA CTTTAATTTT TCTTTGTTTA TAGAATAATG AACCTAATAT TGGATATAAA 350

TCATAAACAA TCTTTTTTTT TTTTCATATGG AGCACCATCA ACGTCCCTTG TATGAGCATA TTGCGATATT
 GTATTTTAAT TTAAATATTA GCTTTTCATG TTGTATATTA ATTTTCATTT CATTTCCTTT TAATCAAACCT
 ATATATTACC ATTCAAAATA ATATTTTTTA AATATATAAA AAATTAATTT CTACATACAT AAATATGAAA
 AACATATAAT TTTTGTAAAT AATATTTAAT ATATGTGAAT AATTTTCATC ATATAACTTT GATCATAATA
 TAAAACGAGT TTCACTTATT GACATGGAAA GCACCAAATA GTATGTAAAA AGTTGAATGC ATACCTCCAT 700

AAAAAGTTTC ATTATTGTCG GTGCTTATGG ACATAATTCT TAAAAATTAA AATAGCTTAC AAGCAGAGAA
 TAGATGATAG AGTGGAGAGT AGGGATGAAA ATGGATCAGG TTCGGGGTGG GTGGAGCTTC ACCCGTATCC
 ACCACTCGCA TCCATCCGCA CCACCCACAT CCATCCATCA CCCGCATAAG CCATTATCCA CATCCATCCA
 TCCGTATCC ATCGGGCGAA CGTGAGTTGG GTGGTTAACG AGTGATGATA TATATATAAC AATTTTTTACA
 AAAAATTATG CCATAAGATA CATACTATTT TTTTTTTAGT TGCAACGATT AGACATTTTA TACTCACACT 1050

TTATGTCTAA TAGTTGCAAC TAAAAAACA GAGGTACTAT TTATTTAAAT TTTCAACCA ATTATGTGAA
 ATTGATAATA TGAATGATAT GAGTGGGTGT TAATCGTGCA ATGGGTTGAG TGACAGATGA AAAGAAAGAG
 TACCCGCATC ATTATCCGTT TCATCTACTA CCTGCTTTTC ATACGTTTAT TTCAGGTTTT CACCTGCTTA
 ATAAAAGCGA GTTAAGCGGA TGATTTTGCA TCCCTGGTGG AGTGGTCATT GCCTCATAGG AGAACCTAAC
 TAGTATTATA ATTTGTACAT GAAGGGAAAA GAAAAAATCA GTCACATGTG ACATCAACCT CATTTATGAA 1400

AACTTCCAAG AAAGGATATT TGTTATCCTT CTTGACCTCC TCTCTCTCCT CTGTAAATCA AAATTATATA
 AACAAACACA ACAAGTAAGA CTCAATACAG GGTGGATCAG CCAAATAGA AAAACCAACA TTAAGAAAAG
 ATCACCATCA TCATCATCAA ATATCATCAA ACAACAGGA CCCCCATTT GTCGTAAGAC TCTTCATACT
 CACAATAAAA TAAACAAACA CAACAAACAT TGGCGCCAAA CAGCTAATTC CACCATCAAA TAACAAGAG
 ATCTACCCTC ATTTTTTTCT CTCTCTCTGA TTTACTACTC AATTTTGTTT CAACAAAACC CCCAAAAAAA 1750

AAGTGAAAAA ATGAGTAGCA GTGATGCGGA GGATGCGAGG GCGGAGCTCC GAAAACCGTT TCTTCATACG
GGTAGTTGGT ATCGGATGAG TACGGGTGGT GGAAAAGATC CGATTAGTAG TGGTAGTATG ATGATGGGTT
CAAGACAAPC TAGTATTTTC GGGTCTATPG CTAATATGCG TGAATCCGCC ATTTCCATTG TTTTCTGTGT
TTTTGTGTGT GCTTTGGGTC CCATCCAATT TGTTTCACC GTATGTTTTT TTTTCTTTT TTCTTTTTTC
TTTTTCTAT CTCCTTTTTC TTACTTTAT TTTATTTAAA GTTTGATTTT TTTTATGGT TTATGTTTTT 2100

GGCAGTGTGG GTATTCATCC CCAACTCAAT CCGACATCAT TAAGGATCTT GACCTTAAAG TTTCCGAGGT
 TTGAATGTTT TACATTTGAA TTTTATCAAG ATCGCCTATG ATTGTGTTTA ATTTCAAACCT TTGTTATGTA
 GTGTATATGT TAATTGTATA AAAACCCCAT TATATGATAA TTTGTGGTG TAAGAAAAAT GTTGCCTTTA
 GTTGTATGAT TGATTTTGA AGTGATTGAT GAAGTGATGA TGATGTTAAT GGAATTGACA GTTTCATTG
 TTTGGATCAT TGGCTAATGT GGGAGCAATG GTGGGGGCAA TTGCGAGTGG ACAGATTTCT GAATACATTG

GAAGAAAAGG GGTATGAGAT TTTACTCCCT TTCTATAAGT AGTGGATGAT ATAGTGTTTT TTACTGTATG
CCTGTATGGT TTCTAATCAT TGGATTTGTG TCGTAGTCAC CGTTTACTAA TGTCFCGAAA AGGGTCCAT
GGATAAGAAT AAGGTTCAAT TCATGTTTAT GTAGGGTGTT ATTTCATGAT TTCTAAAAGT ATGGGTGTGT
ATGCTTTTAA TTGCAGTCAT TAATGATCGC CTCAATCCCT AACATTATAG GATGGCTTGT CGTTTCATTT
GCGAGGGTAA GTGAATGAGT ATTGTTCTAT TTGTGTATCT TCCTAGTTGC TTATAAGCTT ATTCGATTTT 2800

TGCTTCTTAC TGCTGCTGTT TTTGTAGGAT GTCTCGTTT TTTACATGGG ACGCCTGCTG GAAGGTTTTG
GTGTTGGCAT TATTTCCCTAC ACGGTAAGAG TTGTTGAATT TGACTTCTTT TTGTTATGTT TGAGCAGATT
TTTTTTATAG TTTTCAGTGT AATTAGGTGC CTGTTTATAT AGCCGAAATA GCACCTCAA ACATGAGGGG
AATGCTTGGG TCAGTGAACC AGGTGATTTT CTGGTTTAC TTTAGTTGAT CATATTTCTC TATATGATAA
CTCCTCTGTC TTCAATGCTT AATGTCTGAA GACTGACTAG TGGAAATTTT TTTTCAGCTT GCTGTACCA

Фигура 14

TTGGCATAAT GATCGTTTAC CTGTTGGGAA TTTTTGTTGA GTGGAGAGCA CTTGCAATCA TTGGTATGCA
 ATTATTATAT GTATTTTTTTG TTAATTACTC CAAATGATTG AAGCAGCATA ATGTTTACAT AACTGGAATA
 GATATAACA TTTAAGGCTA ATACTGAGGT AAAGCTGCAG ACGGTCAGTA CTGAGAACAT CCCGGTAGAG
 TAAGTCTTCT ATATAGAGTT GTAGCTTGTG TGTTTAGCTT GATGGAGCCT GTAAGAGAAT CTATGTTGGC
 CTGCTGTATC TTAGAAGCAT AGGACTCGAA TAATCTTGA TCTGGAAAGG TATTCGGTCT TGGCATTTC 3500

TAATCGCATA AAGAGCTTAG TTTTGCGGGT GGGACAATAG AACCTGCGTG AAGTCTTCT GATGAACTTT
 TACCTGCTGC AGAGTGTAGT AGGCTAGTAG CTAGAAAAGG CTAATTAAAT GCTAATACTG TTCTCCATCG
 GATGGAGAGG AGGATTTTTT GTGGAGCCCG CGCCAAGTAG ATTAACTAAA ATGCCACCTC TCCACATTTG
 TAGTGGACAG TTCTCCAAAT AATCGTACTC AGCTAGCTTT GGCATAGAGT GTGGAGGTAA CTTCTATAAT
 GCAAGTCCTT CAGATCAATG ATGCTATAGC CTACAAGGGA TATATAGTGG GAGGAGGATA AATCCCATAT

CAGATGAAAA CTTGTATTTT GGCAATAGTC ACTTCAGTAT AGCAACGGGC TGTGTTTTCC GCAGTGAACA
 GGGGACCGAC ATAAGTGAGT TTTTATCCAT CAAAGCCTCA GAAGTCAGAG CTGATCCAAA TGTATTTCTG
 ATCGATTGGC AACTTCAAAA CACAGGATAT TACTACAATA TCCTTGCCCTT ATTCTCTGCA ACTATTTCTA
 TCCATTGTTT ACATGTTTAA CTATTCTTGA TTCATGAGAT AACACGGGAT CTCAGTCTCA CAGACCAGGT
 CTTAGGTTCT GTTTGGTTTG ACGGGGAACA CAATAGCAAA TAAGTTGTTT TTTGTTTTGT TCTTTGCAAG 4200

AATAGTTAGA CAAAATGGAA AAGTGAAAAG GAGGGAGAAG ATGGATGAGA GAAGAGGAAG AAGCTAAGTA
 ATAGGGAGGA CAACATGGTA TTTCTTCTTT CATAAAGAGA AACGTGCATT CCTTCCTCA GAAGGGAAAT
 GTTTTTACC TTTAGAAAA CTATTCTAC CCATGGAAAA ACTACTTTC ACACTTACAA ACCAAACAAA
 GGAAAATAGG GAAACTGTCT TTCCTGAAA TGTTTTCCAT CCAACTAAAC ACTCGTTGGA GGAGAAACAT
 CAGGTCTGGA CAAGCCTATC TCCGTCTTGA TGGAGGACTT GTTTGTGTGA TAAAAATTG ACCATTGTTT

TGATGTAAAC TCACTATGAC CCTGTACTGA ATGGTATATG TAAGTCTTGC ATCTTATTTA TGTAGGAAGC
 TTTTTCCCAT GCAGATATAC ATCATTTCCT CTTTGAAGGA CACAACCGAA TGAACCTCT AGATPCTGAA
 ATTTCTTCTC ATGCTTTGCA GGAATCCTAC CTTGCGCTGC GTTGATACCT GGATGTTTT TCATACCAGA
 ATCTCCTCGC TGGCTGGTCA AAACCTGTTA ACATGCATGT TTATTAAGCC TTTCTTTATT ATGATATATC
 ATATTCTGAC TTTTCTTCC TTGCCTTCT CAGGCAAAA TGGGGATGAT GGAAGAATGT GAAGCGTCTT 4900

TGCAAGTTCT GAGAGGATTC GATACAGATA TCTCGATTGA AATGAATGAA ATCAAAGTAT TCAGTTGAGC
 TTTTTCATAG TTGATAACA ATATATATTT ATCTTGTTTT GCTGTGCGA GTCCTTAACT AAATTGATGC
 ACTGCAGAAA TCTGTGGGAT CATCCAGCAA AAGAACAACA ATTAGCATT CACATCTCAA GAGAAAAAGA
 TATTGGTTCC CATTGATGGT ACAACGGTTT GTTTGGGACT ATGATTTTGT GTTTCCATTA TCAACCTTCA
 AAACATTTTA TTTCTCGTCT AATGCTCAAT TGACATGTTG CAGTTAGGAA TCGGATTACT TTTGCTTCAG

CAGCTCTGTG GTATTAATGG AATATTGTTT TACTCCCGCA CCATATTTGA AATGGCAGGT TAGAATCATC
 TAGTAACTGA ATCTGGACTT CAAGGGTGAA TTCCTGTCAA TTTTCTAAGC AAAAGATACA CAACACGTTT
 TCTTTCCAAA AGATTTGGAA ATTAAGTAGC CACAAATGGC ACAAGCCCT AAGATAGGGA AAGATAAGGA
 CACCCCGACC CGAAAGAAAC CTCATTTGTT AAGAAGGTAG GTGATAAATT ACCCATGAAG GAAATCACCA
 CAATACCCCA GCTTGGGATG ACAAGATTCG AACTCCCAAC TTCATGATT GGAGGTGCAA GTTATCGATA 5600

TTAGGCCTAG CTGAATTGAA TCTCTGAAA AAATTCAAAA GTTAAAGCAA ATATGTCCTT AAAGTTGTGA
 TCTTTGCTTC AATTTATTAG TATGAACATC TTTAATTAC CACAACTGG ACAGGAATAT CTGAGGGTGC
 TGTCGCCACA TTTGGTCTTG GAAGCATTCA GGTGACTAAA TCTAATCTAA GTTCCTTTTT CTATTTTTT
 TTTTGTGAT AGTAGTAAA TCAACCTTC ATCTTCTGG CAACTAAAC AGGTGGTTG TACTGGAGTT
 GCCACTTGGC TGATGGACAG GGCTGGCCGA AGGTTCTTCT TTATAGTATG TTCTGAAATA TAACCTTCAT

CTGGTGTGT GGTACTATTC ATGGATGGAA TTAGAGTAAA CGAGTTTTGA ATCTTTACAG GATCCTCTG
TTGGAATGAC TGCTAGCCTC CTCCTAGTTT CAGTCGCATT TTATCTGGAG GTCGGTATCA TTTTCTTCAT
 TTTGCATATG CAATACATCC AGCAAAGTTA GGTGCTATAC TGCTATATAT CATGTTTACA CTACTAGCA
 TTAATGAGCC AAATTCAAAT CTGTGGGAAG TGGTAACTT GCAAAGTCTG GGATCACAAC TCGTTTCTAT
 CTTGTGTCCC ACCTCATATT TCATTGGACA TATCACCAGC GTACAAGCAA TAATCTAGTG TTATCGCCTT 6300

Фигура 14 (продолж.)

CTTAGTAGAT GCAGATGATA TGGGATAATA AGATAAGGCG TTACATGATG TGTACAATG GGATAGAGTA
 ACTAAACTAG AAGAATAAAG GACCCCTCTT CCAGGGTTAC TATTTACTGC TAGCCTGCTA GCCTGCTATT
 GACACCATCA TTGTGCATGA TTTCCCTCTC TAATATAGAA TTCGGTTGCA AGGCAGAAGA GACCGTATAT
 GTTGATGTAG TGGATGACTA TAAGTTCCTA AAATTTTGCT TGCTATTTA TGCCTCCTGC TGTCTACATT
 GTTGACAGAC CATCGTACCA AAAGACTCGG CATTGCACAG CACGTTGGGC ATTCTCTCTG TCGTAGGCCCT

CGTGGTATTG CTTCTAACTC TAATTCATC ACCACTCAGA GGGGATCAAA AAATTTAAAAG AACAAAGAAA
 AATGAAATTA TATTAAGCAG ATTTAAGACT TGGCTTCTTC TATCTGTGGC AGGCAATGGT GGTTCCTTT
 TCTTTGGGAA TGGGACCCAT TCCTTGGCTT ATAATGTCTG AGGTATGCTA ATTCATCTAT ATGTCTAAAC
 CATGTTATAT GGAATCTAAT TTTGCATGAC CTTGGGCTGC TCACTTCGA AGCTATAGCA AGTATATTAT
 ATCATGCATT TTGCAATTAA CCACTTGCTC CTTTTATTTT CGTTTAACCA GATACTTCCA GCTAGTATAA 7000

AAGGCCTTGC TGGCAGTGTA GCAACAATGG CGAACTTCTT AACTTCCTGG GGTGTCACTA TGACTGCAAA
 CTTGCTGCTC GGCTGGAGTA GCGGAGGTGA ATCTTTTTAT GGCTTCTTCT CTTTACCTTA TTTTACTTTG
 GCAAACTGA TAATTACTGC TTTCCAAGGA AAAAAATGAT TATTGCTGAA ACTGTTTTAT TAGTATTAGA
 TTAGTTCTTC CCTATTGTAT TTGAAAGCAT CTTGTGTTA TAGCATTATA ATCTCCTGAT TAATTCTGAA
 TCTCCAATCC TTTGCAGGAA CCTTTACAAT TTACACATTT TTTGCTGCTT TTACTGTGAT ATTTGTGGCT

GCATGGCTTC CGGAGACAAA AGGAAAGACG CTCGAGGAGA TTCAAGCATA CTTCAGATAA **ATGCACAAGT**
TTGTGGTTAT CCCTACTTGG CATTTCATGA GCATTTTATG CAGCATACAC AGAAGACTGG AAGGTTAGAA
GATTACATTT GTTTTATAA GTATACAGAA AAGCTACTGC TTTTAAGAAA GCTGATTCTT GTATTTGGGA
CAACAATGCT ACTCTTCTT TTCATATCAT TTGATTCATC TCGGACTGT TGTACAAACA ATACGCTTTA
TACGCGTTCA TATGTATTAT TCAGATTCTG AAAAAGAAAA ATGCAAATAT GGAATTCCAT TCTTCGTAAT 7700

CTAATTCGCA CAGTTATTTT CACAAATTTA GACGGGGAAG CATTGTAGTC CCTTTGTCTA GAACTAATAG
 TCAGGTTGAC AGTGTACGTT GTTCGAACTG GTGCTGTAAC GAGTTAACGA CTAACCTGG AGTCTGAACA
 GAGGCACTGA ATCGGCTTAC TTGTGATCAG CTCCATCAGC ATAAACAGAA GCTAAGAAGC GCTTGAGACA
 TCTATTGTAC ACACACGGTC TCTCGAGGTG AACCAGATGG CCTGCCTTCT TTATACCTTC ATATGTCGCT
 TTTTCCCGA GTTTTCTGCA AATGTCATCA GGAAGTTGG AGCATAAGTT TAAGAACAGA ATTCCTTGCT 8050

AACACTGATT ATCAACATTA TACTCCATCC ACTTCTTTGT ATCTTTTTTA AGTGACCAAG GTTTTCAAAA
 ACTCTGCTTT GACTAGTGAT ATCTTATACA ATATGTTTGA GCCACTTTGA GGTTCCTAT GAA

Фигура 14 (продолж.)