



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119231** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
A01H 6/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2015 08604	(72) Винахідник(и): Сюй Гоуа (CN), Фань Сяожун (CN), Шень Цижун (CN), Міллер Ентоні (GB)
(22) Дата подання заявки: 05.02.2014	(73) Власник(и): ПЛАНТ БАЙОСАЙЄНС ЛІМІТЕД, Norwich Research Park, Colney Lane, Norwich, Norfolk NR4 7UH, United Kingdom (GB), НАНЬЦЗІН АГРІКАЛЧЕРАЛ ЮНІВЕРСІТІ, 1 Weigang Street, Nanjing City, Jiangsu 210095, China (CN)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 27.05.2019	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: PCT/CN2013/071384	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2009183270 A1, 16.07.2009) CN 101392257 A, 25.03.2009 WO 2008142036 A2, 27.11.2008 Feng H. Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. Journal of experimental botany, 2011, vol. 62, no. 7, p. 2319-2332 Guohua Xu et al. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. Annual review of plant biology, 2012, vol. 63, no. 1, p. 153-182 Tang Z. et al. Knockdown of a rice stelar nitrate transporter alters long-distance translocation but not root influx. Plant physiology, 2012, vol. 160, no. 4, p. 2052-2063
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 05.02.2013	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: CN	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.11.2015, Бюл.№ 21	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.05.2019, Бюл.№ 10	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/GB2014/050327, 05.02.2014	

(54) ТРАНСГЕННА РОСЛИНА**(57) Реферат:**

Винахід стосується способу підвищення росту, врожайності, коефіцієнта застосування азоту, транспорту азоту, стійкості до стресу азоту, стійкості до патогену, виживаності та/або поглинання азоту рослиною, за яким вводять та експресують конструкт нуклеїнової кислоти, що має цитозольний рН чутливий мотив VYEAIHKI. Винахід також стосується трансгенної рослини, способу одержання трансгенної рослини, способу зниження кислотності в рослині та застосування нуклеїнової кислоти, що містить рН чутливий мотив VYEAIHKI в регулюванні рН, в зміні нітратного транспорту та рН гомеостазі.

UA 119231 C2

Винахід стосується трансгенних рослин з покращеними характеристиками, наприклад, ростом та коефіцієнтом використання азоту, експресуванням гена нітратного транспортера, способів одержання таких рослин та способів покращення росту та коефіцієнта використання азоту.

5 Вступ

Глобальна врожайність помітно зросла протягом останніх п'яти десятиліть, головним чином, завдяки покращеним сортам сільськогосподарських культур та масивні внесення хімічних добрив, особливо азоту (N)^{1,2}. Однак, коефіцієнт використання добрив N становить тільки приблизно 30-50 % для багатьох зернових культур^{2,4} з великими відсотками втрати в навколишньому середовищі, що в результаті призводить до різних шкідливих впливів, таких як погіршення якості повітря та води та втрат біорізноманіття^{5,6}. Підраховано, що надлишок N в навколишньому середовищі на сьогоднішній день коштує Європейському Союзу від €70 мільярдів до €320 мільярдів на рік⁷. В Китаї, збільшення виробництва зерна протягом останніх 30 років супроводжується різким зниженням коефіцієнта використання N (NUE) від 55 до 20 кг зерна на кг добрив N, що застосовується³. В Азії, рис забезпечує більше, ніж 70 % від щоденного споживання калорій населенням, але, при цьому, земель, придатних для сільського господарства стає менше, а зростання потреби може регулюватися зростанням продуктивності.

Тому важливе значення має виявлення критичних кроків контролювання рослини NUE. NUE може бути визначений, як врожай зерна на одиницю доступного N в ґрунті (включаючи залишковий N, присутній в ґрунті та добривах). Таким чином, NUE може бути розділений на два процеси: ефективність поглинання (NupE; здатність рослини вилучати N з ґрунту у вигляді нітрату та іонів амонію) та ефективність застосування (NutE; здатність використовувати N, щоб одержати урожай зерна). Дана проблема є особливо актуальною для злаків, для яких великі кількості N добрив є необхідними для досягнення максимального врожаю, та для яких NUE, як оцінено, є набагато меншим, ніж 50 % (Hirel et al).

Азот (N) є фундаментом для розвитку сільськогосподарських культур, оскільки він формує основний компонент багатьох органічних молекул, нуклеїнових кислот та протеїнів. N харчування впливає на всі рівні функції рослин, від метаболізму до розподілу ресурсів, росту та розвитку. Найбільш багатим джерелом для одержання N корінням рослин є нітрат (NO_3^-) в природних аеробних ґрунтах, завдяки інтенсивній нітрифікації використовуваного органічного та добривного N. На відміну від амонію На відміну від цього, амоній (NH_4^+) є основною формою доступного N в заливних рисових ґрунтах через анаеробні умови ґрунту (Sasakawa i Yamamoto, 1978).

Таким чином, неорганічний азот (N) ґрунту переважно є доступним для рослин у вигляді нітрату в аеробних гористих місцевостях та добре дренованих ґрунтах, та у вигляді амонію в погано дренованих ґрунтах та заливних анаеробних рисових чеках. У багатьох рослин нітрат, одержаний корінням, транспортується в пагони перед тим, як засвоюється (Smirnoff i Stewart, 1985). На відміну від цього, амоній, одержаний з відновлення нітрату або безпосередньо із захоплення амонію, переважно споживається в корені та потім транспортується в органічній формі в пагон (Xu et al., 2012). Для того, щоб охопити різні концентрації нітрату в ґрунтах, коріння рослини розвинуло, щонайменше, три системи захоплення нітрату, дві транспортні системи з високою спорідненістю (HATS) та одну транспортну систему з низькою-64 спорідненістю (LATS), відповідальні за надходження нітрату (Crawford i Glass, 1998). Конститутивний HATS (сHATS) та індукований нітратом HATS (iHATS) працюють, що засвоювати нітрат при низькій концентрації нітрату в зовнішньому середовищі з насиченням в діапазоні 0,2-0,5 мМ. На відміну від цього, функції LATS в поглинанні нітрата при більш високій зовнішній концентрації нітрата 68. Поглинання LATS та HATS опосередковується нітратними транспортерами, які належать до родин NRT1 та NRT2, відповідно (Forde, 2000; Miller et al., 2007). Поглинання корінням регулюється негативним зворотним зв'язком, що зв'язує експресію та активність поглинання нітрату з N статусом рослини (Miller et al., 2007). Декілька різних N метаболітів були запропоновані для того, щоб бути клітинними сенсорами N статусу, включаючи глутамін (Fan et al., 2006; Miller et al., 2008), та одна модель має кореневий вакуолярний нітрат як зворотний сигнал, оскільки дані запаси збільшуються з N статусом рослини.

Хоча вищі рослини мають здатність використовувати органічний N, вважається, що основними джерелами для поглинання N корінням є NO_3^- та NH_4^+ . Рослини суттєво відрізняються за своїми відносними адаптаціями до даних двох джерел N. Незважаючи на те, що NH_4^+ повинен бути переважним джерелом N, оскільки його метаболізм потребує менше енергії, ніж метаболізм NO_3^- , тільки декілька видів фактично виконують добре, коли NH_4^+ забезпечується як єдине джерело N. Серед останніх знаходяться північні хвойні дерева, верескові види, деякі

овочеві культури, та рис (*Oryza sativa* L.). На відміну від даних видів, у більшості сільськогосподарських видів з часом розвиваються симптоми токсичності на NH_4 , таким чином, надзвичайний ріст у даних видів здається від NO_3^- . Однак, коли обидва джерела N забезпечуються однаково, ріст та врожай часто є значно підвищеними порівняно з ростом або

від NH_4 , або від NO_3^- поодиноці (Kronzucker et al., 1999).
 Рис, основна сільськогосподарська культура, яка споживається майже 50 % населення в світі, в наслідок цього, відрізняється від інших сільськогосподарських рослин тим, що вона здатна рости виключно з NH_4 як єдиним джерелом N. Рис традиційно культивують в анаеробних умовах заливного ґрунту, де амоній є основним джерелом N. Однак, пристосовані клітини аеренхіми в коренях рис можуть переносити кисень з пагонів до коріння та вивільняти його в ризосфері, де може відбуватися бактеріальне перетворення амонію в нітрат (нітрифікація)⁸. Нітрифікація в ризосфері затопленого рисового поля в результаті може призвести до 25-40 % від загальної сільськогосподарської культури, що споживає N в формі нітрату, в основному за рахунок транспортної системи з високою спорідненістю (HATS)⁹. поглинання нітрату опосередковується спільним транспортом з протонами (H^+), що може бути екструдований з клітини через мембрани плазми H^+ -ATPases¹⁰. Молекулярні механізми поглинання нітрату та транслокації в рис є повністю не зрозумілими. Оскільки концентрація нітрат в ризосфері рисових чеків, як оцінюється, становить менше, ніж 10 мкМ (Kirk і Kronzucker, 2005), мембрани родини NRT2 відіграють основну роль в поглинанні нітрату в рисі (Araki і Hasegawa, 2006; Yan et al., 2011). Крім того, коріння рису має велику кількість аеренхіми для транспортування кисню в ризосферу, що в результаті призводить до нітрифікації амонію бактеріями на поверхні кореня (Kirk, 2003; Li et al., 2008). Таким чином, аж до 40 % від загального N, що засвоюється корінням рису, який росте в заболочених умовах ділянки, може знаходитись в формі нітрату, та швидкості поглинання можуть бути співставимими з тими, що у амонію (Kronzucker et al., 2000; Kirk і Kronzucker, 2005).

Як електрофізіологічні, так і молекулярні дослідження показали, що поглинання нітрату за рахунок як HATS, так і LATS є активним процесом, опосередкованим протон/нітратними спів-транспортерами (Zhou et al., 2000; Miller et al., 2007). В геномі арабідопсису, існує, щонайменше, 53 та 7 членів, які належать до родин NRT1 та NRT2, відповідно (Miller et al., 2007; Tsay et al., 2007). Декілька арабідопсисних членів родини NRT1 та NRT2 були охарактеризовані щодо їх функцій в поглинанні нітрату та транспортуванні на довгі дистанції. AtNRT1 (CHL1) описується як трансцептор, який відіграє різноманітні ролі, як нітратний транспортер з подвійною афінністю, та сенсор концентрації постачання зовнішнього нітрату (Liu і Tsay, 2003; Ho et al., 2009; Gojon et al., 2011), та транспортування ауксину при низьких концентраціях нітрату (Krouk et al., 2010). На відміну від цього, AtNRT1.2 (NTL1) конститутивно експресується нітратним транспортером з низькою афінністю (Huang et al., 1999). AtNRT1.4 є черешком листка, експресованим нітратним транспортером, та відіграє критичну роль в регулюванні нітратного гомеостазу листка та розвитку листка (Chiu et al., 2004). AtNRT1.5 експресується в кореневих клітинах перичиклу близьких до ксилеми та є відповідальними за завантаження нітрату в ксилему для нітратного транспорту корінь-до-пагона (Lin et al., 2008). AtNRT1.6 експресується тільки в репродуктивних тканинах та є включеним в доставку нітрата від материнської тканини до раннього розвитку ембріону (Almagro et al., 2008). Функції AtNRT1.7 в флоемному завантаженні нітрату, щоб дозволити транспорт від старішого листя до молодшого листя, вказуючи, що ремобілізація джерело-до-витоку нітрату опосередковується за допомогою флоєму (Fan et al., 2009). AtNRT1.8 експресується переважно в клітинах паренхіми ксилеми в межах васкулатури та відіграє роль в поверненні нітрату з соку ксилеми (Li et al., 2010). AtNRT1.9 полегшує завантаження нітрату в кореневу флоему, підвищуючи транспорт в нижні частини коріння, та його нокаут збільшує ксилемний транспорт нітрату від кореня до пагона (Wang і Tsay, 2011).

Серед членів 7 NRT2 родини в арабідопсисі, як AtNRT2.1, так і AtNRT2.2 були охарактеризовані як учасники в iHATS (Filleur et al., 2001). Крім того, активність транспорту NRT2.1 потребує другий додатковий протеїн NAR2.1 (або NRT3.1) в арабідопсисі (Okamoto et al., 2006; Orsel et al., 2006; Yong et al., 2010). Нокаут AtNAR2.1 (мутант atnar2.1) мало більш серйозні ефекти як на поглинання нітрату при низьких концентраціях нітрату, так і на ріст, ніж нокаут його партнера AtNRT2.1 (atnrt2.1 мутант) припускаючи інші функції для AtNAR2.1 (Orsel et al., 2006). Цікаво, що AtNRT2.7 експресується, зокрема, в вакуолярній мембрані репродуктивних органів та контролює вміст нітрату в насінні (Chopin et al., 2007). Недавно, було знайдено, що AtNRT2.4 є високоафінним нітратним транспортером плазматичної мембрани, експресованим в епідермісі бічних та в межах або поблизу флоєми пагона (Kiba et al., 2012). AtNRT2.4 є включеним в поглинання NO_3^- коренем при дуже низькій зовнішній концентрації та в пагоні NO_3^- завантаження в флоему, та є важливим при N голодуванні (Kiba et al., 2012).

В геномі рису були ідентифіковані п'ять NRT2 генів (Araki і Hasegawa, 2006; Cai et al., 2008; Feng et al., 2011). OsNRT2.1 та OsNRT2.2 спільно володіють ідентичною послідовністю кодуєчої ділянки з різними 5- та 3-нетранскрибованими ділянками (UTR) та мають високу подібність до NRT2 генів інших односім'ядольних, у той час як OsNRT2.3 та OsNRT2.4 є більш тісно пов'язаними з генами NRT2 арабідопсису. OsNRT2.3 мРНК фактично є сплайсованим в два генних продукти, OsNRT2.3a (AK109776) та OsNRT2.3b (AK072215), з 94,2 % подібністю в їх передбачуваній амінокислотній послідовності (Feng et al., 2011, Yan et al., 2011). OsNRT2.3a експресується в основному в коренях та дана схема посилюється поставкою нітрату, тоді як OsNRT2.3b слабо експресується в коренях та у відносно великій кількості в пагонах за відсутності будь-якого ефекту N форми та концентрації на кількість транскрипту (Feng et al., 2011, Feng 2012).

CN101392257 показує аналіз експресії OsNRT2.3a та b в рисі та *Xenopus* ооцитах та відмічає надекспресію OsNRT2.3 гена в рослинах. CN101392257 не розкриває окрему експресію OsNRT2.3a та OsNRT2.3b в рисі також він не показує, що експресування OsNRT2.3b в рослинах, інших ніж рис, які суттєво відрізняються у використанні джерел N можуть мати позитивні ефекти.

Існує необхідність забезпечити більш ефективні генотипи поживних речовин для сільськогосподарських рослин, щоб забезпечити збалансоване виробництво сільськогосподарських культур для глобальної продовольчої безпеки та зменшення витрат та негативних впливів на навколишнє середовище від введення мінеральних добрив, таких як якість повітря та води, та втрата біорізноманіття. Представлений винахід спрямований на вирішення даної потреби.

Суть винаходу

Рисовий транспортер OsNRT2.3 має дві сплайсовані форми. Деякі нітратні транспортери потребують два гени функції; другий набагато менший компонент (OsNAR2i) є потрібним для коректного націлювання транспортерного протеїна на плазматичну мембрану. Одна з двох сплайсованих форм, OsNRT2.3a, потребує даний другий компонент функції, в той же час інша форма, OsNRT2.3b, не потребує. Ми вперше продемонстрували, що експресія як нітратних транспортерів в *Xenopus* ооцитах показала, що тільки OsNRT2.3b мав рН-чутливий регуляторний сайт на цитоплазматичній поверхні протеїну. Даний рН чутливий сайт був підтверджений сайт спрямованим мутагенезом гістидинового амінокислотного залишку (H167R) в рН чутливому мотиві. В рисі, OsNRT2.3b був більш конкретно локалізованим у васкулярній тканині, зокрема, флоємі. Тому ми пропонуємо розглянути, що протеїн є специфічно включеним в транспорт на довгу дистанцію в межах рослини, та, що флоєма є важливою в регулюванні рН по всій рослині.

Ми надекспресували, незалежно, як OsNRT2.3a/b гени, так і H167R мутовану форму OsNRT2.3b, застосовуючи сильні неспецифічні конститутивні промотори (35S та убіквітін) в декількох різних китайських сортах рису. Ми показали, що тільки рослини з надекспресуючим OsNRT2.3b показали значно покращений ріст та коефіцієнт використання азоту, та, було несподіваним, що фенотип для поглинання як нітрату, так і амонію, був підвищеним в даних рослинах з надекспресуючим OsNRT2.3b. рослини з надекспресуючим OsNRT2.3b показали меншу фотореспірацію та, як правило, мали краще рН регулювання (вміст заліза та фосфату) відносно контролів або рослин з надекспресуючим OsNRT2.3a. рН чутливий мотив OsNRT2.3b є важливим для даних ефектів в рисі шляхом зв'язування рН статусу рослини щодо постачання нітрату.

Ми також несподівано показали, що OsNRT2.3b є функціональним, та коли є трансгенно експресованим в рослинах, інших ніж рис, хоча дані рослини, такі як арабідопсис, пшениця та тютюн, принципово відрізняється в їх застосуваннях джерел азоту.

Як може бути видно з наступного розкриття, винахід має декілька аспектів. В деяких аспектах, винахід стосується способів, застосування та рослин, в яких рис конкретно не признається. В інших аспектах, винахід стосується способів, застосування та рослин, в яких експресія нуклеїнової кислоти OsNRT2.3b регулюється специфічним промотором флоєми. В інших аспектах, винахід стосується способів, застосування та рослин, що не експресує трансгенно послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 2 або її функціональний варіант.

Таким чином, в першому аспекті, винахід стосується способів підвищення одного або більше з росту, врожайності, транспорту азоту, NUE, поглинання азоту, зниження фотореспірації, підвищення рівнів міжклітинного CO₂, підвищення ефективності фотосинтезу, стійкості до патогену, виживаності та підтримання/покращення рН гомеостазу, який включає введення та експресування конструктору нуклеїнової кислоти, що містить SEQ ID No. 1, її функціональний

варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині.

В другому аспекті, винахід стосується способу підвищення одного або більше з росту, врожайності, коефіцієнта використання азоту, транспорту азоту, стійкості до стресу азоту, стійкості до патогену, виживаності та/або поглинання азоту рослиною, який включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, який містить послідовність нуклеїнової кислоти, як визначено в SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, в якій, якщо послідовність нуклеїнової кислоти є такою, як визначено в SEQ ID No. 1, функціональний варіант, його частина або гомолога, зазначена рослина не є рисом.

В третьому аспекті, винахід стосується трансгенної рослини, експресуючої конструкт нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, як визначено в SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, в якій, якщо послідовність нуклеїнової кислоти є такою, як визначено в SEQ ID No. 1, зазначена рослина не є рисом.

В іншому аспекті, винахід стосується способу регулювання рН гомеостазу, який включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка включає SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині.

В іншому аспекті, винахід стосується способу зниження підкислення в рослині який, включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка включає SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині.

В іншому аспекті, винахід стосується способу зміни нітратного транспорту та рН гомеостазу в рослині, який включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка включає SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, в якій зазначена нуклеїнова кислота містить мутацію в рН чутливому мотиві VYEAHNKI (SEQ ID No. 16). В іншому аспекті, винахід стосується застосування нуклеїнової кислоти, яка включає SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, який включає рН чутливий мотив VYEAHNKI (SEQ ID No. 16), в регулюванні рН, зміні нітратного транспорту та рН гомеостазі в рослині.

В наступному аспекті, винахід стосується способу підвищення одного або більше з росту, врожайності, коефіцієнта використання азоту, транспорту азоту, стійкості до стресу азоту, стійкості до патогену та/або поглинання азоту рослини, який включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, як визначено в SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, в якій зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний промотор або специфічний промотор флоеми, та де зазначена рослина не надекспресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка включає SEQ ID No. 2.

В іншому аспекті, винахід стосується способу одержання трансгенної рослини, яка має підвищений ріст, врожайність, транспорт азоту, поглинання азоту, стійкість до стресу азоту та/або коефіцієнт використання азоту, який включає

а) введення та експресування в рослині або рослинній клітині конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти як визначено в SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю, де зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний промотор або специфічний промотор флоеми, та, де зазначена рослина не надекспресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка включає SEQ ID No. 2.

В іншому аспекті, винахід стосується трансгенної рослини, яка експресує конструкт нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, як визначено в SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, в якій зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний промотор або специфічний промотор флоеми, та, де зазначена рослина не надекспресує послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID No. 2.

В іншому аспекті, винахід стосується трансгенної рослини, яка експресує конструкт нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, як визначено в SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний зі специфічним промотором флоеми, та пов'язаних способів.

Винахід додатково описується в наступних не обмежуючих фігурах.

Фігури

Фігура 1. Рослини з надекспресією Nipponbare фенотипу OsNRT2.3a та OsNRT2.3b.

(a) T2 рисові рослини в ґрунті рисового поля в вегетативному стані (60 днів), (b) Репродуктивні стадії (120 днів), (c) РЧ-ПЛР зі специфічними праймерами. (d) Вестерн-блотинг з моно-антитілом для визначення експресії протеїну, (e) гібридизація *in situ* РНК в HT та b-S6 з негативним контролем проби, р: флоема, х: ксилем; е: епідермальні клітини; м: мезофільні клітини. Поперечні перерізи становлять 5-6 см секції листка від кінчика першого листка рослин в (a). Масштабна лінійка = 10 мкм.

Фігура 2. Польові експерименти з лініями з надекспресією T2 OsNRT2.3b.

(a) Ріст ліній з надекспресією OsNRT2.3b b-U 1, b-U2, b-S2 та b-S6 з різними нормами внесення N добрив (травень – жовтень 2010, фотографії були зроблені 16^{ого} вересня 2010) на експериментальній станції Changxing, Zhejiang University. Застосування N показано в лівому кутку кожного знімку з китайською наклейкою, наданою в середині поля, (b) урожайність зерна в "a" умовах, (c) NUE в "a" умовах, (d) Великомасштабний експеримент, 1280 садженців кожного типу, перенесених в ґрунт рисового поля, (e) Врожайність зерна в умовах "d", (f) NUE для "d" умов. NUE: коефіцієнт використання азоту = g-врожайність зерна/g-застосованого добрива N. Значення є середніми \pm S.E (n=3). * знаходилась над символами, показуючи значний рівень (*p < 0.05) між трансгенними лініями та HT при однаковій нормі внесення N добрива, оціненій за ANOVA.

Фігура 3. Ефекти надекспресії OsNRT2.3b на транспорт в середину клітини $^{15}\text{NO}_3^-$ та $^{15}\text{NH}_4^+$ через корінь, ксилем NO_3^- та NH_4^+ , рН ксилем, рН підкислення флоєми за умови 2,5 мМ NO_3^- або NH_4^+ . (a) швидкість ^{15}N транспорту в середину клітини нітрату або амонію, (b) ксилем NO_3^- та NH_4^+ нітрату або амонію протягом 24 год. (c) рН соку ксилема при нітраті або амонію, (d) рН підкислення флоєми в нітраті або амонію, сік флоєми збирали за допомогою EDTA- Na_2^{16} . (e) рН підкислення флоєми в нітраті або амонію, сік флоєми збирали за допомогою комах. Значення є середніми \pm S.E (n=5). * знаходилась над символами, показуючи значний рівень (*p < 0,05) між трансгенними лініями та HT при однаковій обробці, оціненій за ANOVA. Символи зліва направо в a-d: HT, b-U 1, b-U2, b-S2, b-S6

Фігура 4. Ефекти надекспресії OsNRT2.3b на транспорт в середину клітини різних форм N при рН 4 та 6. Символи зліва направо: HT, b-U 1, b-U2, b-S2, b-S6.

(a) транспорт в середину клітини ^{15}N в $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ поставці, (b) транспорт в середину клітини ^{15}N в $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ поставці, (c) транспорт в середину клітини ^{15}N в $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ поставці. Значення є середніми \pm S.E (n=5). a, b, c літери знаходилась над символами, показуючи значну відмінність (p < 0,05) між трансгенними лініями та HT при однаковій обробці, оцінено за ANOVA.

Фігура 5. Функціональний аналіз OsNRT2.3b в Xenopus ооцитах.

(a) Двоциліндровий рН електрод, що реєструє цитозольний рН від OsNRT2.3b ін'єкції ооциту, оброблений 1 мМ нітратом (заштрихований стовпчик) та рН 8,0 сольовий розчин (сірий стовпчик) промивання, (b) Мембранний потенціал для 1 мМ нітрату (заштрихований стовпчик) для ооцитного експресування H167R мутанта OsNRT2.3b. (c) ^{15}N -поглинання нітрату ооцитами, ін'єкційно введеними з водою, OsNRT2.3b мРНКs та його H167R мутант, (d) ^{15}N - поглинання нітрату ооцитами, ін'єкційно введеними з водою та OsNRT2.3b мРНКs при різному зовнішньому рН протягом ночі. Значення є середніми \pm S.E (n=15). Клітини досліджували застосовуючи електрофізіологію, щоб бути живими після інкубаційного експерименту. * знаходилась над символами, показуючи значний рівень (*p < 0,05) оцінено за ANOVA.

Фігура 6. Дані щодо маси свіжої рослини (A) та довжини кореня (B), накопичення нітрату в тканині (C) для трьох ліній арабідопсису з надекспресуванням OsNRT2.3b порівняно з немутантним типом (HT). Символи зліва направо в (C) для корінь/пагон: 23b. 1, 23b.2, 23b.3, HT.

Фігура 7. Порівняння рослин тютюну з надекспресуванням OsNRT2.3b та HT рослин: аналіз фенотипу. Гетерогенність розвитку лінії з надекспресією T1 OsNRT2.3b в горщиках, заповнених піском. HT: *Nicotiana tabacum* сорт 89, T1 ріст покоління протягом 2 місяців в повному поживному розчині Хогланда з доданими 10 мМ нітрату.

Фігура 8. Порівняння рослин тютюну з надекспресуванням OsNRT2.3b та HT рослин: аналіз експресії. А) саузерн блотинг ліній з надекспресією OsNRT2.3b Kpn HindIII ДНК обробленого тютюну T1 покоління та Нуб проба застосовували для гібридизації Ld: маркер, Р: позитивний контроль, b-20 є негативним контролем. В) РЧ-ПЛР кДНК ліній з надекспресією OsNRT2.3b з T1 покоління та специфічний праймер OsNRT2.3b застосовували для ПЛР.

Фігура 9. Біомаса та NUE тютюну з надекспресуванням OsNRT2.3b ліній, які росли в горщиках, заповнених піском HT: *Nicotiana tabacum* сорт 89, T1 ріст покоління протягом 2 місяців в повному поживному розчині Хогланда з доданими 10 мМ нітрату. NUE=біомаса/загальне застосування N).

Фігура 10. Структура гена OsNRT2.3a/b (SEQ ID No. 2 та 1, пептид OsNRT2.3a/b являє

собою SEQ ID No. 3 та 4). Аналіз OsNRT2.3 геномної ДНК послідовності прогнозує інтрон для OsNRT2.3b, розташований між +190 п.о. (пар основ) до +280 п.о. з ATG для ініціації трансляції. Для OsNRT2.3a 5'-UTR є 42 п.о. та 249 п.о. 3'-UTR та для OsNRT2.3b 5'-UTR є 223 п.о. та 316 п.о. 3'-UTR. F означає специфічний прямий праймер для OsNRT2.3b та R є задовільняючим праймером для OsNRT2.3b.

Фігура 11. Рослини з T2 OsNRT2.3b надекспресією в Nipponbare сорті походженням з Hainan. а: T2 Nipponbare трансгенні рослини вирощували в Ledong на експериментальній станції Nanjing сільськогосподарського університету, провінція Hainan (грудень 2009- квітень 2010). статус поживних речовин ґрунту перед додаванням добрив становив: загального азоту (N) $1,0 \pm 0,2$ мг/г, загального фосфору (P) $0,4 \pm 0,1$ мг/г, загального калію (K) $39,5 \pm 2,3$ мг/г, $0,5$ мМ NaHCO_3 здатного до екстракції P (Olsen P) $23,1 \pm 4,1$ мг/кг, pH ґрунту – $4,4 \pm 0,5$ (номер відібраного зразку становив 6). Дата даного знімку була 28 лютого 2010, та рослини вирощували протягом 75 днів від пророщування за умови 75 кг N/га N ; b: волоть рослини; c: довжина волоті; d, e: кількість первинного та вторинного остюка; f: врожайність зерна. Значення є середніми \pm S.E (n=10), * вказує суттєву різницю між HT та рослинами з надекспресією при 5 % рівнях з одностороннім ANOVA аналізом. Символи зліва направо: HT, a-U1, a-U2, b-U 1, b-U2, b-S2, b-S6.

Фігура 12. фенотип ліній з надекспресією OsNRT2.3b в WYJ7 вихідному сорті, а: Експеримент в горщиках, зроблений в Nanjing 2010. T1 лінії 396-2, 369-1, 366-1 та 342-1 надекспресували з OsNRT2.3b порівняно з його немутантним типом (HT: WYJ7). Насіння було пророщене 20ого травня та знімок був зроблений 20ого жовтня перед збором врожаю; b: Саузерн блотинг T1 садженців. Потім лінії 396-2, 369-1, 366-1 та 342-1 переіменували в 396, 369, 366 та 342 для T2 польових експериментів; c: РЧ-ПЛР з праймерами, 26 циклів були представлені для даної ПЛР. d: T2 польові експерименти на експериментальній станції університету Zhejiang (травень 2011 - жовтень 2011) з двома рівнями застосування 110 та 220 кг N/га . Насіння було посаджене для проростання 5ого травня 2011, потім 100 садженців перенесли на рисове поле у вигляді 5 рядків x 20 рослин 5ого червня та розташували довільно. Добрива застосовували як на фіг. 2. Знімок був зроблений 10 жовтня перед збором урожаю. Статус поживних речовин ґрунту перед додаванням добрив становив: загального азоту (N) $1,68 \pm 0,21$ мг/г, загального фосфору (P) $0,48 \pm 0,18$ мг/г, загального калію (K) $46,47 \pm 2,85$ мг/г, $0,5$ мМ NaHCO_3 -здатного до екстракції P $38 \pm 2,1$ мг/кг, pH ґрунту $6,43 \pm 0,28$ (n=6); e та f: врожайність зерна та NUE. Значення є середніми \pm S.E (n=3), * вказує суттєву різницю між HT та рослинами з надекспресією при 5 % рівнях з одностороннім ANOVA аналізом. Символи зліва направо: WYT, 396, 369, 366, 342.

Фігура 13. Ефект надекспресії OsNRT2.3b в YF47 вихідному сорті, а: продуктивність росту рослини YF47 (немутантного типу) та трансгенної рослини з надекспресією NRT2.3b (YF/NRT2.3b(0)) в польових дослідженнях на Hainan експериментальній станції університету Zhejiang (грудень 2011 - квітень 2012). Насіння було посаджене для проростання 10^{ого} грудня та знімок було зроблено 1^{ого} квітня, за 15 днів перед збором врожаю; b: РЧ-ПЛР аналіз рівнів транскрипту NRT2.3b в YF47 (немутантному типі) та в трансгенних рослинах; c: Саузерн блотинг аналіз трансгенної рослини; d: врожайність зерна на рослину YF47 та трансгенні рослини. Значення є середніми \pm S.E (n=50). Статус поживних речовин ґрунту перед додаванням добрив становив: загального азоту (N) $1,5 \pm 0,2$ мг/г, загального фосфору (P) $0,3 \pm 0,1$ мг/г, загального калію (K) $3,5 \pm 0,3$ мг/г, $0,5$ мМ NaHCO_3 -здатного до екстракції P $24,1 \pm 4,7$ мг/кг, pH ґрунту $6,45 \pm 0,47$ (n=9). Зліва направо: WYJ, 296, 269, 266, 342

Фігура 14. T5 фенотип ліній з надекспресією OsNRT2.3b в Nipponbare вихідному сорті, а: T5 Nipponbare трансгенні рослини b-S2 та b-S6 вирощували на Ledong експериментальній станції сільськогосподарського університету Nanjing, провінція Hainan (грудень 2011 - квітень 2012), 300 насінин було посаджено для проростання 10^{ого} грудня, 5^{ого} січня 200 садженців перенесли на рисове поле. Знімок був зроблений 13^{ого} квітня перед збором урожаю. Розмір експериментальної ділянки становив $20 \text{ м} \times 25 \text{ м}$, 60 кг P/га та 110 кг K/га добрив було застосовано до рисового поля перед перенесенням рисових садженців. Застосовували два рівня N добрив 110 та 220 кг N/га до рисового поля. Перше N добриво застосовували як 20 % від загальної N обробки перед висадкою саджанців 28^{ого} грудня; друге застосування – 40 % від загального було зроблене 12^{ого} січня. Кінцеве застосування було зроблене 20^{ого} січня. b: врожайність зерна.

Фігура 15. фенотип F2 покоління Nipponbare (♀) x b-S6 T5(♂).

Фігура 16. відмінність фенотипу між рослинами з надекспресією OsNRT2.3b та HT в експериментах в горщиках на пізній стадії росту. Даний експеримент в горщиках проводили як описано в таблиці 1 та ріст реєстрували через 76 днів (a); 84 дня (b); 88 днів (c); 98 днів (d); 120

днів (е) та 140 днів після пересаджування (f). Врожайність зерна (g) загального N (h) і $NU_E = \text{маса зерна} / \text{загального N}$ (i) HT, b-S2 та b-S6 вимірювали через 120 та 140 днів, по окремоті. Значення є середніми \pm S.E (n=10), * вказує суттєву різницю між HT та рослинами з надекспресією в 5 % рівнях з одностороннім ANOVA аналізом. Знімки були зроблені тільки з HT та b-S6, тому що дві рослини легко розпізнавались порівняно з всіма трьома рослинами на знімку. Тому застосовували чорну тканину в якості фону та відокремлювали HT та b-S6 від b-S2, який знаходився позаду тканини в горщику.

Фігура 17. Спосіб відбору зразків соку флоеми з коричневих дельфацид (*Nilaparvata lugens*). Рисові садженці вирощували методом гідропоніки в 1,25 мМ NH_4NO_3 протягом 8 тижнів та потім переносили до обробок N (N: 2,5 мМ NO_3^- ; A: 2,5 мМ NH_4^+). Кожну рослину розташовували в 250 мл колбі з IRR1 розчином поживних речовин з шістьма рослинами, які утримували в коробці з комахами при 26° C та протягом 16 год. світлового періоду. Від семи до десяти коричневих дорослих дельфацид перенесли на кожну рослину на початку N обробок. Краплю меду рисової флоеми, виділену комахами, збирали через 24 год., 48 год. після N обробок. вимірювали pH соку флоеми, застосовуючи pH селективний мікроелектрод²²; а: pH флоеми в нітраті; b: pH флоеми в амонію. Значення є середніми \pm S.E (n=10), * вказує суттєву різницю між HT та b-S6 в 5 % рівнях з одностороннім ANOVA аналізом.

Фігура 18. pH апопласти кореня в лінії b-S6 з надекспресією OsNRT2.3b та HT після 72 год. N обробки. Рисові садженці вирощували в повному розчині поживних речовин, який містить 1,25 мМ NH_4NO_3 протягом 4 тижнів та потім переносили на N обробки (N: 2,5 мМ NO_3^- ; A: 2,5 мМ NH_4^+) протягом 72 год., а: pH апопласти рисових коренів. Після 72 год. N обробки, корінь рослини промивали шляхом занурення в 0,2 мМ $CaSO_4$ протягом однієї хвилини перед розташуванням на агарі¹⁷. Інтактну рослину розташуванням на агарі (0,9 г/л, що містить pH індикатор (0,03 г/л бромкрезоловий пурпурний¹⁷). Початковий pH становив 5,2-5,3 з 11:00-11:30 ранку, та коріння утримували в темноті, покривали вологою паперовою тканиною та під $0,5 \times 12 \times 12$ см³ плексигласовою пластиною, та знімок робили через 2-4 год. при контактуванні з pH індикатор агар.; b: Агарний профіль, який показує pH апопласти після видалення коріння; c: довготривала зміна pH гідропонного середовища для росту під час N обробок.

Фігура 19. Загальний листковий P та Fe в T2 Nipponbare рисі з надекспресуванням OsNRT2.3b, що росте в 1,25 мМ NH_4NO_3 гідропонної культури. Загальний P та Fe вимірювали за допомогою ICP аналізу. 0,05 г висушеного подрібненого рослинного порошкоподібного матеріалу обробляли 5 мл 98 % H_2SO_4 та 3 мл 30 % перекису водню. Після охолодження, оброблений зразок розбавляли до 100 мл дистильованою водою. Іонні концентрації в розчині вимірювали, застосовуючи ICP-OES (Perkin Elmer Optima 2000 DV). Значення є середніми \pm S.E (n=4), * вказує суттєву різницю між HT та рослинами з надекспресією в 5 % рівнях з одностороннім ANOVA аналізом. Символи зліва направо для P та Fe: HT, b-U 1, b-U2, b-S2, b-S6.

Фігура 20. Загальний фотосинтез, концентрація міжклітинного CO_2 та фотореспірація в рослинах з надекспресуванням OsNRT2.3b порівняно з HT. Фотосинтез, що спостерігається, концентрацію міжклітинного CO_2 та фотореспірацію вимірювали, застосовуючи Li-Cor 6400 інфра-червоний газовий аналізатор як описано раніше⁴¹, а: загальний фотосинтез розраховували за часом фотосинтезу, що спостерігається, виміряній площі листка; b: концентрація міжклітинного CO_2 ; c: Темна респірація, що спостерігалась (R_n) досягали під час CO_2 PIV реєстрування на стабільній стадії реєстрування від 100 до 200 секунд після вимикання світла, відповідно до додаткової фігури 4 з Kebeish et al, 2007²². Значення є середніми \pm S.E (n=4), * вказує суттєву різницю між HT та рослинами з надекспресією в 5 % рівнях з одностороннім ANOVA аналізом.

Фігура 21. Надекспресія мутанта OsNRT2.3b H167R в Nipponbare. а: F1 покоління рослин з надекспресією OsNRT2.3b H167R мутантних ліній OvH1, OvH2 та HT в експерименті в горщиках (травень 2012 - вересень 2012) всі системи посадки були такими ж, як в таблиці 1. знімок було зроблено 10^{го} вересня; b: маса зерна. Значення є середніми \pm S.E (n=60); c: РЧ-ПЛР з однаковими праймерами для OsNRT2.3b, що охоплює мутований сайт; d: саузерн блотинг.

Фігура 22. $^{15}N-NH_4^+$ поглинання ооцитами, ін'єкційно введеними з водою або OsNRT2.3b мРНК. 0,5 мМ $^{15}N-NH_4Cl$ (атом% ^{15}N 98 %) додавали до ND96 розчину, та ооцити інкубували протягом ночі (16 год.). Значення є середніми \pm S.E (n=15).

Фігура 23. Схема поля для експериментів, показана на фіг. 2a та фіг. 2d. T2 польові експерименти проводили на Changxing експериментальній станції університету Zhejiang. Щодо фіг. 2a рослини перенесли в праві блоки з чотирма N рівнями застосування: без азоту, 75 кг N/га, 150 кг N/га та 300 кг N/га; Щодо фіг. 2d, рослини перенесли в ліві блоки з додаванням 75 кг N /га. Розмір кожного експериментального блока становив 20 м x 30 м, та застосовували 60 кг

P/га та 110 кг K/га добрива до рисового поля перед перенесенням рисових садженців; b: N обробки в кожному блоці; c: план розташування рослин на фіг. 2a з таким же рядком та площею живлення на одну рослину як d; d: план розташування рослин на фіг. 2d. Всі польові експерименти проводили з трьома повторами, випадково розташованими.

5 Фігура 24. Таблиця, що показує передбачувані NRT2 нітратні транспортери, які мають pH-чутливий мотив, який був ідентифікований в OsNRT2.3b.

*найкращий кандидат для OsNRT2.3 ортологів

Бази даних для пошуків: пошуки послідовності Blast фитосоми 9

<http://www.фитосома.net/>

10 База даних пшениці:

http://www.cerealsdb.uk.net/CerealsDB/Documents/DOC_search_reads.php

База даних ячменю: <http://webblast.ipk-gatersleben.de/ячмінь/>

Аніонообмінні мотиви мембранних протеїнів (що містять pH сенсор), ідентифіковані, застосовуючи

15 http://www.bioinf.manchester.ac.uk/cgi-bin/dbbrowser/fingerPRINTScan/FPScan_fam.cgi

Фігура 25. Надекспресія OsNRT2.3b буде збільшити врівноважування pH флоєми. НТ, немутантний тип рисової рослини; b-S6, лінія з надекспресією OsNRT2.3b; лінія з надекспресією H167R, OsNRT2.3b H167R. pH флоєми вимірювали, застосовуючи pH selective електрод. Сік флоєми збирали, застосовуючи спосіб з коричневими дельфацидами (*Nilaparvata lugens*). Рисові садженці вирощували методом гідропоніки в 1,25 мМ NH₄NO₃ протягом 8 тижнів та потім переносили на N обробки (N: 2,5 мМ NO₃⁻; A: 2,5 мМ NH₄⁺). Кожну рослину розташовували в 250 мл колбу з IRR1 розчином поживних речовин з шістьма рослинами, які утримували в коробці з комахами при 26 °C та протягом 16 годинного світлового періоду. Від семи до десяти коричневих дорослих дельфацидів перенесли на кожную рослину на початку N обробок. Краплю меду рисової флоєми, виділену комахами, збирали через 24 год. після початку N обробок. Результати показали, що НТ та лінія H167R флоєми pH були такою ж моделлю в різній формі N, однак, b-S6 був більш близьким до 7 при нітратній обробці, більш близький до нейтральних в обох N умовах.

Фігура 26. Дані щодо виживаності для трансгенного рису.

30 Фігура 27. Біомаса трансгенних ліній OsNRT2.3b пшениці.

Фігура 28. Ріст трансгенних ліній OsNRT2.3b пшениці з низьким та високим рівнем застосування N.

Детальний опис винаходу

Представлений винахід буде далі описано. В наступних параграфах, різні аспекти винаходу є визначеними більш детально. Кожен аспект, таким чином визначений, може бути комбінованим з будь-яким іншим аспектом або аспектами якщо чітко не зазначено протилежного. Зокрема, будь-яка ознака, зазначена як така, що є переважною або сприятливою, може бути комбінованою з будь-якою іншою ознакою або ознаками, зазначеними як такими, що є переважними або сприятливими.

40 Здійснення на практиці представленого винаходу буде застосовувати, якщо не зазначене інше, традиційні методики з ботаніки, мікробіології, культури тканин, молекулярної біології, хімії, біохімії та рекомбінантної ДНК технології, біоінформатики, які знаходяться в межах знань кваліфікованого фахівця в даній галузі. Такі методики повністю пояснюються в літературі.

Як використовується в даному документі, слова "нуклеїнова кислота", "послідовність нуклеїнової кислоти", "нуклеотид", "молекула нуклеїнової кислоти" або "полінуклеотид" є призначеними, щоб включати ДНК молекули (наприклад, кДНК або геномна ДНК), РНК молекули (наприклад, мРНК), що зустрічаються в природі, мутантні, синтетичні ДНК або РНК молекули, та аналоги ДНК або РНК, утворені, застосовуючи нуклеотидні аналоги. Вона може бути cap be одноланцюговою або дволанцюговою. Такі нуклеїнові кислоти або полінуклеотиди включають, але не обмежуються цим, кодуєчі послідовності структурних генів, антисмислові послідовності, та некодуєчі регуляторні послідовності, що не кодуєчі мРНК або протеїнові продукти. Дані терміни також охоплюють ген. Термін "ген" або "послідовність гена" широко застосовують, щоб позначити нуклеїнову кислоту ДНК, пов'язану з біологічною функцією. Таким чином, гени можуть включати інтрони та екзони, як в геномній послідовності, або може включати тільки кодуєчу послідовність, як в кДНК, та/або можуть включати кДНК в комбінації з регуляторними послідовностями.

Терміни "поліпептид" та "протеїн" в даному документі використовують взаємозамінно та стосуються амінокислот в полімерній формі будь-якої довжини, зв'язаних разом за рахунок пептидних зв'язків.

60 У відповідності з цілями винаходу, "трансгенний", "трансген" або "рекомбінантний" означає

відносно, наприклад, послідовності нуклеїнової кислоти, касету експресії, генний конструкт або вектор, що містить послідовність нуклеїнової кислоти або організм, трансформований послідовностями нуклеїнової кислоти, касетами експресії або векторами відповідно до винаходу, всі дані конструкції, здійснені рекомбінантними способами, в яких або

5 (а) послідовності нуклеїнових кислот, що кодують протеїни, прийнятні в способах за винаходом, або

(b) генетична(i) контрольна(i) послідовність(i), яка є функціонально зв'язаною з послідовністю нуклеїнової кислоти відповідно до винаходу, наприклад, промотором, або

(с) а) та b)

10 не є розташованою в їх природному генетичному навколишньому середовищі або була модифікованою рекомбінантними способами, який є можливим для модифікації, приймаючи форму, наприклад, заміщення, додавання, делеції, інверсії або вставки одного або більше нуклеотидних залишків. Природне генетичне навколишнє середовище, як мають на увазі, означає природний геномний або хромосомальний локус у вихідній рослині або присутнє в
15 геномній бібліотеці. У випадку геномної бібліотеки, природне генетичне навколишнє середовище послідовності нуклеїнової кислоти переважно зберігається, щонайменше, частково. Навколишнє середовище розташовується по бокам послідовності нуклеїнової кислоти, щонайменше, з одного боку, та має послідовність довжиною, щонайменше, 50 п.о., переважно, щонайменше, 500 п.о., особливо переважно, щонайменше, 1000 п.о., найбільш переважно, щонайменше, 5000 п.о. Касета експресії, що зустрічається в природі – наприклад, комбінація,
20 що зустрічається в природі, природного промотора послідовностей нуклеїнових кислот з відповідними послідовностями нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, прийятна в способів за представленим винаходом, як зазначено вище - стає трансгенною касетою експресії, коли дана касета експресії є модифікованою не природними, синтетичними ("штучними") способами,
25 такими як, наприклад, мутагенна обробка. Прийнятні способи є описаними, наприклад, в US 5,565,350 або WO 00/15815, обидва включені у вигляді посилання.

Трансгенна рослина у відповідності з цілями винаходу таким чином, як мається на увазі, означає, як зазначено вище, що нуклеїнові кислоти, які використовують в способі за винаходом, не знаходяться в їх природному локусі в геномі зазначеної рослини, що є можливим для
30 нуклеїнових кислот, які є експресованими гомологічно або гетерологічно. Однак, як зазначалось, трансгенний також означає, що, в той час як нуклеїнові кислоти відповідно до різних варіантів здійснення винаходу знаходяться в їх природному положенні в геномній рослині, послідовність є модифікованою відносно природної послідовності, та/або, що регуляторна послідовність природних послідовностей є модифікованими. Трансгенний
35 переважно, як мають на увазі, означає експресію нуклеїнових кислот відповідно до винаходу в неприродному локусі в геномі, тобто має місце гомологічна або, переважно, гетерологічна експресія нуклеїнових кислот.

Аспекти винаходу включають технологію рекомбінації ДНК, та виключають варіанти здійснення, що ґрунтуються виключно на створенні рослин за традиційними способами
40 розведення.

OsNRT2.3b пептид, експресований відповідно до аспектів винаходу, є показаним в SEQ ID No. 3. Відповідно до аспектів винаходу, послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID No. 1 (OsNRT2.3b) кодує поліпептид SEQ ID No. 3 (OsNRT2.3b). Послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID No. 2 (OsNRT2.3a) кодує поліпептид SEQ ID No. 4 (OsNRT2.3a). Конструкти, що містять
45 SEQ ID No. 67, яка відповідає номеру доступу No AK072215 OsNRT2.3b відповідно до всіх варіантів здійснення та аспектів винаходу. Коли посилаються на нуклеїнову кислоту, що кодує OsNRT2.3a, також посилаються на номер доступу No. AK0109776 OsNRT2.3a, як показано в SEQ ID No. 68 відповідно до всіх варіантів здійснення та аспектів винаходу.

Автори представленого винаходу продемонстрували, що надекспресування OsNRT2.3b в
50 різних сортах рису підвищувало врожайність зерна на аж до 40 % та покращувала NUE при як низьких, так і високих введеннях N в обширних польових дослідженнях. Фотореспіраторна генна експресія була зниженою в рисі з надекспресуванням OsNRT2.3b, показуючи, що покращена ефективність фотосинтезу є компонентом фенотипу збільшеної врожайності. Цікаво, лінії з надекспресією OsNRT2.3b, які були підтверджені в рівнях, як транскрипту, так і протеїну (фіг. 1c, d), показали більший ріст порівняно з немутантним типом (НТ) (фіг. 1a, b, фіг. 11). Біомаса та розмір волоті ліній з надекспресією була більшою, ніж у НТ (фіг. 11, таблиця 2-3). Розмір першого та другого остюка був збільшеним, в наслідок цього, загальна кількість насінин на волоть була більшою, ніж НТ (фіг. 11, таблиця 2). На відміну від цього, рослини з надекспресією OsNRT2.3a не показали видимого відмінності від НТ, навіть якщо OsNRT2.3a мРНК та протеїн був
60 збільшеним в трансформованих лініях (фіг. 1c, d, фіг. 11).

Надекспресування OsNRT2.3b, крім того, покращувало рН гомеостазу, що в результаті призвело до підвищеного загального поглинання N, накопичення пагоном P та Fe. Дані результати демонструють, що комбінування поглинання N з рН гомеостазу та фотосинтезом є ключовим принципом для покращення NUE та врожайності.

Таким чином, автори представленого винаходу продемонстрували, що OsNRT2.3b, але не OsNRT2.3a, може бути застосованим для покращення росту, врожайності та коефіцієнта використання азоту та інших дослідженнях, коли експресовані в рослині. Відповідно, в деяких аспектах, винахід стосується трансгенних рослин, рослин експресування послідовності нуклеїнової кислоти, що містить нуклеїнову кислоту, як визначено в SEQ ID No. 1 (OsNRT2.3b), її функціональний варіант, частину або гомолог, але в якій зазначена рослина не експресує послідовність нуклеїнової кислоти, що містить нуклеїнову кислоту як визначено в SEQ ID No. 2 (OsNRT2.3a), та пов'язаних способів та застосування. Зокрема, винахід, таким чином, стосується способів підвищення росту, врожайності, транспорту азоту, стійкості до патогену, NUE та/або поглинання азоту, який включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, як визначено в SEQ ID No. 1 (OsNRT2.3b), функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю в рослині, в якій зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний промотор або специфічний промотор флорми, та, де зазначена рослина не надекспресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка включає SEQ ID No. 2 (OsNRT2.3a).

Винахід має наступні аспекти. Як зазначено вище, рис відрізняється від всіх інших основних сільськогосподарських культур, своїм метаболізмом азоту. Неочікувано, автори представленого винаходу показали, що експресія OsNRT2.3b з рису, рослини, що є, на відміну від всіх інших основних сільськогосподарських культурних рослин, здатними до інтенсивного росту на NH_4 , є активною, коли експресоване в інші види рослини, які використовують NO_3^- як своє джерело азоту. Більше того: експресія OsNRT2.3b в інших рослинах призводить до корисного фенотипу, що показує покращений ріст, врожайність та коефіцієнт використання азоту, не тільки в рисі, але також в інших рослинах. Таким чином, OsNRT2.3b з рису може бути застосованим в способах покращення росту, врожайності, стійкості до патогену та коефіцієнта використання азоту в рослинах відповідно до винаходу. Наприклад, надекспресія OsNRT2.3b в тютюні або в пшениці збільшує біомасу, як показано в прикладах.

Таким чином, винахід також стосується трансгенних рослин з експресуванням послідовності нуклеїнової кислоти, що містить нуклеїнову кислоту як визначено в SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, де, якщо послідовність нуклеїнової кислоти є такою, як визначено в SEQ ID No. 1 або її функціональним варіантом або частиною, зазначена рослина не є рисом, та пов'язаних способів, та застосування. В одному варіанті здійснення, винахід також стосується трансгенних рослин з експресуванням послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеїнову кислоту, як визначено в SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, де зазначена рослина не є рисом. Пов'язаний спосіб є способом підвищення росту, врожайності, NUE, поглинання азоту, стійкості до стресу азоту, стійкості до патогену та/або транспорту азоту рослини, який включає введення та експресування послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеїнову кислоту, як визначено в SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, де, якщо послідовність нуклеїнової кислоти є такою, як визначено в SEQ ID No. 1, або її функціональним варіантом або частиною, зазначена рослина не є рисом. В переважному варіанті здійснення, винахід стосується способу підвищення росту, врожайності, NUE, поглинання азоту, стійкості до стресу азоту, стійкості до патогену та/або транспорту азоту рослини, яка не є рисом, який включає введення та експресування послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеїнову кислоту, як визначено в SEQ ID No. 1, її функціональний варіант або частину, функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю в зазначеній рослині.

В іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення росту, врожайності, NUE, поглинання азоту, стійкості до патогену, стійкості до стресу азоту та/або транспорту азоту рослини, який включає введення та експресування послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить або як визначено в SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, де зазначена рослина не є рисом.

Таким чином, в одному аспекті, винахід стосується способу підвищення росту рослини, який включає введення та експресування послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною

послідовністю в рослині, де, якщо послідовність нуклеїнової кислоти є такою, як визначено в SEQ ID No. 1, зазначена рослина не є рисом.

В ще іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення врожайності рослини, який включає введення та експресування послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, де, якщо послідовність нуклеїнової кислоти є такою, як визначено в SEQ ID No. 1, зазначена рослина не є рисом.

Термін "врожайність" включає одну або більше з наступних з не обмежуючого переліку ознак: ранній час цвітіння, біомаса (рослинна біомаса (коренева та/або пагонова біомаса) або біомаса насінини/зернини), насінини/врожайність зерна, насінини/життєздатність зерна та ефективність пророщування, розмір насінини/зернини, вміст крохмалю зерна, рання життєвість, індекс зеленості, підвищена швидкість росту, затримка старіння зеленої тканини. Термін "врожайність" як правило, означає здатне до вимірювання одержання економічного значення, як правило, пов'язане з конкретною сільськогосподарською культурою, з площею та з періодом часу. Індивідуальні частини рослини безпосередньо роблять внесок у врожайність на основі їх кількості, розміру та/або маси. Фактична врожайність являє собою врожайність на квадратний метр для сільськогосподарської культури та рік, який визначається шляхом ділення загального одержання (включає як зібраний, так і оціночне одержання) на посаджені квадратні метри.

Таким чином, відповідно до винаходу, врожайність включає один або більше з та може бути вимірюваною шляхом оцінки одного або більше з: підвищена врожайність насіння на рослину, підвищений коефіцієнт заповненості насінини, підвищена кількість заповненості насіння, підвищений індекс врожайності, підвищена життєздатність/ефективність пророщування, підвищена кількість або розмір насіння/капсул/стручків/зерна, підвищений ріст або збільшене розгалуження, наприклад, суцвіття з більшими гілками, збільшена біомаса або заповнення зерна. Переважно, підвищена врожайність включає підвищену кількість зерна/насінин/капсул/стручків, збільшену біомасу, підвищений ріст, підвищену кількість квіткових органів та/або збільшене квіткове розгалуження. Врожайність збільшується порівняно з контрольною рослиною.

Наприклад, врожайність збільшується на 2 %, 3 %, 4 %, 5 %-50 % або більше порівняно з контрольною рослиною, наприклад, щонайменше, на 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % або 50 %.

В іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення NUE рослини, який включає введення та експресування послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціонального варіанта, частини або гомолога, функціонально зв'язаної з регуляторною послідовністю в рослині, де, якщо послідовність нуклеїнової кислоти є такою, як визначено в SEQ ID No. 1, зазначена рослина не є рисом. В іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення NUE рослини, який включає введення та експресування послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, де зазначена рослина не є рисом.

В одному варіанті здійснення, спосіб покращує NUE при високому введенні N. В іншому варіанті здійснення, спосіб покращує NUE при низькому введенні N.

NUE може бути визначений, як врожай зерна на одиницю доступного N в ґрунті (включаючи залишковий N, присутній в ґрунті, та добрива). Загальний коефіцієнт використання N рослинами включає ефективності, як поглинання, так і застосування, та може бути розрахований як U_pE .

Наприклад, NUE підвищується на 5 %-50 % або більше порівняно з контрольною рослиною, наприклад, щонайменше, на 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % або 50 %.

В іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення поглинання азоту рослиною, який включає введення та експресування послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, де, якщо послідовність нуклеїнової кислоти є такою, як визначено в SEQ ID No. 1, зазначена рослина не є рисом. В іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення поглинання азоту рослиною, який включає введення та експресування послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, де зазначена рослина не є рисом.

Наприклад, поглинання азоту підвищується на 10 %-50 % або більше порівняно з контрольною рослиною, наприклад, щонайменше, на 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % або 50 %.

В одному варіанті здійснення різних способів, описаних в даному документі для підвищення

NUE, росту, врожайності, поглинання азоту та/або нітратного транспорту, зазначені ознаки збільшуються в умовах стресу, наприклад, азотного стресу.

В іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення стійкості до стресу азоту рослиною, який включає введення та експресування послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, де, якщо послідовність нуклеїнової кислоти є такою, як визначено в SEQ ID No. 1, зазначена рослина не є рисом. В іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення стійкості до стресу азоту рослиною, який включає введення та експресування послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, де зазначена рослина не є рисом.

В іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення транспорту азоту рослиною, який включає введення та експресування послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, де, якщо послідовність нуклеїнової кислоти є такою, як визначено в SEQ ID No. 1, зазначена рослина не є рисом. В іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення транспорту азоту рослини, який включає введення та експресування послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, де зазначена рослина не є рисом.

В іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення стійкості до патогену та/або виживаності рослиною, який включає введення та експресування послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, де, якщо послідовність нуклеїнової кислоти є такою, як визначено в SEQ ID No. 1, зазначена рослина не є рисом. В іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення стійкості до патогену та/або виживаності рослини, який включає введення та експресування послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, де зазначена рослина не є рисом.

Патоген, наприклад, може представляти собою Фузаріозний вілт. Інші патогени, відомі кваліфікованим фахівцям, також знаходяться в межах обсягу винаходу.

Терміни "регуляторний елемент", "регуляторна послідовність", "контрольна послідовність" та "промотор" всі використовуються взаємозамінно в даному документі та беруться в широкому контексті, щоб стосуватися регуляторних послідовностей нуклеїнових кислот, здатних до здійснення експресії послідовності, з якими вони сшиваються. Термін "промотор", як правило, стосується контрольної послідовності нуклеїнової кислоти, розташованої проти ходу транскрипції від ініціації транскрипції гена, та яка є включаєною в розпізнавання та зв'язування РНК полімерази та інших протеїнів, тим самим спрямовуючи транскрипцію функціонально зв'язаної нуклеїнової кислоти. Охоплені зазначеними вище термінами є транскрипційні регуляторні послідовності, отримані з класичного еукаріотичного геномного гена (включаючи ТАТА блок, який є потрібним для точної ініціації транскрипції, з або без послідовності ССАТ блока), та додаткові регуляторні елементи (тобто проти ходу транскрипції активуючі послідовності, енхансери та сайленсери), які змінюють експресію гена у відповідь на розвинуті та/або зовнішні стимули, або за тканинно-специфічним способом. Крім того, включеними в термін є транскрипційною регуляторною послідовністю з класичного прокаріотичного гена, в випадку якого він може включати -35 блокову послідовність та/або -10 блокові транскрипційні регуляторні послідовності. Термін "регуляторний елемент", крім того, охоплює синтетичну зливу молекулу або похідну, що співставляє, активує або посилює експресію молекулу нуклеїнової кислоти в клітині, тканині або органі. Більше того: термін "регуляторний елемент" включає послідовності транскрипційного термінатору по ходу транскрипції. Транскрипційний термінатор є секцією послідовності нуклеїнової кислоти, що маркує кінець гена або оперон в геномній ДНК під час транскрипції. Транскрипційний термінатор, використаний в конструкті, що експресує рослинні гени, є добре відомим в даній галузі.

В одному варіанті здійснення, конструкти, описані в даному документі, мають промотор та термінатор послідовності.

Термін "рослинний промотор" включає регуляторні елементи, які опосередковують експресію кодуєчого сегмента послідовності в рослинних клітинах. Відповідно, рослинний промотор не повинен бути рослинного походження, але може походити з вірусів або мікроорганізмів, наприклад, з вірусів, які вражають рослинні клітини. "Рослинний промотор" також може походити з рослинної клітини, наприклад, з рослини, яка є трансформованою з

послідовності нуклеїнової кислоти, щоб експресуватися в способі за винаходом та описується в даному документі. Крім того, це стосується інших "рослинних" регуляторних сигналів, таких як "рослинні" термінатори. Промотори проти ходу транскрипції нуклеотидної послідовності прийнятні в способах за представленим винаходом можуть бути модифікованими одним або

5 більше нуклеотидним(и) заміщенням(и), вставкою(ами) та/або делецією(ями), не перешкоджаючи функціональності або активності будь-яких промоторів, відкритої рамки зчитування (ORF) або 3'-регуляторної ділянки, такої як термінатори або інші 3' регуляторні ділянки, які розташовуються в стороні від ORF. Більше того: можливим є те, що активність промоторів підвищується при модифікуванні їх послідовності, або те, що вони повністю

10 заміщуються на більш активні промотори, навіть на промотори з гетерологічних організмів. Для експресії в рослинах, молекула нуклеїнової кислоти повинна, як описано вище, бути функціонально зв'язаною з або містити прийнятний промотор, який експресує ген в потрібний момент часу та з потрібним просторовим характером експресії. Термін "функціонально зв'язаний", як використовується в даному документі, стосується функціонального зв'язку між

15 послідовністю промотора та геном, що цікавить, таким чином, що послідовність промотора є здатною ініціювати транскрипцію гена, що цікавить.

Наступні промотори можуть бути вибрані відповідно до аспектів винаходу. Даний перелік не є обмежувачим.

"конститутивний промотор" стосується промотора, який є транскрипційно активним під час

20 більшості, але не обов'язково всіх, фаз росту та розвитку та в більшості умов навколишнього середовища, в, щонайменше, одній клітині, тканині або органі. Приклади конститутивних промоторів включають, але не обмежуються цим, актин, HMGP, CaMV19S, GOS2, рисовий циклофілін, кукурудзяний H3 гістон, H3 гістон люцерни, 34S FMV, малу субодиницю rubisco, OCS, SAD1, SAD2, nos, V-ATPase, супер-промотор, G-блокові протеїни та синтетичні

25 промотори.

"сильний промотор" стосується промотора, що призводить до підвищеної або надекспресії гена. Приклади сильних промоторів включають, але не обмежуються цим, CaMV-35S, CaMV-35Somega, убіквітин арабідопсиса UBQ1, рисовий убіквітин, актин, або промотор кукурудзяної алкогольдегідрогенази 1 (Adh-1).

В переважному варіанті здійснення, промотор являє собою конститутивні промотори, який є

30 сильним промотором та спрямовує надекспресію гена, що цікавить, з яким є функціонально зв'язаним. Переважними промоторами є CaMV-35S, CaMV-35Somega та убіквітин арабідопсиса UBQ1.

Термін "підвищена експресія" або "надекспресія", як використовується в даному документі, означає будь-яку форму експресії, яка є додатковою до контрольної, наприклад, немутантного типу, рівня експресії.

В одному варіанті здійснення, промотор являє собою флоема-специфічний промотор. Флоема-специфічна експресія може бути важливою для функції OsNRT2.3b, оскільки васкулярна тканина є важливою для регуляції рН, та недавно було показано, що нітратний транспорт в флоемі відбувається в рослинах та може бути суттєвим шляхом для доставки азоту

40 в пагон.

Специфічний промотор флоєми є, наприклад, з RSS1P, який одержують з гена синтази рисової сахарози (відповідно до SEQ ID No. 5 або її функціонального варіанта або частини, дивись Saha et al). Інші флоема-специфічні промотори є відомими в даній галузі з рівня техніки.

Відповідно до різних аспектів винаходу, ріст, врожайність, транспорт азоту, поглинання азоту, стійкість до стресу азоту, стійкість до патогену та/або коефіцієнт використання азоту є підвищеними порівняно з контрольною рослиною. Контрольна рослина являє собою рослину, яка не була трансформованою з конструктором нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціональним варіантом, частиною або гомологом, переважно, немутантним типом рослини.

50 Контрольна рослина є, переважно, тим самим видом, як і трансгенна рослина. Більше того: контрольна рослина може містити генетичні модифікації, включаючи експресію інших трансгенів.

Терміни "підвищувати", "покращувати" або "посилювати", як використовується відповідно до різних аспектів винаходу, є взаємозамінними. Ріст, врожайність, транспорт азоту, поглинання азоту, стійкість до стресу азоту та/або коефіцієнт використання азоту підвищується на

55 приблизно 5-50 %, наприклад, щонайменше, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % або 10 %, переважно, щонайменше, 15 % або 20 %, більш переважно 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % або 50 % або більше порівняно з контрольною рослиною. Переважно, ріст вимірюють шляхом вимірювання гіпокотилу або довжини стебла. В одному варіанті здійснення, врожайність підвищується на,

60 щонайменше, 40 %.

Конструкт нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціонального варіанта, частини або гомолога також може містити селективний маркер, який сприяє селекції трансформантів, таких як маркер, що забезпечує резистентність до антибіотиків, наприклад, канаміцину.

В іншому аспекті, винахід стосується способу одержання трансгенної рослини, яка має підвищену врожайність, ріст, транспорт азоту, поглинання азоту, стійкість до стресу азоту, стійкість до патогену та/або коефіцієнт використання азоту, який включає введення та експресування в рослині або рослинній клітині послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціонального варіанта, частини або гомолога, функціонально зв'язаного з регуляторною послідовністю, де, якщо послідовність нуклеїнової кислоти є такою, як визначено в SEQ ID No. 1, то зазначена рослина не є рисом. В іншому аспекті, винахід стосується способу одержання трансгенної рослини, яка має підвищену врожайність, ріст, транспорт азоту, поглинання азоту, стійкість до стресу азоту та/або коефіцієнт використання азоту, який включає введення та експресування в рослині або рослинній клітині послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціонального варіанта, частини або гомолога, функціонально зв'язаного з регуляторною послідовністю, де зазначена рослина не є рисом.

Спосіб додатково включає регенерування трансгенної рослини з рослини або рослинної клітини піля стадії а), де трансгенна рослина містить в своєму геномі SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю, та одержання рослини-потомок, що походить від трансгенної рослини, де зазначена рослина-потомок демонструє підвищену врожайність, ріст, транспорт азоту, поглинання азоту, стійкість до стресу азоту та/або коефіцієнт використання азоту.

В одному варіанті здійснення даних способів, описаних вище, які безпосередньо виключають рис, послідовність нуклеїнової кислоти містить або складається з SEQ ID No. 1, або її функціонального варіанта, або частини.

Таким чином, відповідно до різних аспектів винаходу, SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частина або гомолог, є введеними в рослину та експресованими, як трансген. Послідовність нуклеїнової кислоти вводиться в зазначену рослину, застосовуючи спосіб, який називається трансформація. Термін "введення" або "трансформація" як зазначено в даному документі охоплює передачу екзогенного полінуклеотида в клітину-хазяїна, незалежно від способу, застосованого для передачі. Рослинна тканина, здатна до подальшого клонального розмноження, чи то органогенез або ембріогенез, може бути трансформована генетичним конструктом за представленим винаходом, та ціла рослина регенерована звідти. Вибір конкретної тканини буде варіювати залежно від клональних систем розмноження, доступних для та що найкращим чином придатних конкретних видів, які трансформуються. Ілюстративні тканини-мішені включають листові диски, пилки, зародки, сім'ядолі, гіпокотилі, мегагаметофіти, калюсну тканину, існуючу меристемну тканину (наприклад, апікальну меристему, пазушні бруньки та кореневі меристеми), та індуковану меристемну тканину (наприклад, меристему сім'ядолі і меристему гіпокотилі). Полінуклеотид може бути тимчасово або стабільно введеним в клітину-хазяїна та може підтримуватися неінтегрованим, наприклад, як плазмід. Альтернативно, він може бути інтегрованим геном хазяїна. Одержану в результаті трансформовану рослинну клітину потім можуть застосовувати, щоб регенерувати трансформовану рослину за способом, відомим кваліфікованому фахівцю в даній галузі з рівня техніки.

Перенесення чужерідних генів в геном рослини називається трансформацією.

Трансформація рослин на даний час є рутинним способом в багатьох видах. Переважно, будь-який з декількох способів трансформації можуть використовувати для введення гена, що цікавить, в прийнятну клітину-предок. Способи, описані для трансформації та регенерації рослин з рослинних тканин або рослинних клітин, можуть застосовувати для тимчасової або для стабільної трансформації. Способи трансформації включають застосування ліпосом, електропорації, хімічних речовин, які підвищують поглинання вільної ДНК, ін'єкції ДНК безпосередньо в рослину, бомбардування генною пушкою, трансформація з використанням вірусів або пилку та мікропроеціювання. Способи можуть бути вибрані з кальцій/поліетиленгліколевого способу для протопластів, електропорації протопластів, мікроін'єкції в клітинному матеріалі, бомбардування ДНК або РНК-покритою частинкою, інфікування (неінтегративним) вірусом, тощо. Трансгенні рослини, включаючи трансгенні сільськогосподарські культурні рослини, переважно, одержують, застосовуючи *Agrobacterium tumefaciens* опосередковану трансформацію.

Для того, щоб вибрати трансформовані рослини, рослинний матеріал, одержаний в трансформації, як правило, піддають селективним умовам, таким чином, що трансформовані

рослини можуть відрізняти від нетрансформованих рослин. Наприклад, насіння, одержане за описаним вище способом, можуть висаджувати та, після початкового періоду росту, піддавати прийнятному відбору шляхом розпилення. Ще одна можливість полягає у вирощуванні насіння, за необхідністю, після стерилізації, на чашках з агаром з використанням прийнятного агента відбору, таким чином, що тільки трансформоване насіння може вирости в рослини. Альтернативно, трансформовані рослини піддають скринінгу щодо присутності селективного маркера, такого як той, який описаний вище. Після перенесення та регенерації ДНК, ймовірно, трансформовані рослини також можуть оцінювати, наприклад, застосовуючи Саузерн-аналіз, щодо присутності гена, що цікавить, кількості копій та/або геномної організації. Альтернативно або додатково, рівні експресії знову введеної ДНК можуть бути контрольовані, застосовуючи Нозерн та/або Вестерн-аналіз, причому обидві методики є добре відомими кваліфікованому фахівцю в даній галузі з рівня техніки.

Сформовані трансформовані рослини можуть бути розмножені різними способами, такими як шляхом клонального розмноження або за класичними методами розведення. Наприклад, перше покоління (або T1) трансформованої рослини може бути самозапиленим, та відібране гомозиготне друге покоління (або T2) трансформантів, та T2 рослини потім можуть додатково бути розмноженими, застосовуючи класичні методики розведення. Сформовані трансформовані організми можуть приймати різні форми. Наприклад, вони можуть бути химерами трансформованих клітин та нетрансформованих клітин; клональними трансформантами (наприклад, де всі трансформовані клітини містять касету експресії); трансплантати трансформованих та нетрансформованих тканин (наприклад, в рослинах, трансформовані підщепи прищеплюють до нетрансформованого пагона).

Різні аспекти винаходу описані в даному документі, безсумнівно поширюються на будь-яку рослинну клітину або будь-яку рослину, продукovanу, одержану або яка може бути одержана за будь-яким зі способів, описаних в даному документі, та на всі рослинні частини та їх пагони, якщо не вказано інше. Наприклад, в деяких аспектах, описаних вище, рис є специфічно виключеним. Таким чином, способи виключають варіанти здійснення, де нуклеїнова кислота, яка містить або складається з SEQ ID No. 1, або функціональна частина її варіанта експресується в рисі. Представлений винахід, крім того, поширюється, щоб охопити потомство первинної трансформованої або трансфікованої клітини, тканини, органу або цілої рослини, яка була одержана за будь-яким із зазначених вище способів, де існує єдина вимога, що потомство демонструє однакову(і) генотипну(і) та/або фенотипну(і) характеристику(и) як ті, що продукуються батьківськими в способах відповідно до винаходу.

Рослина з різних аспектів винаходу характеризується тим, що вона показує підвищений ріст, врожайність, транспорт азоту, поглинання азоту, стійкість до стресу азоту та/або коефіцієнт використання азоту.

Винахід, крім того, поширюється на частини рослини, які збираються, за винаходом, як описано вище, такі як, але не обмежується насінням, листками, фруктами, квітами, стеблами, корінням, кореневищами, бульбами або цибулинами. Винахід, крім того, стосується продуктів, одержаних, переважно безпосередньо одержаних, з частини, які збирається з такої рослини, такі як сухі пелети або порошки, олія, жир та жирні кислоти, крохмаль або протеїни.

Винахід, крім того, стосується застосування послідовності, яка містить SEQ ID No. 1, її функціонального варіанта, частини або гомолога в підвищенні росту, врожайності, NUE, поглинанні азоту, стійкості до стресу азоту, стійкості до патогену та/або транспорту азоту рослини, де, якщо SEQ містить SEQ ID No. 1, зазначена рослина не є рисом. Більше того: винахід також стосується застосування послідовності, яка містить SEQ ID No. 1, її функціонального варіанта, частини або гомолога в підвищенні росту, врожайності, NUE, поглинанні азоту, стійкості до стресу азоту та/або транспорту азоту рослини, де зазначена рослина не є рисом.

Винахід, крім того, стосується конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний зі специфічним промотором флоеми, наприклад, нуклеїнова кислота, яка містить SEQ ID No. 5. Крім того, передбаченим є застосування конструкту в способах, описаних в даному документі.

Крім того, передбаченою є виділена клітина, переважно, рослинна клітина або клітина *Agrobacterium tumefaciens*, яка експресує конструкт нуклеїнової кислоти, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID No. 1, функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний зі специфічним промотором флоеми. В іншому аспекті, винахід стосується виділеної клітини, переважно, рослинної клітини або клітини *Agrobacterium tumefaciens*, яка експресує конструкт нуклеїнової кислоти, яка містить послідовність нуклеїнової

кислоти SEQ ID No. 1, функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з конститутивним промотором. Більше того: винахід також стосується культурального середовища, яке містить виділену рослинну клітину або клітину *Agrobacterium tumefaciens*, яка експресує конструкт нуклеїнової кислоти за винаходом.

5 За виключенням випадків, коли конкретно рис не признається, трансгенна рослина відповідно до різних аспектів винаходу, описаних в даному документі, може представляти собою будь-яку односім'ядольну або дводольну рослину, передбачену варіантами здійснення, описаними в даному документі.

10 Дводольна рослина може бути вибрана з родин, включаючи, але не обмежуючись цим, Asteraceae, Brassicaceae (наприклад, Brassica napus), Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Leguminosae (Caesalpinaceae, Aesalpinaceae Mimosaceae, Papilionaceae або Fabaceae), Malvaceae, Rosaceae або Solanaceae. Наприклад, рослина може бути вибрана з салату, соняшнику, арабідопсису, брокколі, шпинату, кавуну, кабачку, капусти, помідора, картоплі, батату, паприки, тютюну, бавовнику, бамії, яблука, троянди, полуниці, люцерни, квасолі, сої, кормових (стручкових) бобів, гороху, сочевиці, арахісу, нуту, абрикоси, груші, персика, винного винограду або видів цитрусових. В одному варіанті здійснення, рослина являє собою олійний рапс.

Також включеними є біопаливні та біоенергетичні сільськогосподарські культури, такі як рапс/ріпак, цукрова тростина, цукровий сорго, *Panicum virgatum* (просо прутковидне), лляне насіння, люпин та верба, тополя, гібриди тополі, міскантус або голонасінні, такі як сосна ладанна. Крім того, включеними є сільськогосподарські культури для силосу (кукурудза), пасовища або кормів (трави, конюшина, еспарцет, люцерна), волокон (наприклад бавовник, льон), будівельних матеріалів (наприклад, сосна, дуб), целюлози (наприклад, тополя), вихідної сировини для хімічної промисловості (наприклад, олійне рапсове насіння, насіння льону з високим вмістом ерукової кислоти) та для побутових цілей (наприклад, газонні трави для поля для гольфу), для декоративних для громадських та приватних садів (наприклад, левиний зів, петунія, троянди, герань, *Nicotiana* sp.) та для рослини та зрізаних квітів для дому (африканські фіалки, бегонії, хризантеми, герані, колеус пайкова рослина, драцена, фікусна рослина).

Односім'ядольна рослина може, наприклад, бути вибрана з родин Arecaceae, Amaryllidaceae або Poaceae. Наприклад, рослина може бути зерновою сільськогосподарською культурою, такою як пшениця, ячмінь, кукурудза, овес, сорго, жито, просо, гречка, газонна трава, пажитниця італійська, цукрова тростина або *Festuca species*, або сільськогосподарською культурою, такою як цибуля, цибуля-порей, ямс або банан. В одному варіанті здійснення способів та рослин, описаних вище, рослина не є рисом.

35 Переважно, рослина є сільськогосподарською культурною рослиною. Під сільськогосподарською культурною рослиною мають на увазі будь-яку рослину, яку вирощують в промисловому масштабі для споживання або використання людиною або твариною.

Найбільш переважними рослинами є кукурудза, пшениця, олійний рапс, сорго, соя, картопля, тютюн, помідор, тютюн, виноград, ячмінь, горох, квасоля, кормові боби, салат, бавовник, цукрова тростина, цукровий буряк, брокколі або інші овочеві капусти, або тополя.

В одному варіанті здійснення, рослиною є пшениця. В одному варіанті здійснення, рослиною є тютюн. Переважно, промотор являє собою специфічний промотор флоеми, як описано в даному документі.

Термін "рослина", як використовується в даному документі, охоплює цілу рослину, предки та потомство рослини та частин рослини, включаючи насіння, плід, пагони, стебла, листя, коріння (включаючи бульби), квіти та тканини та органи, де кожен із зазначених вище містить ген/нуклеїнову кислоту, що цікавить. Термін "рослина" також охоплює рослинні клітини, суспензійні культури, калюсну тканину, зародки, меристематичні ділянки, гаметофіти, спорофіти, пилки та мікроспори, знову де кожен із зазначених вище містить ген/нуклеїнову кислоту, що цікавить.

Рослини або їх частини, одержані або можуть бути одержані за способом отримання трансгенної рослини, як описано вище, також знаходяться в межах обсягу винаходу.

В іншому аспекті, винахід стосується трансгенної рослини, яка експресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, в якій, якщо послідовність нуклеїнової кислоти є такою, як визначено в SEQ ID No. 1, зазначена рослина не є рисом. Таким чином, даний аспект винаходу виключає трансгенний рис, який експресує нуклеїнову кислоту, яка містить або складається з SEQ ID No. 1. В одному варіанті здійснення, інші рослини, які є здатними до росту в NH_4 , як єдиному джерелі азоту, також є виключеними.

60 В іншому аспекті, винахід стосується трансгенної рослини, яка експресує послідовність

нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціональний варіант, частину або гомолог, функціонально зв'язаний зі специфічним промотором флориди в рослині. Рослина може бути будь-якою односім'ядольною або дводольною рослиною, включаючи рис. В одному варіанті здійснення, зазначена рослина не є рисом.

5 В іншому аспекті, винахід стосується трансгенної рослини, яка експресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціонального варіанта, частини або гомолога, функціонально зв'язаного з регуляторною послідовністю в рослині, в якій зазначена рослина не є рисом. В одному варіанті здійснення, трансгенна рослина експресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить або складається з SEQ ID No. 1.

10 Рослина характеризується тим, що вона показує підвищену врожайність, ріст, транспорт азоту, поглинання азоту, стійкість до стресу азоту, стійкість до патогену та/або коефіцієнт використання азоту.

Термін "функціональний варіант послідовності нуклеїнової кислоти", як використовується в даному документі, з посиланням на SEQ ID No. 1 або іншу послідовність, стосується варіанта послідовності гена або частини послідовності гена, яка зберігає біологічну функцію повної неваріантної послідовності, наприклад, забезпечує підвищений ріст або врожайність, коли експресована в трансгенній рослині. Функціональний варіант також містить варіант гена, що цікавить, який має зміни послідовності, що не впливають на функцію, наприклад, в не перетворених залишках. Крім того, охопленим є варіант, що є в значній мірі ідентичним, тобто має тільки однакові варіації послідовності, наприклад, в не перетворених залишках, порівняно з немутантним типом послідовності, як показано в даному документі, та є біологічно активним.

20 Таким чином, специфічно включеним в обсяг є функціональна частина послідовності нуклеїнової кислоти, як використовується в даному документі з посиланням на SEQ ID No. 1 або іншу послідовність, яка зберігає біологічну функцію повної неваріантної послідовності, наприклад, забезпечує підвищений ріст або врожайність, коли експресована в трансгенній рослині.

Таким чином, слід розуміти, що кваліфікованим фахівцям у даній галузі буде зрозуміло, що аспекти винаходу, які включають способи та застосування, охоплюють не тільки послідовність нуклеїнової кислоти яка містить або включає SEQ ID No. 1, але також функціональні варіанти або частини SEQ ID No. 1, які не впливають на біологічну активність та функцію протеїну, що одержують в результаті. Зміни в послідовності нуклеїнової кислоти, які в результаті призводять до отримання відмінної амінокислоти в заданому сайті, що, однак, не впливає на функціональні властивості кодованого поліпептида, є добре відомими в даній галузі з рівня техніки. Наприклад, кодон амінокислоти – аланіну, гідрофобної амінокислоти, може бути заміщеним на кодон, що кодує інший менш гідрофобний залишок, такий як гліцин, або більш гідрофобний залишок, такі як валін, лейцин або ізолейцин. Аналогічним чином, зміни, які в результаті призводять до заміщення одного негативного зарядженого залишку на інший, такого як аспарагінової кислоти на глутамінову кислоту, або одного позитивно зарядженого залишку на інший, такого як лізіна на аргінін, також як можна очікувати, дадуть функціонально еквівалентний продукт. Нуклеотидні заміни, які в результаті призводять до зміни N-термінальної та C-термінальної частин поліпептидної молекули, крім того, можуть неочікувано змінити активність поліпептида. Кожна із запропонованих модифікацій знаходиться в межах кваліфікації фахівця в даній галузі, яка є визначенням збереженням біологічної активності кодованих продуктів.

45 Функціональний варіант SEQ ID No. 1, має, щонайменше, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, або 99 % загальної ідентичності послідовності до амінокислоти, представленої SEQ ID NO: 1. Функціональний варіант SEQ ID NO. 3 має, щонайменше, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, або 99 % загальної ідентичності послідовності до амінокислоти, представленої SEQ ID No: 3. Функціональний варіант зберігає рН чутливий мотив.

50 Функціональний гомолог SEQ ID No. 1 являє собою нуклеїнову кислоту, що кодує NRT2.3b пептид, який є біологічно активним таким же чином, як SEQ ID No. 1, іншими словами, наприклад, він забезпечує підвищену врожайність або ріст. Термін функціональний гомолог включає OsNRT2.3b ортологи в інших видах рослини.

55 Гомолог OsNRT2.3b поліпептида має, в порядку зростання переваги, щонайменше 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 60 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % загальної ідентичності

послідовності до амінокислоти, представленої SEQ ID No: 3. Переважно, загальна ідентичність послідовності становить 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %. В іншому варіанті здійснення, OsNRT2.3b послідовність нуклеїнової кислоти має, в порядку зростання переваги, щонайменше, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % загальної ідентичності послідовності до нуклеїнової кислоти, представленої SEQ ID No: 1. Переважно, загальна ідентичність послідовності становить 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %. Загальну ідентичність послідовності визначають, застосовуючи алгоритм глобального вирівнювання, відомий в даний галузі, такий як алгоритм Нідлмана-Вунша в програмі GAP (GCG Wisconsin Package, Accelrys).

Переважаю, OsNRT2.3b гомолог/ортолог має рН чутливий мотив VYEAIHKI на цитоплазматичній стінці. В одному варіанті здійснення, гомолог OsNRT2.3b поліпептида має 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % загальної ідентичності послідовності до амінокислоти, представленої SEQ ID No: 3 та містить рН чутливий мотив VYEAIHKI (SEQ ID No. 16). Функціональні варіанти або частини гомологів, наприклад, як показано в SEQ ID No. 6-15, також є включеними в обсяг винаходу.

Фігура 24 показує приклади гомологів/ортологів, які мають рН чутливий мотив, ідентифікований в OsNRT2.3b. Таким чином, переважні ортологічні гени або пептиди, які застосовують відповідно до різних аспектів винаходу, вибирають з ортологічних, перелічених на фігурі 24, включаючи ячмінь, кукурудзу, сою, *Brachypodium* (SEQ ID No. 6-15) та пшеницю. Варіанти даних послідовностей, що мають, щонайменше, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % до послідовностей, перелічених в SEQ ID NO. 6-15, також знаходяться в межах обсягу винаходу.

Прийнятні гомологи або ортологи можуть бути ідентифіковані шляхом порівнянь послідовностей та ідентифікації консервативних доменів. Функція гомологу або ортологу може бути ідентифікована, як описано в даному документі, та кваліфікований фахівець, таким чином, буде мати можливість підтвердити функцію при експресуванні в рослині.

Наприклад, відповідно до різних аспектів винаходу, нуклеїнова кислота, яка кодує ендегенний NRT2.3 пептид, може бути експресованою в будь-якій рослині, як визначено в даному документі, якщо не вказано інше, застосовуючи рекомбінантні способи. Як описано вище, в деяких аспектах винаходу, зокрема, коли конструкт нуклеїнової кислоти містить або складається з SEQ ID No. 1, рослина не є рисом. Наприклад, рисовий OsNRT2.3b може бути експресованим в рис, та пшеничний NRT2.3b може бути експресованим в пшениці.

В іншому варіанті здійснення, нуклеїнова кислота, яка кодує рослинний NRT2.3b, що є ендегенним до перших рослинних видів, може бути експресованою в другу рослину, застосовуючи рекомбінантні способи. Наприклад, гомолог OsNRT2.3b від іншої рослини може бути експресованим в рис.

В одному переважному варіанті здійснення різних аспектів винаходу, OsNRT2.3b, яка містить SEQ ID No. 1 або її функціональний варіант, експресується в іншій рослині, що не є рисом. Як неочікувано показали автори представленого винаходу, експресія OsNRT2.3b не призводить до корисних фенотипів в інших рослинах, які використовують відмінне джерело N. Наприклад, експресія може бути в односім'ядольній або дводольній рослині, як описано в даному документі. В одному варіанті здійснення, рослина є пшеницею або тютюном.

Таким чином, винахід специфічно стосується способу підвищення одного або більше з росту, врожайності, транспорту азоту, NUE, поглинання азоту, зменшення фотореспірації, підвищення міжклітинних рівнів CO₂, підвищення ефективності фотосинтезу, стійкості до патогену та підтримання/покращення рН гомеостазу, який включає введення та експресування послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, або її функціональний варіант в іншій рослині, що не є рисом. Трансгенні нерисові рослини, які експресують послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, або її функціональний варіант, частину, також є охопленими в обсязі винаходу, наприклад пшениця або тютюн.

Рослини та їх ендегенний NRT2.3b, можуть бути вибрані з будь-якої рослини, такої як з однієї з родин або видів, перелічених в даному документі.

Арабідопсис не має близького родича до OsNRT2.3, найближчим є AtNRT2.5, але даний на має подібного рН-чутливого мотиву. Ключовим аспектом покращеного NUE, пов'язаного з OsNRT2.3b є рН чутливість нітратної транспортної функції. Цитоплазматичний рН чутливий мотив в OsNRT2.3b, який є відсутнім у OsNRT2.3a, забезпечує зв'язок між азотними поживними

речовинами та регулюванням рН. Присутність рН чутливого мотиву, таким чином, є важливою для гомологів/ортологів в інших видах.

Гомологи/ортологи OsNRT2.3b, таким чином, можуть бути ідентифіковані за присутністю цитоплазматичного рН чутливого мотиву. В одному аспекті, винахід стосується способу ідентифікування OsNRT2.3b гомологів/ортологів в інших видах, який включає ідентифікування пептидів, які містять цитоплазматичний рН чутливий мотив.

Як пояснено на прикладах, при надекспресуванні OsNRT2.3b в рисі, рН ксилем становив 7 та 7,3 в НТ, обробленому, відповідно, нітратом та амонієм, тоді як, він становив 7,5 та 7,6-7,8 в лініях надекспресування OsNRT2.3b, значно вище, ніж НТ. Після 24 год. обробок N, збирали сік флоєми. рН соку флоєми вимірювали та було виявлено, що менш кислотний – в лініях з надекспресією OsNRT2.3b. Відмінність між НТ та лініями з надекспресією становила приблизно 0,2 рН одиниць в нітраті та приблизно 0,1 рН одиниць в амонію. рН флоєми НТ зменшувався від 7,8 до 6,1 та b-S6 від 6,7 до 6,0 при постачанні нітрату від 24 до 48 год. обробок; тоді як при обробці амонієм НТ рН флоєми зменшувався від 7,4 до 6,3 та b-S6 від 6,6 до 5,9 від 24 до 48 год. Відмінність між НТ та b-S6 при постачанні нітрату була суттєво великою при 24 год., однак, незначна відмінність була знайдена при 48 год. При постачанні амонію, хоча рН соку НТ був вищим, ніж у b-S6, відмінність була незначною. Кислотність рН флоєми НТ в нітраті становила приблизно 1,7 рН одиниць, однак, це було тільки 0,7 рН одиниць в b-S6 рослинах. При 48 год., рН зібраного соку флоєми регулювали, щоб надати більш подібні значення для НТ та b-S6 рослин (фіг. 17b). Більше того: рН апопласти кореня в коренях НТ та b-S6 досліджували з бромкрезоловим пурпурним індикатором¹⁷ після 72 год. різних обробках N. Лінія надекспресування b-S6 показала алкалінізацію в нітраті та підкислення в амонію відносно НТ, в той же час рН в гідропонному середовищі не показало значної різниці між НТ та b-S6 протягом однакового періоду часу (фіг. 18c) оскільки основний об'єм розчину був достатньо великим, щоб буферити будь-які зміни рН, що відбуваються на поверхні кореня.

Форма постачання N для рослин є добре відомою для впливу на рН баланс рослини²⁴. Асиміляція амонію продукує, щонайменше, один H^+ на NH_4^+ ; тоді як NO_3^- асиміляція продукує фактично один OH^- на NO_3^- ⁴. Або H^+ або OH^- , продукований в надлишку від того, що потребується, щоб підтримувати цитоплазматичний рН, експортується від клітин на енергоспоживаючу стадію (наприклад, плазматична мембрана H^+ накачування ATPase)^{4,10}. Ми порівняли рН соку флоєми з N-недостатніх рисових рослин, поповнених нітратом або амонієм. Постачання нітрату та амонію підкислювало рН флоєми НТ та трансгенних рослин (фіг. 3d, e). Цікаво, що підкислення флоєми було значно меншим в чотирьох трансгенних лініях при порівнянні з НТ (фіг. 3d, e), хоча, не значна різниця в нітратній концентрації могла бути виявлена в флоємі (дені не показані). Ці дані показують, що трансгенні рослини є краще здатними регулювати рН флоєми. Більше того: різниця в рН флоєми між НТ та трансгенними (фіг. 17a, b) могла пояснити підвищене накопичення P та Fe в листі рослин з надекспресуючим OsNRT2.3b (фіг. 19). Більш кислотний сік флоєми (фіг. 17) буде сприяти транслокації P та Fe в листку²⁵. Разом з підвищеним поглинанням N, це також було важливим чинником для підвищення росту та врожайності рослини.

Доповідалось, що підвищення кислотності цитозольного рН інактивувало транспорт аквапорину в ооцитах²⁶. Більше того: оскільки нітратна асиміляція залежить від фотореспірації²⁷, співвідношення^{4,28} між асиміляцією нітрату, амонію та фотореспірацією є тісно пов'язаними з курсуючим малатом між цитоплазмою та хлоропластом, щоб збалансувати рН²⁹.

В рослинах, регулювання рН є необхідністю, яка виникає через множину причин. Найбільш основною причиною є те, що вода спонтанно іонізується, в результаті чого, протони не можуть бути повністю видалені з наданого розчину. На відміну від інших іонів, протони можуть витрачатися або отримуватися в певних хімічних реакціях, в результаті чого вид забезпечення рослин поживними речовинами визначає в якій мірі протони можуть стати проблемою, або навіть загрозою для організму. Точні регуляторні детермінанти та залежності є важкими для аналізу (на даний момент) для будь-якої ситуації, тому що на рН впливає велика різноманітність процесів в рослинних тканинах та клітинах, та внутрішньоклітинних просторах, та в один і той же час активність H^+ може змінюватися за тими самими процесами. Можливість зворотної рН пертурбації, а також ступінь та швидкість, з якою це здійснюється, визначає якість регулювання рН.

Гомеостатичне збереження цитоплазматичного рН є важливим для активування клітинного поглинання та збереження поживних речовин, та вторинних метаболітів, оскільки протон-кон'юговані транспортні системи опосередковують дані клітинні процеси. рН градієнти між клітинними просторами та зовнішнім навколишнім середовищем забезпечують джерело енергії для даних важливих процесів. Багато ключові клітинні процеси, таким чином, підвищуються за

рахунок покращеного рН гомеостазу, пов'язаного зі змішаним постачанням нітратного та амонійного азоту.

Ми показали, що OsNRT2.3b містить рН чутливий мотив на цитозольній стороні плазматичної мембрана, який не є присутнім в OsNRT2.3a на цитозольній стороні. рН-чутливий мотив VYEAIHKI (SEQ ID No. 16) поблизу гістидинового залишку 167 з OsNRT2.3b, який розташований лицем до цитозольної сторони на плазматичній мембрані, є характеристикою родини аніонообмінника, який є знайденим в багатьох різних організмах, включаючи ссавців, та, таким чином, може мати більш загальну біологічну значимість. Як продемонстровано в прикладах, ми показали, що після однієї амінокислотної мутації (H167R), OsNRT2.3b втратив дану функцію регулювання цитозольного рН, навіть після повторних циклів обробки нітратом (фіг. 5b).

Чутливий мотив OsNRT2.3b регулює цитозольний рН в рослині.

Крім того, ми показали, що рН чутливий мотив OsNRT2.3b є важливим для даних ефектів в рисі за рахунок зв'язування рН статусу рослини з постачанням нітрату.

В ще іншому аспекті, винахід, таким чином, стосується способу регулювання рН гомеостазу, який включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю в рослині. В одному варіанті здійснення, рослина не є рисом.

В наступному аспекті, винахід стосується способу зниження закислення в рослині, який включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю в рослині. В одному аспекті, рослина не є рисом.

Закислення може бути зниженим, щонайменше, на приблизно 0,1 рН одиницю, наприклад 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 або більше.

В наступному аспекті, винахід стосується способу зміни нітратного транспорту та рН гомеостазу в рослині, який включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю в рослині, де зазначена нуклеїнова кислота містить мутацію в рН чутливому мотиві VYEAIHKI (SEQ ID No. 16). Мутація робить рН чутливий мотив нефункціональним.

Як передбачається в інших частинах даного документа, регуляторна послідовність може представляти собою конститутивний промотор, як описано в даному документі, або тканинний специфічний промотор. В одному варіанті здійснення, промотор являє собою специфічний промотор флоєми, як описано в даному документі.

Термін рослина, крім того, є визначеним в інших частинах даного документа. Переважно, рослина являє собою сільськогосподарську культурну рослину. Найбільш переважними рослинами є кукурудза, рис, пшениця, олійний рапс, сорго, соя, картопля, помідор, виноград, ячмінь, горох, квасоля, кормові боби, салат, бавовник, цукрова тростина, цукровий буряк, тютюн, брокколі або інші овочеві капусти або тополя. В одному варіанті здійснення, рослина не є рисом.

Винахід, крім того, стосується застосування нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціонального варіанта, частини або гомолога, що кодують SEQ ID No 3, її функціональний варіант, частину або гомолог, що містять рН чутливий мотив VYEAIHKI (SEQ ID No. 16) в регулюванні рН в трансгенній рослині.

В іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення росту рослини, який включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, як визначено в SEQ ID No. 1, функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю в рослині, де зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний промотор або специфічний промотор флоєми, та, де зазначена рослина не надекспресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 2.

В іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення коефіцієнта використання азоту рослини, який включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю в рослині, де зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний промотор або специфічний промотор флоєми, та, де зазначена рослина не надекспресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 2.

В іншому аспекті, винахід стосується способу покращення врожайності рослин, який включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю в рослині, де зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний

промотор або специфічний промотор флоєми, та де зазначена рослина не надекспресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 2.

В іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення нітратного транспорту в рослині, який включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю в рослині, де зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний промотор або специфічний промотор флоєми, та, де зазначена рослина не надекспресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 2.

В іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення поглинання азоту рослини, який включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю в рослині, в якій зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний промотор або специфічний промотор флоєми, та, де зазначена рослина не надекспресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 2.

В одному варіанті здійснення різних способів, описаних в даному документі для підвищення NUE, росту, врожайності, поглинання азоту та/або нітратного транспорту, зазначені характеристики підвищуються в стресових умовах, наприклад, азотному стресі.

Таким чином, в іншому аспекті, винахід стосується способу надання стійкості до стресу азоту рослині, який включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю в рослині, в якій зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний промотор або специфічний промотор флоєми, та, де зазначена рослина не надекспресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 2.

Таким чином, в іншому аспекті, винахід стосується способу надання стійкості до патогену рослині, який включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю в рослині, де зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний промотор або специфічний промотор флоєми, та, де зазначена рослина не надекспресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 2. Якщо рослина є рисом, то патоген може представляти собою фузаріозний вілт, плямистість листя та жовту іржу злаків.

Відповідно до способів, зазначених вище, регуляторна послідовність відповідно до способу та рослин, зазначених вище, є такою, як описано в даному документі, та може, таким чином, представляти собою конститутивний промотор, як описано в даному документі, індукований промотор або тканинно-специфічний промотор. В одному варіанті здійснення, промотор являє собою специфічний промотор флоєми, як описано в даному документі. Флоєма-специфічна експресія може бути важливою для функції OsNRT2.3b, оскільки васкулярна тканина є важливою для регулювання pH, та недавно було показано, що нітратний транспорт в флоємі зустрічається в рослинах, та може бути важливим шляхом для доставки азоту в пагон.

Термін рослина, крім того, є визначеним в інших частинах даного документа. Переважно, рослина являє собою сільськогосподарську культурну рослину. Найбільш переважними рослинами є кукурудза, рис, пшениця, олійний рапс, сорго, соя, картопля, помідор, виноград, ячмінь, горох, квасоля, кормові боби, салат, бавовник, цукрова тростина, цукровий буряк, броколі або інші овочеві капусти, або тополя. В одному варіанті здійснення, рослина не є рисом.

В іншому аспекті, винахід стосується способу підвищення застосування азоту, врожайності, NUE, ефективності азоту, стійкості до стресу азоту, стійкості до патогену, поглинання азоту та/або нітратного транспорту рослини, який включає введення та експресування конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 1, її функціональну частину або варіант, функціонально зв'язані зі специфічним промотором флоєми в рослині. Термін рослина, крім того, є визначеним в інших частинах даного документа. Переважно, рослина являє собою сільськогосподарську культурну рослину. Найбільш переважними рослинами є кукурудза, рис, пшениця, олійний рапс, сорго, соя, картопля, помідор, виноград, ячмінь, горох, квасоля, кормові боби, салат, бавовник, цукрова тростина, цукровий буряк, броколі або інші овочеві капусти, або тополя. В одному варіанті здійснення, рослина не є рисом.

В іншому аспекті, винахід стосується способу одержання трансгенної рослини, яка має підвищену врожайність, ріст та/або коефіцієнт використання азоту, який включає введення та експресування в рослині або рослинній клітині конструкту нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, як визначено в SEQ ID No. 1, функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю, де зазначена регуляторна послідовність являє собою

конститутивний промотор або специфічний промотор флоєми, та, де зазначена рослина не надекспресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID No. 2.

Спосіб додатково включає регенерування трансгенної рослини з рослини або рослинної клітини після стадії а), де трансгенна рослина містить в своєму геномі SEQ ID No. 1, функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю, та одержання потомства рослини, яке походить з трансгенної рослини, де зазначене потомство рослини демонструє підвищену врожайність, ріст та/або коефіцієнт використання азоту. Дані способи здійснюють, як описано в інших частинах даного документа.

Рослини або їх частини, одержані або, які можуть бути одержані, за способом отримання трансгенної рослини, як описано вище, також знаходяться в межах обсягу винаходу.

В іншому аспекті, винахід стосується трансгенної рослини, яка експресує конструкт нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, як визначено в SEQ ID No. 1, функціонально зв'язану з регуляторною послідовністю в рослині, де зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний промотор або специфічний промотор флоєми, та, де зазначена рослина не надекспресує послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID No. 2.

Рослини, які можуть бути застосованими відповідно до даних способів винаходу, конкретно є переліченими в інших частинах даного документа, але, до того ж, включають рис. Переважно, рослина являє собою сільськогосподарську культурну рослину або біопаливну рослину, як визначено в інших частинах даного документа.

Найбільш переважними рослинами є рис, кукурудза, пшениця, олійний рапс, сорго, соя, картопля, помідор, тютюн, виноград, ячмінь, горох, квасоля, кормові боби, салат, бавовник, цукрова тростина, цукровий буряк, броколі або інші овочеві капусти, або тополя.

В одному варіанті здійснення, рослина є пшеницею, та промотор являє собою специфічний промотор флоєми, як описано в даному документі. В одному варіанті здійснення, рослина є тютюном, та промотор являє собою специфічний промотор флоєми, як описано в даному документі.

Рослина характеризується тим, що, як показано, вона має підвищену врожайність, ріст, транспорт азоту, поглинання азоту, стійкість до стресу азоту та/або коефіцієнт використання азоту.

Інші об'єкти та переваги за даним винаходом будуть оцінюватись з огляду повного розкриття, передбаченого в даному документі та поданій формулі винаходу.

В той час як, зазначене вище розкриття передбачає загальний опис об'єкту винаходу, який знаходиться в межах обсягу представленого винаходу, включаючи способи, а також їх найкращі режими одержання та застосування даного винаходу, наступні приклади передбачаються, щоб надати додаткову можливість кваліфікованому фахівцю в даній галузі, щоб здійснити на практиці даний винахід, та, щоб надати повний прописаний його опис. Однак, кваліфікованому фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що конкретність даних прикладів не слід розглядати, як такі, що обмежують винахід, обсяг якого повинен передбачатися з формули винаходу та їх еквівалентів, які додаються до даного розкриття. Різні додаткові аспекти та варіанти здійснення представленого винаходу будуть очевидними кваліфікованому фахівцю в даній галузі, приймаючи до уваги представлене розкриття. Конкретності даних прикладів не повинні розглядатися як обмежуючі.

Всі документи, згадані в даному описі, включаючи посилання на бази даних для послідовностей гена або протеїну, є включеними в даний документ у вигляді посилання у всій своїй повноті.

"та/або", як використовується в дакому документі, слід розглядати як конкретне розкриття кожної з двох конкретних ознак або компонентів з або без іншого. Наприклад, "А та/або В" слід розглядати як конкретне розкриття кожного з (i) А, (ii) В та (iii) А і В, таким самим чином, якщо кожне є представленим окремо в даному документі.

За виключенням випадків, коли контекст диктує інше, описи та визначення ознак, представлених вище, не є обмеженими будь-яким конкретним аспектом або варіантом здійснення винаходу, та застосовують в рівній мірі до всієї аспектів та варіантів здійснення, які є описаними.

Приклади

Винахід далі описується наступними необмежуваними прикладами

1. Експресія OsNRT2.3a та OsNRT2.3b в рисі

Матеріали та способи

Конструкція вектору надекспресії та трансгенні рослини

Відкриті рамки зчитування OsNRT2.3a та OsNRT2.3b були ампліфіковані генними специфічними праймерами. Фрагмент обробляли рестрикційними ферментами та вставляли у

вектори та секвенували перед трансформацією. Рисові (*Oryza sativa*) ембріональні калуси були трансформовані, застосовуючи Опосередковані агробактеріями способи³³. рослини з однією вставкою копією ТО збирали та вирощували, щоб створити рослини T1. Гомозиготні рослини T1 брали для покоління T2. Дві лінії T2 рослин з надекспресією OsNRT2.3a, a-U1 і a-U2 та чотири лінії T2 рослини з надекспресією OsNRT2.3b, b-U 1, b-U2, b-S2 та b-S6 застосовували для наступних експериментів. T2 польові експерименти проводили на Changxing експериментальній станції університету Zhejiang (травень - жовтень 2010) в чотирьох N застосуваннях N з рівнями сечовини як 0, 75, 150 та 300 кг N/га. Насіння було пророщене 5ого травня, та садженці кожного типу висаджували 3 рядки та 33 рослини з 25 см (рядковий простір) x 20 см (рослинний простір) 5ого червня. Рослини вирощували в блоках (фіг. 23a, b) в довільному порядку для кожного застосування N. Для великомасштабних експериментів при 75 кг N/га, рослини пересаджували як 10 рядків x 128 рослин (фіг. 23d). Три повторення застосовували для всіх польових експериментів, та з ділянок кінцево збирали врожай 10ого жовтня. Статус поживних речовин ґрунту в даній експериментальній станції становив: загального азоту (N): $1,00 \pm 0,18$ мг/г, загального фосфору (P) $0,38 \pm 0,08$ мг/г, загального калію (K) $39 \pm 2,3$ мг/г, P по Олсену ($0,5$ mM NaHCO_3 -здатного до екстракції P) $23 \pm 4,1$ мг/кг, та pH ґрунту становив $6,3 \pm 0,47$ ($n=6$), 60 кг P (як $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) /га та 110 кг K (як K_2SO_4) /га добрива застосовували до рисового поля перед перенесенням рисових садженців. Перше застосування N здійснювали перед перенесенням 3ого червня, та 20 % загального N добрива змішували в ґрунті. Друге застосування становило 40 % 12ого червня, коли рис був на початку стадії обробки. Кінцеве застосування становило 40 % 20ого червня. Період росту рису в Changxing становив 120 ± 3 днів для HT, a-U1 та a-U2 ліній, та 130 ± 2 днів при рівні $0-75$ кг N/га, 135 ± 2 днів при рівні 150 кг N/га та 140 ± 2 днів при рівні 300 кг N/га для b-U 1, b-U2, b-S2 та b-S6 ліній. Врожайність зерна вимірювали при збиранні врожаю, та NUE визначали, як врожайність зерна на добрива N, які застосовували. Для ^{15}N поглинання, експерименти зі збирання соку ксилеми та флоєми, умови гідропонного росту застосовували, як описано раніше³⁴ в IRR1 культуральному середовищі при pH 5,5 з $1,25$ mM NH_4NO_3 як постачанні N, за виключенням випадків, в яких вказано інше. РНК коріння екстрагували для РЧ-ПЛР аналізу.

Антитіло production і вестерн-блотинг

Повні послідовності кДНК з OsNRT2.3a/b генів були ампліфіковані з плазмід OsNRT2.3a (AK109776) та OsNRT2.3b (AK072215) за допомогою праймерів, F: GGAATTCTCACACCCCGGCCGG (SEQ ID No. 17), R: CGGGATCCATGTGGGGC GGCATGCTC (SEQ ID No. 18). Плазміди були введені Dr. Kikuchi (KOME). ПЛР фрагмент був суб-клонований в бактеріальному векторі експресії pGSX (Amersham) в BamH I та EcoR I сайтах. Амінокислотні продукти очищували та їх моноклональні антитіла були синтезовані³⁵. Моноклональне антитіло вибирали з 192 індивідуальних клітинних специфічних реакцій OsNRT2.3a (516 aa) або OsNRT2.3b (486 aa) протеїну. Екстрагування плазматичного мембранного протеїну з коріння та вестерн-блотинг проводили як раніше описано^{10,14} та повторювали двічі.

Гібридизація РНК in situ

Гібридизацію РНК in situ проводили як раніше описано³⁶. Для зонда OsNRT2.3b, сайт зв'язування знаходиться в OsNRT2.3b специфічному 5' UTR зі своєю послідовністю CGATGGTTGGGTGCGGCGAGA (SEQ ID No. 19). Несмислова послідовність являє собою GCTACCAACCCACGCCGCTCT (SEQ ID No. 20). Всі зонди мітили на 5' кінці DIG.

Визначення накопичення ^{15}N в корені

Рисові садженці HT та рослини з надекспресією вирощували в IRR1 розчині поживних речовин, який містить $1,25$ mM NH_4NO_3 протягом двох місяців в теплиці та потім видаленням N протягом 3 днів. Рослини промивали в $0,1$ mM CaSO_4 протягом 1 хв, потім переносили в розчин, який містить або $1,25$ mM $\text{Ca}(^{15}\text{NO}_3)_2$ (атом% ^{15}N : 99,27 %) або $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (атом% ^{15}N : 95,7 %) or $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ (атом% ^{15}N : 45 %) or $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ (атом% ^{15}N : 45,25 %) або $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ (атом% ^{15}N : 95,5 %) протягом 5 хв, та назавершення знову промивали в $0,1$ mM CaSO_4 протягом 1 хв. Коріння відокремлювали від пагонів одразу після кінцевого перенесення в CaSO_4 , та заморожували в рідкому N. Після посадки в ґрунт, аліквоту порошку сушили до постійної маси при 70°C . 10 мг порошку кожного зразка аналізували, застосовуючи MAT253-Flash EA1112-MS систему (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). Весь експеримент повторювали двічі та кожного разу з п'ятьма повторами.

Збирання соку ксилеми та флоєми

Рисові садженці вирощували в $1,25$ mM NH_4NO_3 протягом 8 тижнів та потім переносили на N обробки (нітрат: $1,25$ mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; амоній: $1,25$ mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) протягом 24 год., та потім зрізали на 4 см вище кореня. Нижня частина в N розчинах була для збирання соку ксилеми³⁴, та верхня частина була для збирання соку флоєми¹⁶.

Збирання соку флоєми, коротко, кожен пагон вносили в 50 мл скляні пробірки з 15 мл 25 мМ ЕДТА- Na_2 , накриті парафілном. Пагон вставляли через парафілм та збирали сік флоєми протягом 24 год. Зміни рН флоєми вимірювали, застосовуючи рН-метр (модель 868, Thermo Orion, USA), та за допомогою розрахунку різниці рН в зразках на початку та в кінці періоду збору соку флоєми. Експеримент проводили з 5 зразками повторювання та повторювали двічі.

Сік флоєми, крім того збирали, застосовуючи спосіб з комахою, яка його споживає, з тими самими рослинами, як зазначено вище. Кожну рослину вставляли в 250 мл бутылку з IRR1 розчином поживних речовин з шістьма рослинами, які зберігались в коробках з комахами при 26 °C та протягом 16 год. світлого періоду. Від семи до десяти дорослих коричневих дельфацидів перенесли на кожную рослину на початку N обробок. Краплю меду рисової флоєми, виділену комахами, збирали через 24 год., 48 год. після N обробок (фіг. 17).

Одержання ооциту, мРНК ін'єкція, ^{15}N поглинання та електрофізіологія

Одержання ооцитів, мРНК ін'єкція, ^{15}N -поглинання нітрату та електрофізіологія були описані раніше^{37,39}. 0,5 мМ $\text{Na}^{15}\text{N-NO}_3$ або $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$ в ND96 застосовували для експерименту з ^{15}N поглинання протягом 16 год³⁸. Спосіб з рН селективним мікроелектродом застосовували, щоб виміряти цитозольний рН¹⁸.

Мутація в одному сайті OsNRT2.3b та синтез мРНК

Точкова мутація (H167R) OsNRT2.3b була проведена, застосовуючи спосіб ПЛР. Точковий мутант обробляли двома ПЛР фрагментами OsNRT2.3b з мутантним сайтом та новим сайтом рестрикції в праймерах. OsNRT2.3b кДНК в рT7Ts застосовували як ДНК матрицю, та перший ПЛР фрагмент (H167RB) був суб-клонований в HindIII та XbaI з рT7Ts. Новий плазмід та другий ПЛР фрагмент (H167R) обробляли Csp45 I та Xba I, та сшивали в кінцевий плазмід з H167R мутованим сайтом OsNRT2.3b кДНК (pH167R). мРНК синтез pH167R був описаний, як зазначено вище.

Одержання РНК та ДНК мікроматрична гібридизація

Три повторювання кожного з HT (Nipponbare), a-U1 та b-S6 пагонів збирали з 150 кг N /га обробки на полі Changxing експериментальної станції в 10:00 ранку 1ого серпня, тобто стадія максимального кушіння для всіх рослин. Зразки тканин пагонів, взяті для екстракції РНК були швидко заморожені при -80 °C в рідкому азоті одразу після збирання. Екстракцію РНК, гібридизацію з Affymetrix рисовою матрицею GeneChip (Santa Clara, CA, USA), дані аналізу та коментарі були такими, як описано в попередніх повідомленнях⁴⁰.

Кількісний РЧ-ПЛР в реальному часі

Загальну РНК від трьох біологічних представників, конкретно від коріння та пагонів з HT та трансгенних рослин, виділяли, застосовуючи TRIzol реагент відповідно до інструкцій виробника (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)¹³.

Газообмін та вимірювання післясвітіння спалаху CO_2

Показник світло-насиченого фотосинтезу видовженої форми листя вимірювали з 9:00 год. до 15:00 год., застосовуючи Li-Cor 6400 портативну відкриту систему для фотосинтезу у рослини при обробці 150 кг N /га на полі Changxing експерименту в той же день, як відбирали зразки для мікроматричного аналізу. Температуру листка під час вимірювань підтримували при $27,0 \pm 0,1$ °C інтенсивністю потоку фотосинтетичних фотонів (PPFD) 1500 мкмоль фотонів $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, як описано раніше⁴¹. концентрація CO_2 в навколишньому середовищі в кюветі (Ca-c) регулювався концентрацією атмосферного CO_2 (Ca) ($417 \pm 1,0$ мкмоль CO_2 моль⁻¹), та відносна вологість утримувалась на 20 %. Дані реєстрували після досягнення рівноважного стабільного стану (10 хв). Виміряне листя мітили, та площі листків розраховували ґрунтуючись на міченій площі. Післясвітіння спалаху CO_2 (PIB) вимірювали в тому самому міченому листку в фотореспіраторних умовах (насичення PPFD 1 500 мкмоль фотонів $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, Ca-c CO_2 концентрація 100 мкмоль CO_2 моль⁻¹, відносна вологість 60 %-70 %, як описано раніше²².

Результати

Надекспресія OsNRT2.3b підвищувала ріст рису

Ми генерували рисові (*Oryza sativa* L ssp. Japonica, cv. Nipponbare) рослини, що експресують OsNRT2.3a та OsNRT2.3b шляхом трансформацію опосередкована агробактеріями, застосовуючи або убіквітин, або 35S промотори (фіг. 1a, b). Лінії з надекспресією були названі a-U1 та a-U2 для OsNRT2.3a, b-U1, b-U2, b-S2 та b-S6 для OsNRT2.3b, відповідно з однією вставкою-копією. Цікаво, OsNRT2.3b лінії з надекспресією, які були підтверджені як в рівнях транскрипту, так і протеїну (фіг. 1cd), показали більший ріст порівняно з немутантним типом (WT) (фіг. 1a, b). Біомаса та розмір волоті з ліній з надекспресією була більшою, ніж HT (фіг. 11; таблиця 2-3). Розмір першого та другого остюка був збільшеним, таким чином, загальна кількість насіння на волоть була більшою, ніж HT (фіг. 11, таблиця 2). На відміну від цього, рослини з надекспресією OsNRT2.3a не показали видимої різниці від HT навіть, якщо

OsNRT2.3a мРНК та протеїн був збільшеним в трансформованих лініях (фіг. 1с, d, фіг. 11). Результати *in situ* гібридизації показали, що OsNRT2.3b мРНК в b-S6 листку надекспресували в епідермальних, флоемних та мезофільних клітинах, порівняно з немутантним типом (фіг. 1е). Більше того: коли OsNRT2.3b був надекспресований в інших високоврожайних та з високим

5 NUE сортах рису, WYJ7 від саузерн China та YF47 від нозерн China, їх врожайність зерна та NUE (врожайність зерна розділена на застосовані N добрива) також була значно підвищеною (Figs. 12, 13).

Польові випробування ліній з надекспресією показують підвищену врожайність зерна та NUE як в субтропічних, так і тропічних кліматичних умовах в діапазоні показників внесення N

10 добрив.

Стимульований сильними фенотипами рослин з надекспресуючим OsNRT2.3b в гідропонних та ґрунтових горщиках, ми виростили відібрані Nipponbare, WYJ7 та YF47 трансгенні лінії та їх немутантні типи в 4 польових випробуваннях, щоб оцінити їх ефективність при різних показниках внесення N добрив.

15 Чотири Nipponbare T2 трансгенні лінії та HT вирощували з чотирма рівнями застосування N добрив на рисових полях (ґрунт pH 6,3), розташованих в Changxing в субтропічній кліматичній зоні (фіг. 2). Порівняно з HT, біомаса, кількість насінин на волоть, швидкість дозрівання, врожайність зерна та NUE трансгенних ліній були значно підвищеними на всіх рівнях застосування N (фіг. 2а-с, таблиця 5). Середнє підвищення врожайності зерна знаходилось в

20 діапазоні від 33 % при 75 кг N/га до 25 % при 300 кг N/га. Врожайність зерна ліній з надекспресією, яким постачалось 150 кг N/га, була на від 6 % до 13 % вищою, ніж врожайність HT з внесеними добривами 300 кг N/га (фіг. 2b). Надзвичайно найкраще виконана трансгенна лінія, b-S6 виробляла подібну врожайність зерна при 75 кг N/га порівняно з HT при 300 кг N/га (фіг. 2b, таблиця 5). NUE ліній з надекспресуванням OsNRT2.3b досягали 68-79 г/г N при рівні

25 застосування 75 кг N/га, порівняно з 55 г/г N в HT (фіг. 2с). В великомасштабному польовому експеримент, в якому постачалось 75 кг N/га, врожайність та NUE лінії b-U2 становили на 30,5 % більше, ніж HT; тоді як для лінії b-S6 значення становили на більше за 40,5 % (фіг. 2d, e, f).

В другому польовому випробуванні, T5 покоління b-S2 та b-S6 вирощували в тропічному Hainan (фіг. 14а). Значні підвищення врожайності зерна та NUE знову були отримані. Найбільша різниця між трансгенними лініями та Nipponbare HT була знайдена при постачанні 110 кг N/га (фіг. 14b). Більше того: схрещування b-S6 T5 рослин з HT підтверджувало, що b-S6 фенотип повністю робив внесок в надекспресію OsNRT2.3b, оскільки в F2 поколінні рослин aa генотип, що повертався до HT та AA генотипу, був подібним b-S6 (фіг. 15).

35 В третьому польовому випробуванні досліджували лінії з надекспресуванням OsNRT2.3b в WYJ7 на фоні трьох постачань N (110 та 220 кг N/га) в Changxing. Серед чотирьох трансформованих ліній (T2 покоління), врожайність зерна була на 35-51 % більшою ніж у HT при 110 кг N/га, та на 38-42 % більшою при 220 кг N/га. В середньому, NUE був на 43 % вищим, ніж у HT (фіг. 12f).

40 В четвертому польовому випробуванні досліджували лінії з надекспресуванням OsNRT2.3b в YF47 вихідному сорті в Hainan (фіг. 15). Аналогічно до отриманих результатів з іншими двома фонами, надекспресія OsNRT2.3b в YF47 давала більше біомаси та на 39 % більшу врожайність зерна, ніж HT при звичайному постачанні N добрива (150 кг/га) (фіг. 13а, d). Взяті разом, надекспресія OsNRT2.3b давала послідовні ефекти на врожайність зерна та NUE в різних

45 вихідних сортах, кліматичних зонах та N нормах внесення.

В фоновому Nipponbare, надекспресія OsNRT2.3b в результаті призводила до затримки в цвітінні порівняно з HT, на 15 ± 2 днів при 150 кг/га та 20 ± 2 днів при 300 кг/га (фіг. 2а, d, фіг. 16, таблиця 1). В експериментах в горщиках з даними рослинами, через 120 днів після пророщування врожайність зерна b-S2 та b-S6 була на 37 % та 40 % вищою, ніж HT (фіг. 16g). Через 140 днів врожайність зерна b-S2 та b-S6 була на 55 % та 49 % вищою, ніж HT (фіг. 16g). Додаткові 20 днів підвищували їх врожайність тільки на 18 % та 9 % порівняно з даними за перші 120 днів. Зрозуміло, що найбільший внесок надекспресії OsNRT2.3b щодо врожайності зерна був зроблений за 120 днів. Більше того: 20 днів відстрочки росту в значній мірі не підвищили загальне N поглинання для рослин з надекспресією OsNRT2.3b (фіг. 16h). Однак 20

50 днів відстрочки підвищило співвідношення біомаси та перенесення N до зерна (таблиці 3-4) та ефективність застосування N (асиміляція) (NUE) з 33 г- зерно/г-N за 120 днів (не значна відмінність від HT) до 39,1-40,2 г-зерно/г-N за 140 днів (значна відмінність відносно HT для b-S2 та b-S6 (фіг. 16i). Фактично, відносно HT не було затримки цвітіння OsNRT2.3b надекспресування в фонових WYJ7 та YF47.

60 OsNRT2.3b надекспресія підвищувала нітратний транспорт в середину клітини, транспорт в

пагон, рН ксилеми, рН флоеми гомеостазу, накопичення Р та Fe в листі.

Ми вимірювали ефект від надекспресії OsNRT2.3b на ^{15}N -нітратний транспорт в середину клітини на чотирьох Nirronbare трансформованих лініях методом росту на гідропонії при рН 6 (фіг. 3а). Швидкість нітратного транспорту в середину клітини була значно збільшеною в усіх трансгенних лініях порівняно з НТ (фіг. 3а), демонструючи підвищені активності OsNRT2.3b в даних рослинах. На відміну від цього, надекспресія OsNRT2.3b мала незначні ефекти на короткотермінове поглинання ^{15}N -амонію (фіг. 3а).

Більше нітрату та менше амонію було виявлено в ксилемі b-U 1, b-U2, b-S2 та b-S6 порівняно з НТ при постачанні нітрату (фіг. 3b). рН ксилема становив 7 та 7,3 в НТ, обробленому, відповідно, нітратом та амонієм, тоді як він становив 7,5 та 7,6-7,8 в лініях з надекспресуванням OsNRT2.3b, значно вищий, ніж НТ. Після 24 год. N обробки, збирали сік флоеми. рН соку флоеми вимірювали, застосовуючи EDTA- Na_2 спосіб збирання¹⁶, та менше закислення було знайдене для ліній з надекспресією OsNRT2.3b. Різниця між НТ та лініями з надекспресією становила приблизно 0,2 рН одиниці в нітраті та приблизно 0,1 рН одиниці в амонію. Для того, щоб контролювати рН флоеми, застосовуючи відмінний спосіб, сік збирали з комах, які споживали флоему (описано на фіг. 9). рН флоеми НТ зменшувався з 7,8 до 6,1 та b-S6 з 6,7 до 6,0 при постачанні нітрату від 24 до 48 год. обробки (фіг. 9а); тоді як при обробці амонієм НТ рН флоеми зменшувався з 7,4 до 6,3 та b-S6 з 6,6 до 5,9 від 24 до 48 год. (фіг. 9b). Різниця між НТ та b-S6 при постачанні нітрату була надзвичайно високою при 24 год., однак незначна відмінність була знайдена при 48 год. При постачанні амонію, незважаючи на те, що рН в соці НТ був вищим, ніж в b-S6 різниця була незначною (фіг. 9b). Закислення рН флоеми НТ в нітраті становило приблизно 1,7 рН одиниць, однак, воно становило тільки 0,7 рН одиниці в b-S6 рослинах (фіг. 3е). Після 48 год. рН зібраного соку флоеми регулювали для того, щоб надати більш подібні значення для НТ та b-S6 рослин (фіг. 9b). Більш того рН апопласта кореня в НТ та b-S6 коренях досліджували, застосовуючи бромкрезоловий пурпурний індикатор¹⁷ після 72 год. відмінних N обробках. Лінія надекспресування b-S6 показала алкалінізацію в нітраті та підкислення в амонію відносно НТ (фіг. 18а, b), в той же час рН в гідропонному середовищі не показало значної різниці між НТ та b-S6 протягом однакового періоду часу (фіг. 18с), оскільки основний об'єм розчину був достатньо великим, щоб буферити будь-які зміни рН, що відбуваються на поверхні кореня.

При постачанні нітрату амонію також вимірювали загальний Р та Fe в рослині. Як загальний Р та Fe були підвищеними в листі ліній з надекспресуванням порівняно з НТ (фіг. 19), особливо щодо загального Fe, він був в 3-6 разів більшим, ніж у НТ.

Надекспресія OsNRT2.3b підвищувала загальне N поглинання в суміші, що постачалась з амонію та нітрату при рН 4 та 6.

Рослинам, що мали потребу в N, знову постачали $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$, або $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$, або $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ при рН 4 та 6 протягом 5 хв, щоб виміряти поглинання N коренем (фіг. 4). Дані результати чітко показали, оскільки рН підвищений, $^{15}\text{NO}_3$ -транспорт в середину клітини був зниженим, $^{15}\text{NH}_4^+$ та загальний ^{15}N був драматично збільшеним, як для НТ, так і для всіх трансгенних ліній OsNRT2.3b (порівняння фіг. 4а, b, c). Лінії з надекспресією OsNRT2.3b показали більше $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ та загальне N поглинання при рН 4 та 6. В польових експериментах, рН ґрунту знаходився в діапазоні від 4,4 до 6,4 (фіг. 1, 2, 13-14), фенотип трансгенних ліній, вирощених в полі, може пояснюватись збільшеним загальним поглинанням N (нітрату та амонію) даними рослинами.

Транспортна функція OsNRT2.3b, яка регулюється цитозольним рН

Оскільки надекспресія OsNRT2.3b має такий великий вплив на NUE та ріст рису, та даний ефект був пов'язаний з рН гомеостазом рослини, ми досліджували функцію транспортера більш детально на молекулярному рівні. В гетерологічних експериментах щодо експресії, зміни, викликані нітратом в мембранному потенціалі *Xenopus* ооцитах, які експресують OsNRT2.3b, не могли реагувати на послідовні обробки нітратом (фіг. 5а). Необхідним було залишати ооцит в спокої протягом, щонайменше, 30 хв між обробками нітратом, щоб відновити електричну реакцію, або він міг реагувати на нітрат одразу після після промивання сольовим розчином з рН 8,0 (фіг. 5а). Вимірювання двоканальним рН електродом показали, що закислення на 0,2 рН цитозольного рН запобігали другій реакції на нітрат OsNRT2.3b, ін'єкційно введеного, ооцитам (фіг. 5а). Спостерігалась незначна затримка відповіді цитозольного рН порівняно з зсувом мембранного потенціалу до зовнішньої обробки нітратом (фіг. 5а). Дана затримка цитозольного рН від відповіді мембранного потенціалу була представлена іншими авторами^{18,19}.

Погоджена трансмембранна (ТМ) вторинна структура OsNRT2.3b була попередньо оцінена, застосовуючи комплект програмного забезпечення. 14 комплектів програмного забезпечення змодельовали, що OsNRT2.3 має 11 ТМ з N кінцями на цитозольний стороні, та перших 5 ТМ є

представленими в таблиці нижче. Н 167 амінокислота була змодельована в цитозольній стороні, як в таблиці, так і на фігурі, яка була показана з єдиним сайтом мутагенезу, кільцевою мішенню в модельованій вторинній структурі нижче, модельованій за <http://bioinfo.si.hirosaki-u.ac.jp/~ConPred2/>). рН-чутливий мотив VYEAIHKI знаходиться навколо залишку 167 на цитозольній стороні.

Цікаво, аналіз біоінформатики модельованої OsNRT2.3b протеїнової структури показав рН-чутливий мотив VYEAIHKI²⁰ навколо гістидинового (H) залишку OsNRT2.3b, який розташований лицем до цитозольної сторони на плазматичній мембрані, після мутація в одному сайті (H167R), OsNRT2.3b втрачає дану функцію регулювання цитозольного рН, навіть після повторних циклів обробки нітратом (фіг. 5b). Результати показують, що гомеостатичні механізми ендегенного ооцитного клітинного рН були здатні відновити цитозольний рН над порогом для транспортної активності OsNRT2.3b. Коли ооцити інкубували в ¹⁵N-нітраті протягом тільки 4 годин, регуляторний ефект цитозольного рН на нітратний транспорт був очевидним, оскільки порівняння H167R та форм немутантного типу OsNRT2.3b показали, що мутація в результаті призвела до набагато більшого накопичення нітрату (фіг. 5c). Однак, після 8 год. інкубування відмінності в активності двох форм транспортера зникали; припускаючи, що після довшого інкубування накопичення нітрату максимально досягалась в ооцитах.

Знижена експресія фотореспіраторного гена та фотореспірація

Відомо, що деякі гени є специфічно зв'язаними з рослинною фотореспіраторною активністю²¹. Мікроматриця та підтверджуючий qPCRs показали характерну ділянку генної експресії, яка показує, що фотореспірація була змінена в рисі з надекспресуванням OsNRT2.3b, при порівнянні з НТ та лініями з підвищеними транскриптами OsNRT2.3a.

Загальний фотосинтез в b-S2 та b-S6 був підвищеним порівняно з НТ, але b-U1 та b-U2 значно не підвищувався. Однак, концентрація міжклітинного CO₂ була збільшеною, та фотореспіраторна швидкість була знижена в усіх лініях з надекспресією порівняно з НТ (фіг. 20). Знижена фотореспірація та підвищений фотосинтез в трансгенних рослинах могла сприяти більшій біомасі²². Ці дані підтверджували, що підвищена ефективність фотосинтезу в рослинах з надекспресуванням OsNRT2.3b сприяють сильному фенотипу.

Обговорення

Перемикач рН чутливої активності OsNRT2.3b є одним з ключових чинників, що забезпечують пояснення фенотипу трансгенних рослин, оскільки трансформування мутантного гена OsNRT2.3b H167R в Nipponbare рослинах не збільшували висоту, врожайність та не затримували репродуктивну стадію (фіг. 21). рН-чутливий мотив VYEAIHKI (SEQ ID No. 16) навколо залишку 167 є характеристикою родиною аніонообмінників, які є знайденими в багатьох різних організмах, включаючи ссавців, та можуть, таким чином, мати більш загальну біологічну значимість²⁰. Підвищення зовнішнього рН зменшувало накопичення нітрату в ооцитах експресування OsNRT2.3b (фіг. 5d), підтримуючи ідею, що OsNRT2.3b являє собою протон-нітратний спів-транспортер¹⁴. Підвищення зовнішнього рН зменшує протонний градієнт, який керує нітратним транспортом, але, з іншого боку, він відновлює функцію нітратного транспорту OsNRT2.3b, роблячи цитозол більш лужним. Обидва ефекти відбуваються через зміни рН, але кожен відбувається на різних сторонах плазматичної мембрани. In planta одночасний транспорт в середину клітини нітрату та амоній протидіє цитозольному рН регуляторному ефекту чутливого мотиву OsNRT2.3b. Протон-контраспортний механізм для входу нітрату в клітини передбачає цитозольне закислення, тоді як амонійний транспорт може спричиняти алкалінізацію²³, що може підвищувати протон-кон'югований нітратний транспорт. Даний короткостроковий синергізм між амонійним та нітратним транспортом для підтримання цитозольного рН може пояснити виміряне зростання в ¹⁵N-амонійному поглинанні, коли рослині постачалось змішане джерело N (фіг. 4), за винятком можливості, що OsNRT2.3b протеїн сам по собі може поглинати амоній в ооцитах (фіг. 22). В НТ рослинах, OsNRT2.3b експресія була низькою¹³ та в основному локалізувалась в флоємі листя, але не коріння (фіг. 1d). Трансгенні рослини з надекспресією OsNRT2.3b, керовані сильними промоторами мали більш загальну тканинну експресію (фіг. 1d). Синергізм між амонійним та нітратним транспортом був збільшеним надекспресією рН чутливого транспортера OsNRT2.3b більш загально в клітинах кореня.

Форма постачання N для рослин є добре відомою щодо впливу на рН баланс рослини²⁴. Асиміляція амонію продукує, щонайменше, один H⁺ на NH₄⁺; тоді як NO₃⁻ асиміляція продукує фактично один OH⁻ на NO₃⁻. Або H⁺, або OH⁻, продукований в надлишку від того, що потребується, щоб підтримувати цитоплазматичний рН, експортується від клітин на енергоспоживаючу стадію (наприклад, плазматична мембрана H⁺ накачування ATPase)^{4,10}. Васкулярна специфічна експресія OsNRT2.3b в НТ рослинах припускає можливу специфічну

роль в транспорті на довгу дистанцію в межах рослини. Для дослідження даної ідеї ми порівняли рН соку флоєми з N-недостатніх рисових рослин, поповнених нітратом або амонієм. Постачання нітрату та амонію підкислювало рН флоєми НТ та трансгенних рослин (фіг. 3d, e). Цікаво, що підкислення флоєми було значно меншим в чотирьох трансгенних лініях при порівнянні з НТ (фіг. 3d, e), хоча, не значна різниця в нітратній концентрації могла бути виявлена в флоємі (дані не показані). Ці дані показують, що трансгенні рослини є краще здатними регулювати рН флоєми, показуючи, що це є важливим чинником для покращеного NUE. Більше того: різниця в рН флоєми між НТ та трансгенними (фіг. 17a, b) могла пояснити підвищене накопичення Р та Fe в листі рослин з надекспресуючим OsNRT2.3b (фіг. 19). Більш кислотний сік флоєми (фіг. 17) буде сприяти транслокації Р та Fe в листку²⁵. Разом з підвищеним поглинанням N, це також було важливим чинником для підвищення росту та врожайності рослини.

Доповідалися, що підвищення кислотності цитозольного рН інактивувало транспорт аквапорину в ооцитах²⁶. Як обговорювалось цими та іншими авторами²⁶, припускалось, що цитозольний рН міг бути ключовою регуляцією, як для аквапорину, так і нітратного транспортеру в рослинах. Більше того: оскільки нітратна асиміляція залежить від фотореспірації²⁷, співвідношення^{4,28} між асиміляцією нітрату, амонію та фотореспірацією є тісно пов'язаними з курсуючим малатом між цитоплазмою та хлоропластом, щоб збалансувати рН²⁹.

Добре відомо, що багато важливих характеристик сільськогосподарської культури подібних NUE є комплексом мультигенних характеристик⁴. Однак, декілька повідомлень показують, що зміна експресії одного транс-ген може значно покращити NUE сільськогосподарської культури^{30,32}. Різке підвищення продуктивності OsNRT2.3b трансформованих рослин при різних польових умовах показує перспективи покращення рисового NUE за рахунок одного з транс-генних підходів. Поєднання балансу рН та NUE, ймовірно існує для того, щоб мати більш загальну значимість для сільськогосподарських культур та пропонує перспективний шлях підвищення NUE.

2. Експресія OsNRT2.3b в арабідопсисі

Ми отримали дані щодо 35S-керованої експресії OsNRT2.3b в арабідопсисі. Рослини арабідопсису були трансформовані, застосовуючи стандартні квіткового занурення методики трансформації, опосередковані агробактерією (Clough & Bent 1998). В чашці Петрі експерименти щодо рослини арабідопсису доставляли постачанням або 0,2, або 6 мМ нітрату. Три незалежні лінії рослини арабідопсису з надекспресуванням OsNRT2.3b (контролювали на рівні мРНК, застосовуючи РЧ-ПЛР) досліджували та порівнювали з немутантним типом контрольних рослин (дивись фігуру 6). Дані на фігурі 6 показують, що три незалежні лінії арабідопсису з надекспресуванням рисового транспортеру, який росте в 6 мМ нітраті, мав значно більшу пагонну біомасу (фіг. А) та мав більш коротке коріння при 0,2 мМ постачанні (фіг. В) відносно немутантного типу рослин. Більше того: дві з даних ліній накопичували більше нітрату в тканині.

Дані рослини вирощували в дуже простій культуральній системі на агарових чашках Петрі з рослинними поживними речовинами, доданими до агару (дивись Orsel et al. 2006 щодо деталей). Ми будемо повторювати дані експерименти в гідропонних культурах та ґрунтових горщиках, щоб визначити та порівняти NUE між немутантними типами та лініями з надекспресуванням OsNRT2.3b. 15N-збагачений нітрат буде застосовуватись у чашці Петрі та гідропонних експериментах, щоб виміряти та порівняти показники нітратного транспорту в середину клітини між немутантними типами та лініями з надекспресуванням (дивись Orsel et al. 2006 щодо способів). Рослини будуть вирощені та порівнюватимуться при змішуваних постачаннях азоту, що включає амонію нітрат або нітрат як єдине джерело азоту.

Експресія OsNRT2.3b в тютюні

Спосіб та матеріали:

Конструкція вектору надекспресії та трансгенні рослини

Відкриті рамки зчитування OsNRT2.3b були ампліфіковані генними специфічними праймерами (таблиця 1). Фрагмент обробляли рестрикційними ферментами, вставляли в вектори та секвенували перед трансформацією. Ембріональні калуси *Nicotiana tabacum* сорту 89 були трансформовані, застосовуючи способи, опосередковані агробактеріями (Ai et al. 2009). рослини з однією вставкою-копією ТО збирали та вирощували, щоб отримати рослини T1 (фіг. 1). Гомозиготні рослини T1 брали для одержання T2.

Саузерн-блотинг

Незалежні трансгенні лінії з нокдауна гена OsNRT2.3a, а саме r1 та r2, були одержані за аналізом саузерн-блотингу, наступними процедурами, описаними раніше (Jia et al., 2011).

Напів-кількісна РЧ-ПЛР

Загальну РНК виділяли зі 100 мг рослинного матеріалу, застосовуючи тризольний реагент (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Концентрації загальної РНК визначали, застосовуючи УФ-спектрометрію (Eppendorf, Biophotometer, Germany) 2 мкг загальної РНК з кожного зразка застосовували як матрицю для синтезу першого ланцюга кДНК, який здійснювали, застосовуючи М-MLV обернену транскриптазу (Fermentas, Foster City, CA, USA) відповідно до керівництва від виробника. ПЛР ампліфікацію здійснювали, застосовуючи Таq ДНК полімерази (Fermentas, Foster City, CA, USA) для генів-мішеней зі специфічними праймерами, показаними нижче.

4. Експресія OsNRT2.3b в пшениці

Локалізована в флоемі експресія NRT2.3b, та недавно отримані результати, що значні кількості нітрату транспортуються в флоему, наприклад, Fan et al. 2009 (раніше, як правило, припускалось, що нітрат транспортується з кореня до пагона в ксилемі), разом з важливою роллю флоєми в рН гомеостазі підтверджує, що специфічний експресія OsNRT2.3b в флоемі може бути важливою щодо результатів, які доповідаються (наприклад, покращеного NUE). З даних причин ми застосовували як убіквітин, так і флоема-специфічні промотори, щоб керувати експресією OsNRT2.3b в пшениці. Убіквітиновий промотор застосовували для трансформації, як показано на фіг. 27 та 28. конструкція вектору 35S-OsNRT2.3b була описана в рисовій трансформації, та одержували пшеницю, застосовуючи, зокрема бомбардування калусу, культивованого з чутливими різновидами незрілих зародків Yangmai158, як описано (Cao et al). Трансгенна рослина показала підвищену врожайність порівняно з НТ рослинами, дивись фіг. 27 та 28.

5. Стійкість до патогену трансгенного рису

Трансгенні рисові рослини, що експресують OsNRT2.3b, одержані як описано вище, аналізували в польових дослідженнях в Hainan щодо стійкості до патогену. Основні захворювання рису в Hainan – фузаріозний вілт, плямистість листя та жовта іржа злаків. Для кожної ділянки, показники виживаності підраховували за кількістю рисових рослин при збиранні врожаю/перенесенні рисових рослин на початку січня. Трансгенні рослини показали кращі показники виживаності порівняно з НТ рослинами (фігура 26).

Праймери, застосовані для РЧ-ПЛР гена OsNRT2.3b

Праймера генів

OsNRT2.3b (AK072215)

F:5'- CGTTCGCCGTGTT-3'(SEQ ID No. 21)

R:5'- TCGAAGCGGTCGTAG AAG-3' (SEQ ID No. 22)

Актин

F:5'-TTATGGTTGGGATGGGACA-3'(SEQ ID No. 23)

R:5'-AGCACGGCTTGAATAGCG-3'(SEQ ID No. 24)

Праймери, застосовані для конструктів з над експресією

ПРОМОТОР	ВЕКТОР		ПРАЙМЕРИ	ФЕРМЕНТИ
CaMV-35S	pCAMBIA1302	F	atCCATGGAGATCTCAGGGCACAGCGGATG (SEQ ID No. 25)	Bgl II
		R	atCCATGGAGATCT ACACCCCGGCCGG (SEQ ID No. 26)	Bgl II
Убіквітин	p TCK303	F	caACTAGTGCTACCACGTGTTGGAGATG (SEQ ID No. 27)	SpeI
		R	GaACTAGTGAGCAAACCAACAAGC (SEQ ID No. 28)	SpeI

Праймери, застосовані для субклонування генів OsNRT2 та генів OsNAR2 в pT7Ts

Ген	Вектор клону	Праймери субклонування	Лінеаризація сайтів плазмиди	Промотор для синтезу РНК
OsNRT2.3b (AK072215)	pLambda -FLC I	F: AAT C AG AT CTTT GGAGCTCCACCGC (SEQ ID No. 29) R: CAGAACTAGTCCCCCCTCGAAGG (SEQ ID No. 30)	Xba I	T7

Праймери застосовані для H167R сайта мутанта OsNRT2.3b

Мутація	Мутагенний праймер	Кодонна зміна	Новий сайт рестрикції
H167R-F	GCCATT CGA AAGATCGGTAGCACGC	CAC (H) - CGA (R)	Csp45 I
	(SEQ ID No, 31)		(TTCGAA)
	(вихідна послідовність: GCCATC CAC AAGATC GGTAGCACGC) ^a (SEQ ID No.32)		
H167R-R	GCATTCTAGATTCTGAATGGCCTCGTACACG (SEQ ID No.33)		Xba I
			(TCTAGA)
H167RB-F	T7	Xba I (TCTAGA)	
67RB-R	GCATTCTAGATTCTGAATGGCCTCGTACACG (SEQ ID No. 34)		Csp45 I (TTCGAA)

^aПродукт АТТ та АТС є однаковою амінокислотою, ізолейцином
Праймери застосовані для РЧ-ПЛР гена OsNRT2.3

Гени	праймери
OsNRT2.3a (AK072215)	F: 5'- GCTCATCCGCGACACCCT-3' (SEQ ID No. 35)
	R:5'- GTCGAAGCGGTCTG TAGAA-3' (SEQ ID No. 36)
OsNRT2.3b (AK072215)	F:5'- CGTTCGCCGTGTT-3'(SEQ ID No. 37)
	R:5'- TCGAAGCGGTCTG TAG AAG-3' (SEQ ID No. 38)
OsActin (NM_197297)	F:5'-TTATGGTTGGGATGGGACA-3" (SEQ ID No. 39)
	R:5'-AGCACGGCTTGAATAGCG-3'(SEQ ID No. 40)

5

Таблица 1

Різниці періоду росту між рослинами з надекспресією
OsNRT2.3b та Nipponbare немутантним типом на фіг. 16 експерименти в горщиках.

	Дата (рік/місяць/день)				
	посів	пересадка	50 %розвиток	цвітіння	повне дозрівання
HT	2011.5.10	2011.6.10	2011.8.16	2011.8.21	2011.10.8
b-S2	2011.5.10	2011.6.10	2011.9.1	2011.9.6	2011.10.28
b-S6	2011.5.10	2011.6.10	2011.9.2	2011.9.8	2011.10.28

Примітка: експеримент в ґрунті в горщиках проводили з десятьма повтореннями в експериментальному господарстві Nanjing Сільськогосподарського університету (дані показані на фіг. SF9). Кислотний ґрунт (pH 6,0, ґрунт: вода = 1:1) збирали в господарстві. Один немутантний тип, b-S2 та b-S6 рослини, які належать до двох незалежних ліній, вирощували в кожному горщику, який містить 15 кг висушеного на повітрі ґрунту з 2,25 г N доданого (n=10). ґрунт в горщику заливали протягом 1 дня перед висадкою саджанців, та вода утримувалась на рівні від 5 до 10 см глибиною до 15 днів перед збором урожаю. Повне дозрівання реєстрували, коли більшість волотей на ділянці показали повну втрату зеленого кольору. П'ять горщиків повторення зі зразками рослини збирали, коли HT рослини були повністю дозрілими, та інші п'ять горщиків повторення зі зразками рослини збирали, коли b-S2 та b-S6 рослини були повністю дозрілими. Рослини були викорані та відокремлені від вегетативної біомаси та зерен. Всі зразки рослини висушували в сушильній шафі при 70 °C, зважували та подрібнювали в порошок, та потім відбирали зразки для визначення N. Концентрацію N в тканині та насінні рослин визначали за стандартною макро-Kjeldahl методикою.

Таблиця 2

Агротехнічні характеристики рослин з над експресією
OsNRT2.3b та HT на фігурі 16 в експериментах в горщиках.

	довжина волоті (см)	маса волоті (г)	кількість первинних остюків	кількість других остюків	кількість насінин/ волоті	маса/1000 насінин (г)	показник визрівання (%)
HT	21,4±0,4b	3,2±0,2b	10,0±0,5b	20,4±1,6a	125,0±7,9b	24,1±0,4a	83,9±3,3a
b-S2	26,2±0,7a	4,5±0,3a	14,2±0,4a	29,8±2,6a	225,3±9,4a	24,6±0,4a	87,0±2,5a
b-S6	26,1±0,4a	4,4±0,1a	13,9±0,4a	27,9±3,0a	218,0±11,8a	24,3±0,4a	87,0±2,6a

Примітка: Значення є середніми ±S.E (n=10), маленькі літери показують значну відмінність на рівні 5 % з одностороннім ANOVA аналізом

5

Таблиця 3

Ефект від надекспресії OsNRT2.3b на перенесення та
накопичення рослинної біомаси на фігурі 16 в експериментах в горщиках.

Лінія	f_D (г/рослина)	$e_D-(f_D-f_{GD})$ (г/рослина)	$(e_D-(f_D-f_{GD}))/e_D$ (%)	$(e_D-(f_D-f_{GD}))/f_{GD}$ (%)
HT	47,7±1,0b	2,1±0,4b	5,9±1,3b	14,3±2,8b
b-S2	61,0±0,7a	11,0±0,9a	21,9±1,7a	50,2±3,9a
b-S6	61,7±0,6a	11,9±0,8a	23,4±1,6a	52,8±3,1a

Примітка: 1) Значення є середніми ±S.E (n=10). Маленькі літери (a, b) показують значну відмінність на рівнях 5 % порівняно з HT; 2) експерименти в горщиках проводили, як описано в таблиці 1; Транслокацію сухої маси розраховували як $e_D-(f_D-f_{GD})$; Ефективність транслокації сухої маси розраховували як $(e_D-(f_D-f_{GD}))/e_D$; Внесок транслокації сухої маси розраховували як $(e_D-(f_D-f_{GD}))/f_{GD}$.

10

Таблиця 4

Ефект від надекспресії OsNRT2.3b на перенесення та накопичення азоту рослиною на фігурі 18 в експериментах в горщиках.

Лінія	f_N (мг/рослина)	$e_N-(f_N-f_{GN})$ (мг/рослина)	$(e_N-(f_N-f_{GN}))/e_N$ (%)	$(e_N-(f_N-f_{GN}))/f_{GN}$ (%)
HT	424,6±6,4b	109,4±2,7b	29,5±0,9b	67,2±2,9b
b-S2	557,7±2,9a	199,0±4,4a	37,7±0,6a	87,0±0,8a
b-S6	556,1±9,3a	209,7±3,2a	39,6±0,4a	88,6±1,2a

Примітка: 1) Значення є середніми ±S.E (n=10). Маленькі літери (a, b) показують значну відмінність на рівнях 5 % порівняно з HT; 2) експерименти в горщиках проводили, як описано в таблиці 1; 3) Транслокацію азоту розраховували як $e_N-(f_N-f_{GN})$; Ефективність транслокації азоту розраховували як $(e_N-(f_N-f_{GN}))/e_N$; Внесок транслокації азоту розраховували як $(e_N-(f_N-f_{GN}))/f_{GN}$.

15

Таблиця 5

Агротехнічні характеристики рослин з над експресією
OsNRT2.3b та HT на фігурі 2a в польових експериментах.

Суша маса (г/рослина)	0 кг N	75 кг N	150 кг N	300 кг N
HT	21,2±0,6b	21 9±1,1 b	30,2±1,0b	28,2±4,0b
b-U1	35,0±2,2a	40,5±2,3a	57,1±2,3a	60,8±5,4a
b-U2	37,5±1,7a	40,5±3,1a	59,4±3,4a	64,3±3,5a
b-S2	37,1±1,9a	40,1±3,6a	57,9±4,1a	63,4±5,7a
b-S6	38,4±3,1a	40,6±2,8a	60,6±4,8a	65,5±5,2a

Таблиця 5

Агротехнічні характеристики рослин з над експресією
OsNRT2.3b та HT на фігурі 2a в польових експериментах.

Кількість ефективних пагонів				
HT	9,3±0,9a	9,3±0,8a	11 0±1 5a	11 3±1 1a
b-U1	8,1±0,9a	8,5±0,9a	10,2±1,5a	9,3±1,3a
b-U2	8,1±1,1a	8,6±1,0a	9,2±1,8a	9,2±1,2a
b-S2	8,2±1,2a	8,4±1,3a	9,3±1,9a	9,5±1,2a
b-S6	8,3±1,1a	8,6±1,1a	9,4±1,7a	9,2±1,1a
Кількість насінин/волоть				
HT	116±4,4b	119±7,1 b	117±6,4b	120±6,4b
b-U1	140±8,0a	159±9,5a	142±8,0a	154±7,0a
b-U2	148±9,1a	164±10,1a	165±9,1a	167±11,1a
b-S2	148±8,6a	160±9,1a	165±9,6a	163±12,6a
b-S6	152±8,9a	174±11,4a	170±8,9a	180±13,9a
Маса/1000 насінин				
HT	23,2±0,2a	24,4±0,2a	24,6±0,2a	25,0±0,6a
b-U1	23,2±0,2a	24,2±0,4a	24,2±0,3a	25,0±0,3a
b-U2	23,0±0,3a	24,3±0,2a	24,1±0,4a	25,2±0,6a
b-S2	22,9±0,3a	24,2±0,3a	24,1±0,5a	25,0±0,8a
b-S6	23,0±0,3a	24,3±0,4a	24,1±0,4a	25,0±0,8a
Показник дозрівання (%)				
HT	64,9±2,4b	68,1±2,2b	78,9±2,8b	83,3±2,2b
b-U1	72,0±2,0a	78,0±1,5a	88,0±2,9a	95,1±3,0a
b-U2	73,0±1,9a	78,8±2,9a	88,3±2,4a	94,5±2,9a
b-S2	72,0±2,6a	78,8±2,3a	89,0±2,2a	93,5±1,6a
b-S6	74,0±2,8a	79,5±2,4a	88,0±2,6a	92,9±3,1a
Маса зерна (г/рослина)				
HT	16,2±0,4b	18,6±0,9b	24,7±0,8b	28,2±1,0b
b-U1	18,9±1,4a	25,5±1,5a	31,8±1,3a	34,0±2,0a
b-U2	20,1±0,9a	27,1±2,1a	32,5±1,8a	36,7±2,0a
b-S2	20,0±1,0a	25,6±2,0a	33,0±2,3a	36,1±2,3a
b-S6	21,5±1,7a	28,8±2,0a	33,9±2,7a	38,2±2,4a

Примітка: Десять рослин з кожного повторення з кожної обробки відбирали як зразки для даного агротехнічного аналізу та в трьох повтореннях. Значення є середніми \pm S.E (n=30). Маленькі літери (a, b) показують значну відмінність на рівнях 5 % порівняно з HT.

5 Перелік послідовностей

SEQ ID No. 1 послідовність нуклеїнової кислоти OsNRT2.3b, номер доступу No: AK072215
найдовший ORF,

дивись http://cdna01.dna.affrc.qo.jp/cDNA/report/KQME_AK072215.html

10 T GGCGATGGAGGTGGAGGGGGTCGAGGCGGCGGGGGCAAGCCGCGTTTCAGGATGCCGG
CTCCTTCCACATGGCGTGGTTCTCCTTCTTGCTGCTTCGTGTCCACGTTTCGCCGTGTT
CGCGCGTCTGGCCATGGGCACGGCGTGGACCTGGTCGGGCCAGGCTGGCCTCCGCGTC
TCTGATCCTCCTCACCACACCGGCGGTGTAAGTCTCCTCCATCATCCAGTCCCCGTCGGG
GTACCTCCTCGTGGCGTTCTTACGGGCATCTCGCTGGCGTGGTTCGTGTGGCGCAGTT
15 CTGGATGAGCTCCATGTTCTCGGCCCCAAAGTGGGGCTGGCCAACGGCGTGGCCGGCGG
CTGGGGCAACCTCGGCGGCGGCGCGCTCCAGCTGCTCATGCCGCTCGTGTACGAGGCCAT
CCACAAGATCGGTAGCACGCCGTTACGGCGTGGCGCATCGCCTTCTTCATCCCGGGCCT
GATGCAGACGTTCTCGGCCATCGCCGTGCTGGCGTTCGGGCAGGACATGCCCGGCGGCAA
20 CTACGGGAAGCTCCACAAGACTGGCGACATGCACAAGGACAGCTTCGGCAACGTGCTGCG
CCACGCCCTCACCACCTACCGCGGCTGGATCCTGGCGCTCACCTACGGCTACAGCTTCGG
CGTCGAGCTCACCATCGACAACGTGCTGCACCAAGTACTTCTACGACCGCTTCGACGTC
CCTCCAGACCGCGGGGCTCATCGCCGCCAGCTTCGGGATGGCCAACATCATCTCCCGCCC
CGGCGGCGGGCTACTCTCCGACTGGCTCTCCAGCCGGTACGGCATGCGCGGCAGGCTGTG
GGGGCTGTGGACTGTGCAGACCATCGGCGGCGTCTCTGCGTGGTGTCTCGGAATCGTCA

CTTCTCCTTCGCCGCGTCCGTCGCCGTGATGGTGCTCTTCTCCTTCTTCGTCCAGGCCGCG
 GTGCGGGGCTCACCTTCGGCATCGTGCCGTTCTGTGTCGCGGAGGTGCTGGGGGCTCATCTC
 CGGGATGACCGGCGGCGGGGGCAACGTGGGCGCCGTGCTGACGCAGTACATCTTCTTCCA
 CGGCACAAAGTACAAGACGGAGACCGGGATCAAGTACATGGGGGCTCATGATCATCGCGTG
 5 CACGCTGCCCCGTATGCTCATCTACTTCCCGCAGTGGGGCGGCATGCTCGTAGGCCCGAG
 GAAGGGGGCCACGGCGGAGGAGTACTACAGCCGGGAGTGGTCGGATCACGAGCGCGAGAA
 GGGTTTCAACGCGGCCAGCGTGCGGTTTCGCGGAGAACAGCGTGCGCGAGGGCGGGAGGTC
 GTCGGCGAATGGCGGACAGCCCAGGCACACCGTCCCCGTGACGCGTCGCCGGCCGGGGT
 GTGA

10 SEQ ID No. 2 послідовність нуклеїнової кислоти OsNRT2.3a, номер доступу No: AK109776
 найдовший ORF

ATGGAGGCTAAGCCGGTG

GCGATGGAGGTGGAGGGGGTTCGAGGCGGCGGGGGGCAAGCCGCGGTTCAGGATGCCGGT
 G GACTCCGACCTCAAGGCGACGGAGTTCTGGCTCTTCTCCTTCGCGAGGCCACACATGGCC
 15 TCCTTCCACATGGCGTGTTCTCCTTCTTCTGCTGCTTCGTGTCCACGTTCCGCCGCGCCG
 CCGCTGCTGCCGCTCATCCGCGACACCCTCGGGCTCACGGCCACGGACATCGGCAACGCC
 GGGATCGCGTCCGTGTCGGGCGCCGTGTTTCGCGCGTCTGGCCATGGGCACGGCGTGCGAC
 CTGGTCGGGCCCAGGCTGGCCTCCGCGTCTCTGATCCTCCTCACCACACCGGCGGTGTAC
 TGCTCCTCCATCATCCAGTCCCCGTGCGGGTACCTCCTCGTGCGCTTCTTACGGGCATC
 20 TCGCTGGCGTCGTTCTGTGTCGGCGCAGTTCTGGATGAGCTCCATGTTCTCGGCCCCCAA
 GTGGGGCTGGCCAACGGCGTGGCCGGCGGCTGGGGCAACCTCGGCGGCGGCGCCGTCCAG
 CTGCTCATGCCGCTCGTGACGAGGCCATCCACAAGATCGGTAGCACGCCGTTTACGGCG
 TGGCGCATCGCCTTCTTATCCCGGGCCTGATGCAGACGTTCTCGGCCATCGCCGTGCTG
 GCGTTTCGGGCAGGACATGCCCGGCGGCAACTACGGGAAGCTCCACAAGACTGGCGACATG
 25 CACAAGGACAGCTTCGGCAACGTGCTGCGCCACGCCCTCACCACCTACCGCGGCTGGATC
 CTGGCGCTCACCTACGGCTACAGCTTCGGCGTCGAGCTCACCATCGACAACGTCGTGCAC
 CAGTACTTCTACGACCGCTTCGACGTCAACCTCCAGACCGCCGGGCTCATCGCCGCCAGC
 TTCGGGATGGCCAACATCATCTCCCGCCCCGGCGGGGCTACTCTCCGACTGGCTCTCC
 AGCCGGTACGGCATGCGCGGCAGGCTGTGGGGGCTGTGGACTGTGCAGACCATCGGCGGC
 30 GTCCTCTGCGTGGTGCTCGGAATCGTCGACTTCTCCTTCGCCGCGTCCGTCGCCGTGATG
 GTGCTCTTCTCCTTCTTCGTCCAGGCCGCGTGCGGGCTCACCTTCGGCATCGTGCCGTTT
 GTGTCGCGGAGGTCGCTGGGGCTCATCTCCGGGATGACCGGCGGCGGGGGCAACGTGGGC
 GCCGTGCTGACGCAGTACATCTTCTCCACGGCACAAAGTACAAGACGGAGACCGGGATC
 AAGTACATGGGGCTCATGATCATCGCGTGACGCTGCCCGTCATGCTCATCTACTTCCCG
 35 CAGTGGGGCGGCATGCTCGTAGGCCCGAGGAGGGGGCCACGGCGGAGGAGTACTACAGC
 CGGAGTGGTCGGATCACGAGCGCAGAGGGTTTCAACGCGGCCAGCGTGCGGTTTCGCG
 GAGAACAGCGTGCGCGAGGGCGGGAGGTGCTCGGCGAATGGCGGACAGCCCAGGCACACC
 GTCCCCGTGACGCGTCGCCGGCCGGGGTGTGA

SEQ ID No. 3 OsNRT2.3b амінокислотна послідовність (найдовший ORF)

40 MEAKPVAMEVEGVAAAGGKPRFRMPVDSLDKATEFWLFSFARPHMASFHMAWFSFFCCFV
 STFAVFARLAMGTACDLVGPRLASASLILLTPAVYCSSIQSPSGYLLVRFFTGISLAS
 FVSAQFWMSSMFSAPKVGLANGVAGGWGNLGGGAVQLLMPLVYEAHKGISTPFTAWRIA
 FFIPGLMQTFSAIAVLAFGQDMPGGNYGKLHKTGDMHKDSFGNVLRHALTNYRGWILALT
 YGYSFGVELTIDNWHQYFYDRFDLQTAGLIAASFGMANIISRPGGGLSDWLSSRYG
 45 MRGRLWGLWTVQTIGGVLCWLGVDFSAASVAVMVLFSSFFVQAACGLTFGIVPFVSRR
 SLGLISGMTGGGGNVGAVLTQYIFFHGTGYKTETGIKYMGLMIIACTLPVMLIYFPQWGG
 MLVGPRKGATAEEYYSREWSHEREKGFNAASVRFAENSVREGGRSSANGGQPRHTVPVD
 ASPAGV

SEQ ID No. 4 OsNRT2.3a амінокислотна послідовність

50 MEAKPVAMEVEGVAAAGGKPRFRMPVDSLDKATEFWLFSFARPHMASFHMAWFSFFCCFV
 STFAAPLLPLIRDTLGLTATDIGNAGIASVSGAVFARLAMGTACDLVGPRLASASLILL
 TTPAVYCSSIQSPSGYLLVRFFTGISLASFVSAQFWMSSMFSAPKVGLANGVAGGWGNL
 GGGAVQLLMPLVYEAHKGISTPFTAWRIAFFIPGLMQTFSAIAVLAFGQDMPGGNYGKL
 HKTGDMHKDSFGNVLRHALTNYRGWILALTYGYSFGVELTIDNWHQYFYDRFD LQTA
 55 GLIAASFGMANIISRPGGGLSDWLSSRYGMRGRLWGLWTVQTIGGVLCWLGVDFSA
 ASVAVMVLFSSFFVQAACGLTFGIVPFVSRRSLGLISGMTGGGGNVGAVLTQYIFFHGTGY
 KTETGIKYMGLMIIACTLPVMLIYFPQWGGMLVGPRKGATAEEYYSREWSHEREKGFNA
 ASVRFAENSVREGGRSSANGGQPRHTVPVDASPAGV

SEQ ID No. 5 послідовність промотора флоєми

61 CAAATGTGCA ATGCTGATTA GAGTTTGCAG ATGCTGTTTG GTTTAGTTTA
 GATGTGGCATTGTTGTTAGTG GTTCTTTTGA TGAAAAATTC TTGGCTATGA TAAAGTTTGC
 TTTCTGAATATATGAATAGT GGCCATGGTT CAAGAACTC CAGTTAGGTG GGATAATTTA
 TGGTGATTCTGGGCGCAATT CGGGGAAATT TTTTTTGGCG AGAATCTTAT CATTGAGATA
 AAGAGGGCAAGAATATCAAC AGACTTTTAA TCTTAATAAA AAGCACTCTT AGCGTAAGAG
 CAAAGCATTGCAATCTCGTG TGACAAGAAC GTTCTTTTTT CTCCATCTTT TTCTTTTTTA
 CCAAAAAATGAGTGTTGCCA ACTGCTGCAC CTTCTTAGGC CGGTTTGTTT TTGTTTGGAA
 CGCACGGAATGCCCCGATGCA AAAAAAAAAA AGAAATGCTG TTAACAAATC ACTGTCCTGA
 CACGGCTAATTAGGTGGTAA TTTGGTGCAT CTGCAAAGAA GCAACAGATG CTTTCTTTCA
 CTGAAAGCATATTTGCATGA TTTCTTGTTT CTGCTTGTC TCTCTCTGAT GCTGACTGTA
 TTCCACTCTGCGCTGTAATG CCATGTTAGT GATTAATATG TTCAAAAGAG CATAAAAGAA
 TTGCCAATTGGATGTTAGAG ATTACTGTGT GTTCAAAAAG AGCATAAAAAG AATTACCAAT
 TTGATGGTAGATGTTACTAG CACCACCTTG GTGTTTCCCC ATGGTTTTCT GCAATCTGTC
 CCATGATCTTTCTGCTTTTC TGAAAGACCT ATGTTTCAGA GGTCAAGCTT CTGGAAGGTT
 ATTAGGAGGGATGAGTCGTC ATTTTGTCTG TGGGCCCCAC TAGTCAGTGT CAATAGTTGT
 AAAGGTTAGAAATTTTCTTG CTGTTTTTCT TGGAACAAT TTCATTGCGC CTGATCTGAT
 GGTGCTGCTGGTAATCAAAT CACCAGATCC TGAAATCCAC CAAATCAAAC CGTGAGATTT
 TTGCAGAGGCAAAACAAGAA AAGCATCTGC TTTATTTCTC TCTTGCTTTC TTTTCATCCC
 CAACCAGTCCTTTTTTCTTC TGTTTATTTG TAGAAGTCTA CCACCTGCAG TCTATTATTC
 TACAGAGAAAAAGATTGAAG CTTTTTTTCT CCAAAGCTGA CAATGGTGCC GGCATATGCT
 AATAGGATACTCCCTTCGTC TAGGAAAAAA CCAACCCACT ACAATTTTGA ATATATATTT
 ATTCAGATTTGTTATGCTTC CTACTCCTTC TCAGGTATGG TGAGATATTT CATAGTATAA
 TGAATTTGGACATATATTTG TCCAAATTCA TCGCATTATG AAATGTCTCG TTCGATCTAT
 GTTGTTATATTATAGACGGA GATAGTAGAT TCGGTTATTT TTGGACAGAG AAAGTACTCG
 CCTGTGCTAGTGACATGATT AGTGACACCA TCAGATTAAA AAAACATATG TTTTGATTAA
 AAAAATGGGGAATTTGGGGG GAGCAATAAT TTGGGGTTAT CCATTGCTGT TTCATCATGT
 CAGCTGAAAGGCCCTACCAC TAAACCAATA TCTGTACTAT TCTACCACCT ATCAGAAATC
 AGAGCACTGGGGTTTTTGCAA CTATTTATTG GTCCTTCTGG ATCTCGGAGA AACCTCCAT
 TCGTTTGCTCTTAATTAATAA GGGCAATTCT GCAGATATCC ATCACACTGG CGGCCGCTCG
 AGCATGCATCTAGAGGCCCA ATTGCCCCA

SEQ ID No. 6 послідовність нуклеїнової кислоти Id No. GRMZM2G455124* кукурудзи звичайної

5 ATGGCGGAGGGGGAGTTCAAGCCCGCGGCGATGCAGGTGGAGGCTCCTGCCGAGGCGGC
 G GCGGCGCCGTCCAAGCCGCGGTTCAAGGATGCCCGTGCAGTCCGACAACAAGGCCACCGAG
 TTCTGGCTCTTCTCCTTCGCGAGGCGCACATGAGCGCCTTCCACATGTCGTGGTTCTCC
 TTCTTCTGCTGCTTCTCTCCACCTTCGCGGCGCGCCGCTGCTCCCGCTCATCCGGGAC
 ACGCTGGGGCTCACGGCCACGGACATCGGCAACGCCGGGATCGCCTCCGTGTCCGGCGCG
 10 GTCTTCGCGCGCGTGCCATGGGCACGGCGTGCGACCTGGTGGGCCCCGCGCCTGGCGTCC
 GCGGCCATACATACTCCTCACCACGCCCGCGCTCTACTACTCCGCCGTCACTCGACTCCGCC
 TCGTCTACCTGCTGCTGCTGCTTCTTCAAGGCTTCTCGCTCGCGTCTTCTGTTCCACG
 CAGTTCTGGATGAGCTCCATGTTCTCGCCGCCAAGGTGGGGCTGGCCAACGCGCTCGCC
 GGGGGGTGGGGCAACCTCGGCGGCGGCGCCGTGCAGCTCATCATGCCGCTCGTGTTCGAG
 15 GCCATCCGCAAGGCCGGGGCCACGCCGTTACAGGCGTGGCGCGTCCGCTTCTTCGTCCCG
 GGCTGCTGCAGACGCTGTCGGCCGTGCGCGTGTGGCGTTCGGCCAGGACATGCCCGAC
 GGCAACTACCGCAAGCTGCACAGGTCCGGCGACATGCACAAGGACAGCTTCGGCAACGTG
 CTCCGCCACGCCGTACCAACTACCGCGCCTGGATCCTGGCGCTCACCTACGGATACTGC
 TTCGGCGTGGAGCTCGCCGTGGACAACATCGTCGCGCAGTACTTCTACGACCGCTTCGGC
 20 GTCAAGCTCAGCACCGCCGGCTTCATCGCCGCCAGCTTCGGGATGGCCAACATCGTCTCC
 CGCCCCGGCGGGCGGCCCTCTGTGCGACTGGCTCTCCAGCCGCTTCGGCATGCGCGGCAGG
 CTGTGGGGCCTGTGGGTGGTGCAGACCATCGGGGGCGTCTCTGCGTCTGTGCTCGGCGCC
 GTCGACTACTCCTTCGCCGCGTCCGTGGCCGTATGATACTCTTCTCCATGTTCTGTGAG
 GCGGCCTGCGGGCTCACCTTTGGCATCGTCCCGTTCGTCTCCCGAAGGTGCTGGGGCTC
 25 ATCTCCGGCATGACCGGCGGCGGCGGCAACGTGGGCGCGCTGCTCACGCAGCTCATCTTC
 TTCCACGGATCCAAGTACAAGACGGAGACGGGGATCAAGTACATGGGGTTCATGATCATC
 GCCTGCACGTTGCCCATCACGCTCATCTACTTCCCGCAGTGGGGCGGCATGTTCTTGGGG
 CCGCGGCCCGGGGCGACGGCGGAGGACTACTACAACCGGGAGTGGACAGCGCACGAGTGC
 GACAAGGGTTTCAACACCGCGAGCGTACGCTTTGCGGAGAACAGCGTGCGGGAAGGGGGA
 30 CGCTCGGGCAGCCAGTCCAAGCACACTACTGTGCCCGTGCAGTCTCTCGCCGGCCGACGTG TGA

SEQ ID No. 7 амінокислотна послідовність Id No. GRMZM2G455124* кукурудзи звичайної
 MAEGEFKPAAMQVEAPAEAAAAPSKPRFRMPVDSNDKATEFWLFSFARPHMSAFHMSWFSFFC
 CFLSTFA

APLLPLIRDTLGLTATDIGNAGIASVSGAVFARVAMGTACDLVGPRLASAAIILLTPAVYYSAVIDSA
 SSYLLVRFFTGFSLASFVSTQFWMSSMFSPPKVGLANGVAGGWGNLGGGAVQLIMPLVFEAIRKAG
 ATPF
 TAWRVAFFVPGLLQTL SAVAVLAFGQDMPDGNRYKLHRS GDMHKDSFGNVL RHAVTNYRAWILALT
 5 YGYC
 FGVELAVDNIVAQYFYDRFGVKLSTAGFIAASF GMANIVSRPGGGLLSDWLSSRF GMRGRLWGLWW
 QTG
 GVLCLWLGAVDYSFAASVAVMILFSMFVQAACGLTFGIVPFVSRRSLGLISGMTGGGGNVGAVLTQLIF
 F
 10 HGSKYKTETGIKYMGMFI IACTLPITLIYFPQWGGMFLGPRPGATAEDYYNREWTAHECDKGFNTASV
 RF AENSVREGGRSGSQSKHTTVPVESSPADV

SEQ ID No. 8 послідовність нуклеїнової кислоти Id No. Glyma13g39850 coï

TCACACTTTCTTCCTTAATTTCTAGCTCTTGCTACGTACTTGAATTCAATTAGTTATTA
 ATGGCTGAGATTGAGGGTTCTCCCGGAAGCTCCATGCATGGAGTAACAGGAAGAGAACAA
 15 ACATTTGTAGCCTCAGTTGCTTCTCCAATTGTCCCTACAGACACCACAGCCAAATTTGCT
 CTCCCAGTGGATT CAGAACAAGGCCAAGTTTTCAAACCTCTTCTCCCTGGCCAATCCC
 CACATGAGAACCTTCCACCTTTCTTGGATCTCCTTCTTACCTGCTTCGTCTCGACATTC
 GCAGCAGCACCTCTTGTGCCCATCATCCGCGACAACCTTAACCTCACC AAAAGCGACATT
 GGAAACGCCGGGGTTGCTTCTGTCTCCGGAAGCATCTTCTCAAGGCTCGCAATGGGTGCA
 20 GTCTGTGACATGTTGGGTCCACGCTATGGCTGCGCCTTCTCATCATGCTTTCGGCCCCCT
 ACGGTGTTCTGCATGTCCTTTGTGAAAGATGCTGCGGGGTACATAGCGGTTCTGGTTCTTG
 ATGGGTCTCGTTGGCGACGTTTGTGTCGTGCCAGTACTGGATGAGCACGATGTTCAAC
 AGTAAGATTATAGGGCTTGCGAATGGGACTGCTGCGGGGTGGGGGAACATGGGTGGTGA
 GCCACTCAGCTCATAATGCCTTTGGTGTATGAGCTTATCAGAAGAGCTGGGGCTACTCCC
 25 TTCACTGCTTGGAGGATTGCCTTCTTTGTTCCGGGTTTTCATGCATGTCATCATGGGGATT
 CTTGTCTCACTCTAGGCCAGGACTTGCCTGATGGAAACCTCGGGGCCTTGCGGAAGAAG
 GGTGATGTAGCTAAAGACAAGTTTTCCAAGGTGCTATGGTATGCCATAACAAATTACAGG
 ACATGGATTTTTGCTCTCCTCTATGGGTACTCCATGGGAGTTGAATTAACA ACTGACAAT
 GTCATTGCTGAGTATTTCTATGACAGATTTAATCTCAAGCTACACACTGCTGGAATCATT
 30 GCTGCTTCATTTGGAATGGCAAACCTTAGTTGCTCGACCTTTTGGTGGATATGCTTCAGAT
 GTTGCAGCCAGGCTGTTTGGCATGAGGGGAAGACTCTGGACCCTTTGGATCCTCCAAACC
 TTAGGAGGGGTTTTCTGTATTTGGCTTGGCCGTGCCAATTCTCTTCTATTGCTGTATTG
 GCCATGATCCTGTTCTCTATAGGAGCTCAAGCTGCATGTGGTGCAACTTTTGGCATCATT
 CCTTTTCATCTCAAGAAGGTCTTTGGGGATCATATCAGGTCTAACTGGTGCAGGTGGAAC
 35 TTTGGGTCTGGCCTCACCCAATTGGTCTTCTTTTCAACCTCCAAATTCTCTACTGCCACA
 GGTCTCTCCTTGATGGGTGTAATGATAGTGGCTTGCACTCTACCA GTGAGTGTGTTGTTAC
 TTCCCACAGTGGGGTAGCATGTTTCTACCACCCTCAAAAGATGTCAGCAAATCCACTGAA
 GAATTCTATTACACCTCTGAATGGAATGAGGAAGAGAAGCAGAAGGGTTTTGCACCAGCAA
 AGTCTCAAATTTGCTGAGAATAGCCGATCTGAGAGAGGAAAGCGAGTGGCTTCAGCACCA
 40 ACACCTCCAAATGCAACTCCCACTCATGTCTAGCCATAGCACTTCAATCAAAGAAGATCA
 TGAAACATAATTACTGAGCAGTATTGGGAATGAAGAACCATGAGTTGAAGAATTTTCTAA
 TAAGAAATCTTGTAACATGTAGACATAGAATGTTCTGGTTCTGGTTTGGTGTGGTGTAA
 GAGTTGTCTACTTGTGGTAAGTCATAAGTATCATAATCAGTATGTCAATGCAGATCTTGA
 TGCTGAGTATCAATAGTATCAAAAAAAAAA

SEQ ID No. 9 амінокислотна послідовність Id No. Glyma13g39850 coï

MAEIEGSPGSSMHGVTGREQTFVASVASPIVPTDTAKFALPVDSEHKAKVFKLFLSLANPHMRTF
 HLSWI
 SFFTFCVSTFAAAPLVPIIRDNLNLTKSDIGNAGVASVSGSIFSR LAMGAVCDMLGPRYGCAFLIMLSA
 P
 50 TVFCMSFVKDAAGYIAVRFLIGFSLATFVSCQYWMSTMFNSKIIGLANGTAAGWGNMGGGATQLIMP
 LVY
 ELIRRAGATPFTAWRIAFFVPGFMHVIMGILVLT LGQDLPDGNL GALRKKGDVAKDKFSKVLWYAITNY
 R
 TWIFALLYGYSMGVELTTDNVIAEYFYDRFNKLHTAGIIAASF GMANLVARPFGGYASDVAARLFGM
 55 RG
 RLWTLWILQTLGGVFCIWLGRANSLPIAVLAMILFSIGAQAACGATFGIIPFISRRSLGIISGLTGAGGN
 FGSGLTQLVFFSTSKFSTATGLSLMGVMIVACTLPVSWHFPQWGS MFLPPSKDVSKEEFYYTSEW
 NE EEKQKGLHQQLKFAENSRSEGRKRVASAPTPPNATPTHV

SEQ ID No. 10 послідовність нуклеїнової кислоти Id No. Glyma12g30050 coï

atggctgaga ttgaggggttc tcctggaagc tccatgcatg gagtaacagg aagagaacaa
acattcgtag cctcaattgc ttctccaatt gtccccacag acaccacagc caaatttgct
ctcccagtag actcagagca caaggccaag attttcaaac tcttctccat ggccaatccc
cacatgagaa ccttccacct ttcttgatc tccttcttca cctgcttcgt ctgcaccttc
gcagcagccc ctcttgctcc catcatccgc gacaacctta acctcaccaa aagcgacatt
ggaaacgccg ggggttgcttc tgtctccgga agcatcttct ctaggcttgc aatgggtgcg
gtctgtgacc tattaggtcc acgttatggc tgtgccttcc tcatcatgct ctcgcccca
accgtgttct gcatgtcctt tgtgaaagat gctgcggggt acataatggt tcggttcttg
atagggttct ccttggaac gttcgtgtca tgccagtact ggatgagcac gatgttcaac
agtaagatta tagggcttgc gaatggaact gctgcggggt gggggaacat ggggtggtgga
gccactcagc tcataatgcc tttggtgtat gagcttatca gaagagctgg ggctactccc
ttcactgctt ggaggatagc cttctttgta ccgggtttca tgcattgcat catggggatc
cttgtcctaa ctctaggcca ggacttgctt gatggaaacc ttgcggcctt gcagaagaag
ggtgatgtag caaaagacaa gttttccaag gtgctatggt atgccataac aaattacagg
acatggattt ttgcctcct ctatgggtac tcaatgggag ttgaattgac aactgacaat
gtcattgctg agtatttcta tgacaggttt aatctgaagc tgcacactgc tggaaatcatt
gctgcttcat ttggaatggc aaacttagtt gctcgacct ttggtggata tgcttctgat
gttgagacca gattgtttgg catgagggga agactctgga ccttttgat cctccaaaca
ttaggagggg ttttctgtat ttggttggc cgagccaatt ctcttctat tgctattttg
gctatgatcc tggtctcttt aggagctcaa gctgcatgtg gtgcaacttt tggcatcatt
cccttcatct caagaaggtc attggggatc atatcaggtc tcaactggtc aggtgggaac
tttgggtctg gcctcaccca attggtcttc tttcaacat ccaaattctc cactgccaca
ggtctctcct tgatgggtgt gatgatagtg gcttgactc ttctgtgag tgtgttcat
ttccacagt gggtagcat gttcctacca ccatcaaaag atgtcaacaa atccactgaa
gaattctatt acacctctga atggaatgag gaagagaggc agaaaggctt gcatcagcaa
agtctcaagt ttgctgagaa tagccgatcc gagagaggaa agcgagtggc ttagcacca acacctccga
atgcaactcc cactcatgtc

SEQ ID No. 11 амінокислотна послідовність Id No. Glyma12g30050 co1

MAEIEGSPGS SMHGVGTREQ TFVASIASPI VPTDITAKFA LPVDSEHKAK IFKLFSMANP
HMRTFHLWI SFTTCFVSTF AAAPLVPIIR DNLNLTKSDI GNAGVASVSG SIFSLAMGA
VCDLLGPRYG CAFLIMLSAP TVFCMSFVKD AAGYIMVRFL IGFSLATFVS CQYWMSTMFN
SKIIGLANGT AAGWGNMGGG ATQLIMPLVY ELIRRAGATP FTAWRIAFFV PGFMHVIMGI
LVLTGLQDLP DGNLAALQKK GDVAKDKFSK VLWYAITNYR TWIFALLYGY SMGVELTTDN
VIAEYFYDRF NLKLHTAGII AASFGMANLV ARPFGGYASD VAARLFGMRG RLWTLWILQT
LGGVFCIWL RANSLPIAIL AMILFSLGAQ AACGATFGII PFISRRSLGI ISGLTGAGGN
FGSGLTQLVF FSTSKFSTAT GLSLMGVMIV ACTLPVSVVH FPQWGSMLFP PSKDVNKSTE
EFTYTSEWNE EERQKGLHQQ SLKFAENSRS ERGKRVASAP TPPNATPTHV

5

SEQ ID No. 12 послідовність нуклеїнової кислоти Id No. MLOC_75087.1 ячменю звичайного

CCACGCGTCCGCTCATTGCATACGAGGTGCCAACACTACACAGGTGTAGCAGCAGCCAA
GGCAGCTGGTGAGATGGAGGGGGAGTCCAAGCCGGCGATGGGGGTGCAGGCGGCGCC
CAAGGGCAAGTTACAGGATACCGGTGGACTCGGACAACAAGGCCACCGAGTTCTGGCTTTT
CTCGTTCTGAGGCCGCACATGAGCGCCTTCCACCTCTCGTGGTTCTCCTTCTTCTGCTG
CTTCGTCTCCACCTTCGCCGCGCCGCCCTCCTGCCGCTCATCCGGGACAACCTCGGCCT
CACGGGCAAGGACATCGGCAACGCCGGCATCGCGTCCGTGTCCGGCGCCGTGTTCCGCGC
TCTCGCCATGGGCACGGCCTGCGACCTGGTGGGCCCCGCCTGGCGTCCGCGGCCATCAT
ACTGCTCACCACCCCGCGGTGTACTGCTCGCCATCATCGAGTCCGCCTCGTCTTCTCT
GCTCGTGCGCTTCTTACAGGGCTTCTCGCTCGCCTCCTTCTGTGCGACGCAGTTCTGGAT
GAGCTCCATGTTCTTCTCGCCCAAGGTGGGGCTGGCCAATGGCGTCCGCGGCGGCTGGGG
CAACCTGGGCGGGGGCGCCGTGCAGCTCCTCATGCCGCTCGTGTTCCAGAGCCGTCCGCAA
GATCGGCAGCACGGATTTTCATCGCGTGGCGCGTCCGCTTCTTATCCCGGGCGTCATGCA
GACGTTCTCGGCCATCGCCGTGCTGGCGTTCGGGCAGGACATGCCGGACGGCAACTACCG
TAAGCTGCACAAGAGCGGGGAGATGCACAAGGACAGCTTCGGCAACGTGCTGCGCCACGC
GGTCACGAACCTACCGCGCCTGGATCCTGGCGCTCACCTACGGCTACTCCTTCGGCGTGGA
GCTCGCCGTGGACAACATCGTCGCGCAGTACTTCTACGACCGCTTCGACGTCAACCTCCA
CACGGCCGGGCTCATCGCCGCCAGCTTCGGGATGGCCAACATCATCTCCCGCCCGGGCGG
CGGGCTCATGTCCGACTGGCTCTCCGACCGGTTCCGGCATGCGCGGCAGGCTGTGGGGGCT
GTGGGTCTGTGAGACCATCGGCGGCATCCTCTGCATCGTGTGCTCGGCATCGTGCAGTACTC
GTTCCGGCGGTGGTGGCCGTGATCCTCTTCTCCTTCTTCTGTGAGGCGGCGTGCGG

10

15

20

25

GCTCACGTTTCGGCATCGTGCCGTTTCGTGTGCGGGAGGTCGCTGGGGCTCATCTCCGGAAT
 GACCGGCGGCGGCGGCAACGTGGGGGCGCTGCTGACGCAGGTCATCTTCTTCCGCGGCAC
 CAAGTACAAGACGGAGACGGGGATCATGTACATGGGGCTGATGATCCTGGCATGCACGCT
 5 GCCATCACGCTCATCTACTTCCCAGAGTGGGGCGGCATGTTCTGTCGGGGCCGCGGAAAGG
 GGCGACGGCGGAGGAGTACTACAGCAAGGAGTGGACCGAGGAGGAGCGTGCCAAGGGGTA
 CAGCGCCGCGACCGAGCGTTTCGCGGAGAACAGCGTGCGCGAGGGCGGGCGGAGGGCGGC
 GTCGGGCAGCCAGTCAAGGCACACCGTCCCCGTGACGGCTCGCCGGCCGACGTGTGAGG
 TCCGAAGAGCTCCCCGTACTACGTGGTCCACGGGTGCAATGGGGGAATACGATCGCGTCG
 CACGGCCGCCCCGGGTTTGGGCCGTCTTCCGTGCACATACGTAGTACTACGAACGCACGCA
 10 CGCACGCCGGCTTTGTGCTGCTTCTAGTACTGTACGTACGTTTGGGTTTGGTGTGCTCGC
 TTACCTTAATACTGCTCCGCATGTTGATGTTTATATGCTCCCTTGTGAAATACAGTTTTA
 AAAAAAAAAAAAAA
 SEQ ID No. 13 амінокислотна послідовність Id No. MLOC_75087.1 ячменю звичайного
 MEGESKPAAMGVQAAPKGFRIPVSDNKATEFWLFSFVRPHMSAFHLSWFSFFCCFVSTFAAP
 15 PLLPLI
 RDNLGLTGKDIGNAGIASVSGAVFARLAMGTACDLVGPRLASAAIILLTPAVYCSAIIESASSFLLVRF
 FTGFSLASFVSTQFWMSSMFSSPKVGLANGVAGGWGNLGGGAVQLLMPLVFEAVRKIGSTDFIAWR
 VAFF
 IPGVMQTFSAIAVLAFGQDMPDGNRYRKLHKSGEMHKDSFGNVLRHAVTNYRAWILALTYGYSFGVEL
 20 AVD NIVAQYFYDRFD
 LHTAGLIAASFMANIISRPGGGLMSDWLSDRFGMRGRLWGLWWQTIGGILCIVL
 GIVDYSFGASVAVMILFSFFVQAACGLTFGIVPFVSRRLGLISGMTGGGGNVGAVLTQVIFFRGTYK
 T
 ETGIMYMGLMILACTLPITLIYFPQWGGMFVGPRLGATAEEYYSKEWTEEERAKGYSAATERFAENS
 25 VRE GGRRAASGSQSRHTVPVDGSPADV
 SEQ ID No. 14 послідовність нуклеїнової кислоти Id No. Bradi2g47640 *Brachypodium*
distachyon
 ATGGGGGGGGAGTCGAAGCCGGCGGCGATGGATGTGGAGGCGCCGTCCAAGGCCA
 AGTTTCAGGATCCCCGTGGACTCCGACAACAAGGCGACGGAGTTCTGGCTCTTCTCC
 30 TTCGCGCGGCGGCACATGAGCGCGTTCCACCTGTGCTGGTTCTCCTTCTTCTGCTGC
 TTCGTGTCCACCTTCGCGGCGCCGCGCGCTGCTGCCGCTCATCCGGGACAATCTGGGG
 CTCACGGCCAAGGACATCGGCAACGCCGGGATCGCGTCGGTGTGCGGGCGCCGTGTT
 CGCGCGTCTCGCCATGGGCACGGCCTGCGACCTGGTCGGCCCCCGCCTGGCGTCCG
 CGGCCATCATACTGCTCACCACCCCGCGGTGTACTGCTCGGCCATCATCGACTCG
 35 GCGTGTGCTTCTGCTGCTGCTGCGCTTCTTACGGGCTTCTCCCTGGCCTCCTTCTGCT
 CCACGCGAGTTCTGGATGAGCTCCATGTTCTCCTCGCCCAAGGTGGGTCTGGCCAAC
 GGCCTGGCCGGGGGCTGGGGCAACCTCGCGGGCGCGCCGTGCAGCTGATCATGC
 CGCTGGTGTTCGAGGTCGTGCGCAAGATCGGGAGCACGCGGTTACAGGCGTGGCGC
 GTGGCCTTCTTCATCCCGGGCGTCATGCAGACGTTCTCGGCCATCGCCGTGCTGGCG
 40 TTCGGGCAGGACATGCCGGACGGCAACTACCACAAGCTGCACAAGACCGGGGAGA
 TGCACAGGGACAGCTTCCGCAACGTGCTGCGCCACGCGGTACCAACTACCGCGCC
 TGGATCCTGGCGCTCACCTACGGCTACTGCTTCGGCGTGGAGCTCGCCGTGGACAA
 CATCGTGGCGCAGTACTTCTACGACCGCTTCGGCGTCAACCTCCACACGGCGGGGC
 TCATCGCCGCCAGCTTCGGGATGGCCAACATCGTCTCGCGCCCGGGCGGCGGGGCTC
 45 ATGTCCGACTGGCTCTCGGCCCGGTTCCGGCATGCGCGGCAGGCTGTGGGGCCTGTG
 GGTGCTGCAGACCATCGGCGGCGTCTCTGCGTGGTGTGCTCGGCGTGGTGGACTACT
 CCTTCGGCGCGTCCGTGGCAGTCATGATACTCTTCTCCCTGTTCTGTCAGGCCGCGT
 GCGGGCTCACCTTCGGCATCGTGCCGTTCTGTGTCGCGGAGGTCGCTGGGGCTCATCT
 CTGGCATGACCGGCGGCGGGGGAATGTGGGCGCCGTGCTGACGCAGGTCATCTTC
 50 TTCCACGGGTCCAGGTACAAGACGGAGACGGGGATCATGTACATGGGGGTGATGAT
 CATCGCGTGCACGCTGCCCATCACGCTCATCTACTTCCCAGAGTGGGGCGGCATGTT
 CACCGGGCCGCGGCGGGGGGCCACGGCGGAGGAGTATTACAGCTCGGAGTGGACC
 GAGGAGGAGCGGAAGAAAGGTACAACGCCGCGACAGAGCGTTTCGCGGAGAAC
 AGCCTGCGCGAGGGAGGGCGGAGGGCCGCGTGGGCGAGCCAGTCCAAGCATACCG
 55 TCCCCGTGGACGGATCACCGCCGGCCGACGTGTGAAGAAAATCCCATAGACCATAG
 TGTACGTTTCGTATGTCTCGCGTCTATAACGAGTCATACGGTCGCCACGGTCGCCCG
 GTCTTGTTGCTGTAAAAGGTTGTCAAATACTCCACTTTTCTTTTCCGCAGACGTGAA
 ATACTTCTGTAGGTGTACGTCACTGAAAGGAAACTGTTTCATATGGCATCCACATAC
 AAAACCATGTTTTCTTATATTGCTAGTATATTCGTTTTTCTTATTTTCAGGAAACTAG
 60 CATTCCGCGTCTATTATTATTCGTAAGATACTTCCGATCGAAAA

SEQ ID No. 15 амінокислотна послідовність Id No. Bradi2g47640 *Brachypodium distachyon*
 MGGESKPAAMDVEAPSKAKFRIPVDSNDKATEFWLFSFARPHMSAFHLSWFSSFFCCFV
 STFAAPLLPLIRDNLGLTAKDIGNAGIASVSGAVFARLAMGTACDLVGPRLASAAIILL
 TTPAVYCSAIDSASSFLLVRFFTGFSLASFVSTQFWMSSMFSSPKVGLANGVAGGWGN
 5 LGGGAVQLIMPLVFEVVRKIGSTRFTAWRVAFIPGVMQTFSAIVLAFGQDMPDGN
 HKLHKTGEMHRDSFRNVLRAVNTYRAWILALTYGYCFGVELAVDNIVAQYFYDRFG
 VNLHTAGLIAASFMANIVSRPGGLMSDWLSARFGMRGRLWGLWVVTIGGVLCV
 VLGVDYSGASVAVMILFSLFVQAACGLTFGIVPFVSRSLGLISGMTGGGGNVGAVL
 TQVIFFHGSRYKTETGIMYMGVMIIACTLPITLIYFPQWGGMFTGPRPGATAEEYSSSE
 10 WTEERKKGYNAATERFAENSLREGGRRAASGSQSKHTVPVDGSPPADV

SEQ ID No. 67 послідовність нуклеїнової кислоти OsNRT2.3b, номер доступу No: AK072215
 підкреслений характер є найдовшим ORF

GAGCGCCGGCCTCCACCGGTGCGCTAAGATCACGCCCGAAATCTTTATTCATTTTCTCT
 CCACCGGTTGCCCTCTCGCCGACCCAACCATCGCGCCACGCCGCGCGCTGCCGGAG
 15 CCGCGCTTTCCGCTATGCTATAAGAGCTGACGCGCAGGGCACAGCGGATGTACGTACACA
 CAGTCACTAGCTAAGCTGCTAGCCTTGCTACCACGTGTTGGAGATGGAGGCTAAGCCGGT
 GGCGATGGAGGTGGAGGGGGTTCGAGGCGGCGGGGGGCAAGCCGCGGTTTCAGGATGCCGGT
 GGACTCCGACCTCAAGGCGACGGAGTTCTGGCTCTTCTCCTTCGCGAGGCCACACATGGC
 CTCCTTCCACATGGCGTGGTTCTCCTTCTTCTGCTGCTTCGTGTCCACGTTCCGCCGTGT
 20 CGCGCGTCTGGCCATGGGCACGGCGTGCACCTGGTCGGGCCAGGCTGGCCTCCGCGTC
 TCTGATCCTCCTCACCACACCGGCGGTGTACTGCTCCTCCATCATCCAGTCCCCGTCCGG
 GTACCTCCTCGTGCGCTTCTTACGGGCATCTCGCTGGCGTCGTTCTGTGTCGGCGCAGTT
 CTGGATGAGCTCCATGTTCTCGGCCCCCAAGTGGGGCTGGCCAACGGCGTGGCCGGCGG
 CTGGGGCAACCTCGGCGGCGGCGCGGTCCAGCTGCTCATGCCGCTCGTGTACGAGGCCAT
 25 CCACAAGATCGGTAGCACGCCGTTACGGCGTGGCGCATCGCCTTCTTCATCCCGGGCCT
 GATGCAGACGTTCTCGGCCATCGCCGTGCTGGCGTTTCGGGCAGGACATGCCCGGCGGCAA
 CTACGGGAAGCTCCACAAGACTGGCGACATGCACAAGGACAGCTTCGGCAACGTGCTGCG
 CCACGCCCTCACCAACTACCGCGGCTGGATCCTGGCGCTCACCTACGGCTACAGCTTCGG
 CGTCGAGCTCACCATCGACAACGTGCTGCACCACTACTTCTACGACCGCTTCGACGTCAA
 30 CCTCCAGACCGCCGGGCTCATCGCCGCCAGCTTCGGGATGGCCAACATCATCTCCCGCCC
 CGGCGGCGGGCTACTCTCCGACTGGCTCTCAGCCGGTACGGCATGCGCGGCAGGCTGTG
 GGGGCTGTGGACTGTGCAGACCATCGGCGGCGTCTCTGCGTGGTGTCTCGGAATCGTCA
 CTTCTCCTTCGCCGCGTCCGTGCGCGTGATGGTGCTCTTCTCCTTCTTCGTCCAGGCCGC
 GTGCGGGCTCACCTTCGGCATCGTGCCGTTCTGTGCGGAGGTGCTGGGGCTCATCTC
 35 CGGGATACCGGCGGCGGGGCAACGTGGGCGCCGTGCTGACGCAGTACATCTTCTTCCA
 CGGCACAAAGTACAAGACGGAGACCGGGATCAAGTACATGGGGCTCATGATCATCGCGTG
 CACGCTGCCGTCATGCTCATCTACTTCCCGCAGTGGGGCGGCATGCTCGTAGGCCCGAG
 GAAGGGGGCCACGGCGGAGGAGTACTACAGCCGGGAGTGGTCGGATCACGAGCGCGAGAA
 GGGTTTCAACGCGGCCAGCGTGCGGTTTCGCGGAGAACAGCGTGCGCGAGGGCGGGAGGT
 40 GTCGGCGAATGGCGGACAGCCAGGCACACCGTCCCCGTGACGCGTGCAGCGGCCGGGT
 GTGAAGAATGCCACGGACAATAAGGTGCGGTTGTAGTACAAGTGTACAAATTGATGGTA
 CGTGTCGTTTGACCGCGCGCGCGCACAGTGTGGGTGCTGGCCTCGTGGGCTTAGTGAGT
 ACAGTGAGGGGTGTACGTGTGTCGTGGCGCGCGCGGTACCTCGGTGGCCTTGGGATTGG
 GGGGGCACTATACGCTAGTACTCCAGATATATACGGGTTTGATTTACTTCTGTGGATCGG
 45 CGCTTGTTGGTGGTTTGTCTCCCTGTGGTTTTGTGATGGTAATCATACTCATACTCAAAC
 AGTCAAAACTTTTTGATGCG

SEQ ID No. 68 послідовність нуклеїнової кислоти OsNRT2.3a, номер доступу No: AK109776
 підкреслений характер є найдовшим ORF

AGTCACTAGCTAAGCTGCTAGCCTTGCTACCACGTGTTGGAGATGGAGGCTAAGCCGGTG
 50 GCGATGGAGGTGGAGGGGGTTCGAGGCGGCGGGGGGCAAGCCGCGGTTTCAGGATGCCGGTG
 GACTCCGACCTCAAGGCGACGGAGTTCTGGCTCTTCTCCTTCGCGAGGCCACACATGGCC
 TCCTTCCACATGGCGTGGTTCTCCTTCTTCTGCTGCTTCGTGTCCACGTTCCGCCGCGCCG
 CCGCTGCTGCCGCTCATCCGCGACACCCTCGGGCTCACGGCCACGGACATCGGCAACGCC
 GGGATCGCGTCCGTGTGCGGCGCCGTGTTTCGCGCGTCTGGCCATGGGCACGGCGTGCAGC
 55 CTGGTGGGGCCAGGCTGGCCTCCGCGTCTCTGATCCTCCTCACCACACCGGCGGTGTAC
 TGCTCCTCCATCATCCAGTCCCCGTGCGGGTACCTCCTCGTGCCTTCTTACGGGCATC
 TCGCTGGCGTCTTCTGTGTCGGCGCAGTTCTGGATGAGCTCCATGTTCTCGGCCCCCAAA
 GTGGGGCTGGCCAACGGCGTGGCGGCGGCTGGGGCAACCTCGGCGGCGGCGGCTCCAG
 CTGCTCATGCCGCTCGTGTACGAGGCCATCCACAAGATCGGTAGCACGCCGTTACGCGG
 60 TGGCGCATCGCCTTCTTCATCCCGGGCCTGATGCAGACGTTCTCGGCCATCGCCGTGCTG

GCGTTCGGGCAGGACATGCCCCGGCGGCAACTACGGGAAGCTCCACAAGACTGGCGACATG
 CACAAGGACAGCTTCGGCAACGTGCTGCGCCACGCCCTCACCAACTACCGCGGCTGGATC
 CTGGCGCTCACCTACGGCTACAGCTTCGGCGTTCGAGCTCACCATCGACAACGTCGTGCAC
 CAGTACTTCTACGACCGCTTCGACGTCAACCTCCAGACCGCCGGGCTCATCGCCGCCAGC
 5 TTCGGGATGGCCAACATCATCTCCCGCCCCGGCGGGGCTACTCTCCGACTGGCTCTCC
 AGCCGGTACGGCATGCGCGGCAGGCTGTGGGGGCTGTGGACTGTGCAGACCATCGGCGGC
 GTCCTCTGCGTGGTGTCTCGGAATCGTCGACTTCTCCTTCGCCGCGTCCGTGCGCGTGATG
 GTGCTCTTCTCCTTCTTCGTCCAGGCCGCGTGCGGGCTCACCTTCGGCATCGTGCCGTTT
 GTGTGCGGAGGTGCTGCGGGCTCATCTCCGGGATGACCGGCGGCGGGGGCAACGTGGGC
 10 GCCGTGCTGACGCAGTACATCTTCTCCACGGCACAAAGTACAAGACGGAGACCGGGATC
 AAGTACATGGGGCTCATGATCATCGCGTGCACGCTGCCCGTCATGCTCATCTACTTCCCG
 CAGTGGGGCGGCATGCTCGTAGGCCCGAGGAAGGGGGCCACGGCGGAGGAGTACTACAGC
 CGGGAGTGGTCGGATCACGAGCGCGAGAAGGGTTTCAACGCGGCCAGCGTGCAGTTTCGCG
 GAGAACAGCGTGCGCGAGGGCGGGAGGTGCTCGGCGAATGGCGGACAGCCCAGGCACACC
 15 GTCCCCGTCGACGCGTCCGCGGCCGGGGTGTGAAGAATGCCACGGACAATAAGGTCGCGG
 TTGTAGTACAAGTGTACAAATTGATGGTACGTGTCGTTTGACCGCGCGCGCGCACAGTGT
 GGGTCGTGGCCTCGTGGGCTTAGTGAGTACAGTGAGGGGTGTACGTGTGTCGTGGCGCG
 CGCGGTCACTCGGTGGCCTTGGGATTGGGGGGGCACTATACGCTAGTACTCCAGATATA
 TACGGGTTTGATTTACTTCTGTGGATCGGCGCTTGTTGGTGGTTTGCTCCCTGTGGTTTT
 20 TGTGATGGTAATCATACTCATACTCAAACAGTC

Посилання

1. Edgerton, M.D. Increasing crop productivity to meet global needs for feed, food, i fuel. *Plant Physiol.* 149, 7-13 (2009).
2. Ju, X. et al. Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106, 3041-3046 (2009).
- 25 3. Guo, J.H. et al. Significant acidification in major Chinese croplands. *Science* 327, 1008-1010 (2010).
4. Xu, G. H., Fan, X.R., Miller, A.J. Plant nitrogen assimilation i use efficiency. *Ann Rev Biol.* 63, 153-182 (2012).
- 30 5. Robertson, G.P. & Vitousek, P.M. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. *Ann Rev Environ i Res.* 34, 97-125 (2009).
6. Tilman, D., Balzer, C, Hill, J., Befort, B.L. Global food demand i the sustainable intensification of agriculture. *Proc Nat Acad Sci USA.* 108, 20260-20264 (2011).
7. Sutton, M.A., Erisman.W., Leip, A., van Grinsven, H., Winiwarer, W. Too much of a good thing. *Nature* 472, 159-61 (2011).
- 35 8. Li, Y.L., Fan, X.R., Shen, Q.R. The relationship between rhizosphere nitrification i ефективності застосування азоту in rice plants. *Plant Cell Environ.* 31, 73-85 (2008).
9. Kirk, G.J.D. & Kronzucker, H.J. The potential for nitrification i nitrate uptake in the rhizosphere of wetland plants: a modeling study. *Ann Bot.* 96, 639-646 (2005).
- 40 10. Zhu, Y.ef al. Adaptation of plasma membrane H(+)-ATPase of rice roots to low pH as related to ammonium nutrition. *Plant Cell Environ.* 32, 1428-1440 (2009).
- H.Araki, R., Hasegawa, H. Expression of rice (*Oryza sativa* L.) genes involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction. *Breeding Sci.* 56, 295-302 (2006).
12. Cai, C. et al. Gene structure i expression of the high-affinity nitrate transport system in rice roots. *J Integ Plant Biol.* 50, 443-151 (2008).
- 45 13. Feng, H.M. et al. Spatial expression i regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen i carbon status. *J Exp Bot.* 62, 2319-2332 (2011).
14. Yan, M. et al. Rice OsNAR2.1 interacts with OsNRT2.1, OsNRT2.2 i OsNRT2.3a nitrate transporters to provide uptake over high i low concentration ranges. *Plant Cell Environ.* 34, 1360-1372 (2011).
- 50 15. Katayama, H. et al. Production i characterization of transgenic rice plants carrying a high-affinity nitrate transporter gene (OsNRT2.1). *Breeding Sci.* 59, 237-243 (2009).
16. Suzui, N., Nakamura, S., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yoneyama, T. A putative acyl-CoA-binding protein is a major phloem sap protein in rice (*Oryza sativa* L). *J Exp Bot.* 57, 2571-2576 (2006).
- 55 17. Rao, T.P., Yano, K., Iijima, M., Yamauchi, A., Tatsumi, J. Regulation of rhizosphere acidification by photosynthetic activity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp.) seedlings. *Ann Bot.* 89, 213-220 (2002).
18. Miller, A.J., Smith, S.J., Theodoulou, F.L. The heterologous expression of H⁺- coupled transporters in *Xenopus* oocytes. In *Membrane Transport Plants i Fungi: Molecular Mechanisms i*

Control (Blatt, M.R., Leigh, R.A. Sanders, D. eds) The Company of Biologists Ltd., Cambridge, UK, pp. 167-178 (1994).

19. Broer, S. et al. Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochem J.* 333, 167-174 (1998).

20. Kurschat, C.E. et al. Alkaline-shifted pH_o sensitivity of AE2c1-mediated anion exchange reveals novel regulatory determinants in the AE2 N-terminal cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 281, 1885-1896 (2006).

21. Foyer, C.H., Bloom, A.J., Queval, G., Noctor, G. Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, i Redox Signaling. *Annu Rev Plant Biol.* 60, 455-484 (2009).

22. Kebeish, R. et al. Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis i biomass production in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol.* 25, 593-599 (2007).

23. Kosegarten, H., Grolig, F., Wieneke, J., Wilson, G. Hoffmann B. Differential ammonia-elicited changes of cytosolic pH in root hair cells of rice i maize as monitored by 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5 (i - 6) -carboxyfluoresce in-fluorescence ratio. *Plant Physiol.* 113, 451-461 (2007).

24. Raven, J. & Smith, F. Nitrogen assimilation i transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.* 76, 415-431 (1976).

25. Curie, C. & Briat, J. F. Iron transport i signaling in plants. *Ann Rev Plant Biol.* 54, 183-206 (2003).

26. Bellati, J. et al. Intracellular pH sensing is altered by plasma membrane PIP aquaporin co-expression. *Plant Mol Biol.* 74, 105-1 18 (2010).

27. Rachmilevitch, S., Cousins, A.B., Bloom, A.J. Nitrate assimilation in plant shoots depends on photorespiration. *Proc Nat Acad Sci USA.* 101, 1 1506-1 1510 (2004).

28. Stitt, M. et al. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J Exp Bot.* 53, 959-970 (2002).

29. Backhausen, J.E., Kitzmann, C, Scheibe, R. Competition between electron acceptors in photosynthesis-regulation of the malate valve during CO₂ fixation i nitrite reduction. *Photosynth Res.* 42, 75-86 (1994).

30. Yamaya, T. et al. Genetic manipulation i quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. *J. Exp Bot.* 53, 917-925 (2002).

31. Good, A.G. et al. Engineering ефективності застосування азоту with alanine aminotransferase. *Can. J. Bot.* 85, 252-262 (2007).

32. Shrawat, A.K., Carroll, R.T., DePauw, M., Taylor, G.J., Good, A.G. Genetic engineering of improved ефективності застосування азоту in rice by the tissue-specific expression of alanine aminotransferase. *Plant Biotech J.* 6, 722-732 (2008).

33. Ai, P. et al. Two rice phosphate transporters, OsPht1;2 i OsPht1;6, have different functions i kinetic properties in uptake i translocation. *Plant J.* 57, 798-809 (2009).

34. Fan, X.R. et al. Comparing nitrate storage i remobilization in two rice cultivars that differ in their ефективності застосування азоту. *J Exp Bot.* 58, 1729-1740 (2007).

35. Ye, J. et al. A monoclonal-antibody-based ELISA for the detection of human FADD (Fas-associated death domain). *Biotechnol Appl Biochem.* 50,143-146 (2008).

36. Shanks, J.H., Lappin, T.R., Hill, CM. In situ hybridization for erythropoietin messenger RNA using digoxigenin-labeled oligonucleotides. *Ann N Y Acad Sci.* 718, 362-365 (1994).

37. Tong, Y.P., Zhou, J. J., Li, Z., Miller, A.J. A two-component high affinity nitrate uptake system in barley. *Plant J.* 41, 442-450 (2005).

38. Orsel, M. et al. Characterization of a two component nitrate transport i signalling high affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*; physiology i protein-protein interaction. *Plant Physiol.* 142, 1304-1317 (2006).

39. Ho, C.H., Lin, S.H., Hu, H.C., Tsay, Y.F. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Ce//* 138, 1184-94 (2009).

40. Li, C, Wong, W.H. Model based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation i outlier detection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 31-36 (2001).

41. Li, Y., Gao, Y., Xu, X., Shen, Q., Guo, S. Light-saturated photosynthetic rate in high-nitrogen rice (*Oryza sativa* L.) leaves is related to chloroplastic CO₂ concentration. *J Exp Bot.* 60, 2351-2360 (2009).

Clough S, Bent A (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis*. *Plant J.* 16: 735-743.

Orsel M, Chopin F, Leleu O, Smith SJ, Krapp A, Daniel-Vedele F, Miller AJ (2006) Characterization of a Two-Component High-Affinity Nitrate Uptake System in *Arabidopsis*. *Physiology i Protein-Protein Interaction. PLANT PHYSIOLOGY* 142: 1304-1317.

Cao A, et al. Serine/threonine kinase gene Stpk-V, a key member of powdery mildew resistance gene Pm21, confers powdery mildew resistance in wheat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 10; 108(19):7727-32.

Hirel et al The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability i quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 58, No. 9, pp. 2369-2387, 2007

Saha et al. 1994 *Planta* 226: 429-442. Fan S-C, Lin C-S, Hsu P-K, Lin S-H, Tsay Y-F (2009) The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.7, Expressed in Phloem, Is Responsible for Source-to-Sink Remobilization of Nitrate. *The Plant Cell* 21: 2750-2761 Jia H, Ren H, Gu M, Zhao J, Sun S, Zhang X, Chen J, Wu P, Xu G (2011) The phosphate transporter gene OsPht1;8 is involved in phosphate homeostasis in rice. *Plant Physiol* 156: 1 164-1 175.

Kronzucker et al. Nitrate-Ammonium Synergism in Rice. A Subcellular Flux Analysis! *Plant Physiology*, March 1999, Vol. 119, pp. 1041-1045, 1999

Almagro A, Lin SH, Tsay YF (2008) Characterization of the Arabidopsis nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development. *Plant Cell* 20: 3289-3299

Chiu CC, Lin CS, Hsia AP, Su RC, Lin HL, Tsay YF (2004) Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1.4, results in a reduced petiole nitrate content i altered leaf development. *Plant Cell Physiol* 45: 1 139-1148

Crawford NM, Glass ADM (1998) Molecular i physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci* 3: 389-395

Fan SC, Lin CS, Hsu PK, Lin SH, Tsay YF (2009) The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. *Plant Cell* 21: 2750-2761

Fan X, Gordon-Weeks R, Shen Q, Miller AJ (2006) Glutamine transport i feedback regulation of nitrate reductase activity in barley roots leads to changes in cytosolic nitrate pools. *J Exp Bot* 57: 1333-1340

Forde BG (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function i regulation. *Biochim Biophys Acta* 1465: 219-235

Gojon A, Krouk G, Perrine-Walker F, Laugier E (2011) Nitrate transceptor(s) in plants. *J Exp Bot* 62: 2299-2308

Huang NC, Liu KH, Lo HJ, Tsay YF (1999) Cloning i functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell* 11: 1381-1392

Kirk GJD (2003) Rice root properties for internal aeration i efficient nutrient acquisition in submerged soil. *New Phytol* 159: 185-194

Kronzucker HJ, Glass ADM, Siddiqi MY, Kirk GJD (2000) Comparative kinetic analysis of ammonium i nitrate acquisition by tropical lowland rice: implications for rice cultivation i yield potential. *New Phytol* 145: 471-476

Li BZ, Xin WJ, Sun SB, Shen QR, Xu GH (2006) Physiological i molecular responses of nitrogen-starved rice plants to re-supply of different nitrogen sources. *Plant Soil* 287: 145-159

Li JY, Fu YL, Pike SM, Bao J, Tian W, Zhang Y, Chen CZ, Zhang Y, Li HM, Huang J, et al (2010) The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap i mediates cadmium tolerance. *Plant Cell* 22: 1633-1646

Lin CM, Koh S, Stacey G, Yu SM, Lin TY, Tsay YF (2000) Cloning i functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, OsNRT1, from rice. *Plant Physiol* 122: 379-388

Lin SH, Kuo HF, Canivenc G, Lin CS, Lepetit M, Hsu PK, Tillard P, Lin HL, Wang YY, Tsai CB, et al (2008) Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell* 20: 2514-2528

Liu KH, Tsay YF (2003) Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J* 22: 1005-1013

Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM (2007) Nitrate transport i signalling. *J Exp Bot* 58: 2297-2306

Miller AJ, Fan X, Shen Q, Smith SJ (2008) Amino acids i nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *J Exp Bot* 59: 1 11-119

Okamoto M, Kumar A, Li WB, Wang Y, Siddiqi MY, Crawford NM, Glass ADM (2006) High-affinity nitrate transport in roots of Arabidopsis depends on expression of the NAR2-like gene AtNRT3.1. *Plant Physiol* 140: 1036-1046

Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F (2002) Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in Arabidopsis: structure i gene expression. *Plant Physiol* 129: 886-896

Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK (2007) Nitrate transporters i peptide transporters. FEBS Lett 581: 2290-2300

Wang YY, Tsay YF (2011) Arabidopsis nitrate transporter NRT1.9 is important in phloem nitrate transport. Plant Cell 23: 1945-1957

5 Xu G, Fan X, Miller AJ (2012) Plant nitrogen assimilation i use efficiency. Annu Rev Plant Biol 63: 153-182

Yong Z, Kotur Z, Glass ADM (2010) Characterization of an intact two component high-affinity nitrate transporter from Arabidopsis roots. Plant J 63: 739-748

10 Zhou JJ, Fernandez E, Galvan A, Miller AJ (2000) A high affinity nitrate transport system from Chlamydomonas requires two gene products. FEBS Lett 466: 225-227

Zhuo DG, Okamoto M, Vidmar JJ, Glass ADM (1999) Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2; 1At) in roots of Arabidopsis thaliana. Plant J 17: 563-568.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Plant Bioscience Limited et al

<120> Трансгенні рослини

<130> PC926735WOA

<160> 68

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1461

<212> ДНК

<213> Oryza sativa

<220>

<223> OsNRT2.3b Номер доступу NO: AK072215

<400> 1

atggaggcta agccggtggc gatggagggtg gaggggggtcg aggcggcggg gggcaagccg
60

cggttcagga tgccggtgga ctccgacctc aaggcgacgg agttctggct cttctccttc
120

gcgaggccac acatggcctc ctccacatg gcgtggttct ccttctcttg ctgcttcgtg
180

tccacgttcg ccgtgttcgc gcgtctggcc atgggcacgg cgtgcgacct ggtcgggccc
240

aggctggcct ccgctctctc gatcctctc accacaccgg cgggtgactg ctctccatc
300

atccagtcac cgctggggtg cctctctctg cgttcttca cgggcatctc gctggcgctg
360

ttcgtgtcgg cgcagttctg gatgagctcc atgttctcgg ccccaaaagt ggggttgcc
420

aacggcggtg ccggcggtg gggcaacctc ggcggcgcg ccgtccagct gtcgatgccg
480

ctcgtgtacg aggccatcca caagatcgg agcacgccgt tcacggcgtg gcgcatcgcc
540

ttcttcatcc cgggcctgat gcagacgttc tcggccatcg ccgtgctggc gttcgggcag
600

gacatgcccg gcggcaacta cgggaagctc cacaagactg gcgacatgca caaggacagc
660

ttcggcaacg tgctgcgcca cgccctcacc aactaccgg gctggatcct ggcgctcacc
720

tacggctaca gttcggcgt cgagctcacc atcgacaacg tcgtgcacca gtacttctac
780

gaccgcttcg acgtcaacct ccagaccgcc gggctcatcg ccgccagctt cgggatggcc
840

aacatcatct cccgccccgg cggcgggcta ctctccgact ggctctccag ccggtacggc
900

atgcgcggca ggctgtgggg gctgtggact gtgcagacca tcggcggcgt cctctcgctg
960

gtgctcgaa tcgtcgactt ctcttcgcc gcgtccgctg ccgtgatggt gctcttctcc
1020

ttcttcgtcc aggccgcgtg cgggctcacc ttccgcatcg tgccgttcgt gtcgcggagg
1080

tcgctggggc tcctctccgg gatgaccggc ggccggggca acgtgggcgc cgtgctgacg
1140

cagtacatct tcttcacgg cacaagtac aagacggaga ccgggatcaa gtacatgggg
1200

ctcatgatca tcgctgcac gctgcccgtc atgctcatct acttcccgca gtggggcggc
1260

atgctcgtag gcccgaggaa gggggccacg gcggaggagt actacagccg ggagtggctg
1320

gatcacgagc gcgagaaggg ttccaacgcg gccagcgtgc ggttcgcgga gaacagcgtg
1380

cgcgagggcg ggaggtcgtc ggcgaatggc ggacagccca ggcacaccgt ccccgctcac
1440

gcgtcgccgg ccgggggtgtg a
1461

<210> 2
<211> 1551
<212> ДНК
<213> Oryza sativa

<220>
<223> OsNRT2.3a Номер доступа NO: AK109776

<400> 2
atggaggcta agccgggtggc gatggagggtg gagggggtcg aggcggcggg gggcaagccg
60

cggttcagga tgccgggtgga ctccgacctc aaggcgacgg agttctggct cttctccttc
120

gcgaggccac acatggcctc cttccacatg gcgtgggttct cttctctctg ctgcttcgtg
180

tcacgttcg ccgcgcgcgc gctgctgcgc ctcatccgcg acaccctcgg gtcacggcc
240

acggacatcg gcaacgccgg gatcgcgctc gtgtcgggcg ccgtgttcgc gcgtctggcc
300

atgggcacgg cgtgcgacct ggtcggggccc aggcctggcct ccgcgtctct gatcctcctc
 360
 accacaccgg cgggtgtactg ctccctccatc atccagtccc cgtcggggta cctcctcgtg
 420
 cgcttcttca cgggcacctc gctggcgctg ttcgtgtcgg cgcagttctg gatgagctcc
 480
 atgttctcgg cccccaaagt ggggctggcc aacggcgtgg ccggcggtg gggcaacctc
 540
 ggcgggggcg ccgtccagct gctcatgccg ctctgttacg aggccatcca caagatcggg
 600
 agcacgccgt tcacggcgtg gcgcacgcgc ttcttccatc cgggcctgat gcagacgttc
 660
 tcggccatcg ccgtgctggc gttcgggcag gacatgcccg gcggcaacta cgggaagctc
 720
 cacaagactg gcgacatgca caaggacagc ttcggcaacg tgctgcgcca cgcctcacc
 780
 aactaccgcg gctggatcct ggcgctcacc tacggctaca gcttcggcgt cgagctcacc
 840
 atcgacaacg tcgtgcacca gtacttctac gaccgcttcg acgtcaacct ccagaccgcc
 900
 gggtcatcg ccgccagctt cgggatggcc aacatcatct ccgcgcccg cggcgggcta
 960
 ctctccgact ggctotccag ccggtagcgc atgcgcggca ggctgtgggg gctgtggact
 1020
 gtgcagacca tcggcggcgt cctctgcgtg gtgctcgaa tcgtcgactt ctcttcgac
 1080
 gcgtccgctg ccgtgatggg gctcttctcc ttcttcgtcc aggcgcgtg cgggctcacc
 1140
 ttcggcatcg tgccgttcgt gtgcggagg tcgtggggg tcatctccgg gatgaccggc
 1200
 ggcgggggca acgtgggcgc cgtgctgacg cagtacatct tcttccacgg cacaagtac
 1260
 aagacggaga ccgggatcaa gtacatgggg ctcatgatca tcgcgtgcac gctgcccgtc
 1320
 atgctcatct acttcccga gtggggcggc atgctcgtag gcccgaggaa gggggccacg
 1380
 gcggaggagt actacagccg ggagtggctg gatcacgagc gcgagaaggg tttaacgcg
 1440
 gccagcgtgc ggttcgcgga gaacagcgtg cgcgaggcg ggaggtcgtc ggcgaatggc
 1500

ggacagccca ggcacaccgt ccccgtagac gcgtcgccgg ccgggggtgtg a
1551

<210> 3
<211> 486
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<220>
<223> OsNRT2.3b амінокислотна послідовність

<400> 3

Met	Glu	Ala	Lys	Pro	Val	Ala	Met	Glu	Val	Glu	Gly	Val	Glu	Ala	Ala
1			5					10					15		
Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Phe	Arg	Met	Pro	Val	Asp	Ser	Asp	Leu	Lys	Ala
			20					25					30		
Thr	Glu	Phe	Trp	Leu	Phe	Ser	Phe	Ala	Arg	Pro	His	Met	Ala	Ser	Phe
		35					40					45			
His	Met	Ala	Trp	Phe	Ser	Phe	Phe	Cys	Cys	Phe	Val	Ser	Thr	Phe	Ala
	50					55					60				
Val	Phe	Ala	Arg	Leu	Ala	Met	Gly	Thr	Ala	Cys	Asp	Leu	Val	Gly	Pro
65				70					75					80	
Arg	Leu	Ala	Ser	Ala	Ser	Leu	Ile	Leu	Leu	Thr	Thr	Pro	Ala	Val	Tyr
			85						90					95	
Cys	Ser	Ser	Ile	Ile	Gln	Ser	Pro	Ser	Gly	Tyr	Leu	Leu	Val	Arg	Phe
			100					105					110		
Phe	Thr	Gly	Ile	Ser	Leu	Ala	Ser	Phe	Val	Ser	Ala	Gln	Phe	Trp	Met
		115					120					125			
Ser	Ser	Met	Phe	Ser	Ala	Pro	Lys	Val	Gly	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Ala
		130				135						140			
Gly	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Gly	Gly	Gly	Ala	Val	Gln	Leu	Leu	Met	Pro
145					150					155				160	
Leu	Val	Tyr	Glu	Ala	Ile	His	Lys	Ile	Gly	Ser	Thr	Pro	Phe	Thr	Ala
				165					170					175	

Trp Arg Ile Ala Phe Phe Ile Pro Gly Leu Met Gln Thr Phe Ser Ala
 180 185 190
 Ile Ala Val Leu Ala Phe Gly Gln Asp Met Pro Gly Gly Asn Tyr Gly
 195 200 205
 Lys Leu His Lys Thr Gly Asp Met His Lys Asp Ser Phe Gly Asn Val
 210 215 220
 Leu Arg His Ala Leu Thr Asn Tyr Arg Gly Trp Ile Leu Ala Leu Thr
 225 230 235 240
 Tyr Gly Tyr Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Ile Asp Asn Val Val His
 245 250 255
 Gln Tyr Phe Tyr Asp Arg Phe Asp Val Asn Leu Gln Thr Ala Gly Leu
 260 265 270
 Ile Ala Ala Ser Phe Gly Met Ala Asn Ile Ile Ser Arg Pro Gly Gly
 275 280 285
 Gly Leu Leu Ser Asp Trp Leu Ser Ser Arg Tyr Gly Met Arg Gly Arg
 290 295 300
 Leu Trp Gly Leu Trp Thr Val Gln Thr Ile Gly Gly Val Leu Cys Val
 305 310 315 320
 Val Leu Gly Ile Val Asp Phe Ser Phe Ala Ala Ser Val Ala Val Met
 325 330 335
 Val Leu Phe Ser Phe Phe Val Gln Ala Ala Cys Gly Leu Thr Phe Gly
 340 345 350
 Ile Val Pro Phe Val Ser Arg Arg Ser Leu Gly Leu Ile Ser Gly Met
 355 360 365
 Thr Gly Gly Gly Gly Asn Val Gly Ala Val Leu Thr Gln Tyr Ile Phe
 370 375 380
 Phe His Gly Thr Lys Tyr Lys Thr Glu Thr Gly Ile Lys Tyr Met Gly
 385 390 395 400
 Leu Met Ile Ile Ala Cys Thr Leu Pro Val Met Leu Ile Tyr Phe Pro
 405 410 415

Gln Trp Gly Gly Met Leu Val Gly Pro Arg Lys Gly Ala Thr Ala Glu
420 425 430

Glu Tyr Tyr Ser Arg Glu Trp Ser Asp His Glu Arg Glu Lys Gly Phe
435 440 445

Asn Ala Ala Ser Val Arg Phe Ala Glu Asn Ser Val Arg Glu Gly Gly
450 455 460

Arg Ser Ser Ala Asn Gly Gly Gln Pro Arg His Thr Val Pro Val Asp
465 470 475 480

Ala Ser Pro Ala Gly Val
485

<210> 4

<211> 516

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> OsNRT2.3a амінокислотна послідовність

<400> 4

Met Glu Ala Lys Pro Val Ala Met Glu Val Glu Gly Val Glu Ala Ala
1 5 10 15

Gly Gly Lys Pro Arg Phe Arg Met Pro Val Asp Ser Asp Leu Lys Ala
20 25 30

Thr Glu Phe Trp Leu Phe Ser Phe Ala Arg Pro His Met Ala Ser Phe
35 40 45

His Met Ala Trp Phe Ser Phe Phe Cys Cys Phe Val Ser Thr Phe Ala
50 55 60

Ala Pro Pro Leu Leu Pro Leu Ile Arg Asp Thr Leu Gly Leu Thr Ala
65 70 75 80

Thr Asp Ile Gly Asn Ala Gly Ile Ala Ser Val Ser Gly Ala Val Phe
85 90 95

Ala Arg Leu Ala Met Gly Thr Ala Cys Asp Leu Val Gly Pro Arg Leu
100 105 110

Ala Ser Ala Ser Leu Ile Leu Leu Thr Thr Pro Ala Val Tyr Cys Ser
115 120 125

Ser Ile Ile Gln Ser Pro Ser Gly Tyr Leu Leu Val Arg Phe Phe Thr
130 135 140

Gly Ile Ser Leu Ala Ser Phe Val Ser Ala Gln Phe Trp Met Ser Ser
145 150 155 160

Met Phe Ser Ala Pro Lys Val Gly Leu Ala Asn Gly Val Ala Gly Gly
165 170 175

Trp Gly Asn Leu Gly Gly Gly Ala Val Gln Leu Leu Met Pro Leu Val
180 185 190

Tyr Glu Ala Ile His Lys Ile Gly Ser Thr Pro Phe Thr Ala Trp Arg
195 200 205

Ile Ala Phe Phe Ile Pro Gly Leu Met Gln Thr Phe Ser Ala Ile Ala
210 215 220

Val Leu Ala Phe Gly Gln Asp Met Pro Gly Gly Asn Tyr Gly Lys Leu
225 230 235 240

His Lys Thr Gly Asp Met His Lys Asp Ser Phe Gly Asn Val Leu Arg
245 250 255

His Ala Leu Thr Asn Tyr Arg Gly Trp Ile Leu Ala Leu Thr Tyr Gly
260 265 270

Tyr Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Ile Asp Asn Val Val His Gln Tyr
275 280 285

Phe Tyr Asp Arg Phe Asp Val Asn Leu Gln Thr Ala Gly Leu Ile Ala
290 295 300

Ala Ser Phe Gly Met Ala Asn Ile Ile Ser Arg Pro Gly Gly Gly Leu
305 310 315 320

Leu Ser Asp Trp Leu Ser Ser Arg Tyr Gly Met Arg Gly Arg Leu Trp
325 330 335

Gly Leu Trp Thr Val Gln Thr Ile Gly Gly Val Leu Cys Val Val Leu
340 345 350

Gly Ile Val Asp Phe Ser Phe Ala Ala Ser Val Ala Val Met Val Leu
355 360 365

Phe Ser Phe Phe Val Gln Ala Ala Cys Gly Leu Thr Phe Gly Ile Val
370 375 380

Pro Phe Val Ser Arg Arg Ser Leu Gly Leu Ile Ser Gly Met Thr Gly
385 390 395 400

Gly Gly Gly Asn Val Gly Ala Val Leu Thr Gln Tyr Ile Phe Phe His
405 410 415

Gly Thr Lys Tyr Lys Thr Glu Thr Gly Ile Lys Tyr Met Gly Leu Met
420 425 430

Ile Ile Ala Cys Thr Leu Pro Val Met Leu Ile Tyr Phe Pro Gln Trp
435 440 445

Gly Gly Met Leu Val Gly Pro Arg Lys Gly Ala Thr Ala Glu Glu Tyr
450 455 460

Tyr Ser Arg Glu Trp Ser Asp His Glu Arg Glu Lys Gly Phe Asn Ala
465 470 475 480

Ala Ser Val Arg Phe Ala Glu Asn Ser Val Arg Glu Gly Gly Arg Ser
485 490 495

Ser Ala Asn Gly Gly Gln Pro Arg His Thr Val Pro Val Asp Ala Ser
500 505 510

Pro Ala Gly Val
515

<210> 5
<211> 1759
<212> ДНК
<213> Oryza sativa

<220>
<223> Промотор нуклеотидної послідовності флемеї з 61 до 1819

<400> 5
caaatgtgca atgctgatta gagtttgacg atgctgtttg gtttagttta gatgtggcat 60
tttgtagtg gtttctttga tgaaaaattc ttggctatga taaagtttgc tttctgaata 120
tatgaatagt ggccatggtt caagaaactc cagtttagtg ggataattta tggtagattct 180
gggcgcaatt cggggaaatt ttttttggcg agaatcttat cattgagata aagagggcaa 240
gaatatcaac agacttttaa tcttaataaa aagcactctt agcgtaagag caaagcattg 300

```

caatctcgtg tgacaagaac gtttcttttt ctccatcttt ttctttttta ccaaaaaatg 360
agtgttgcca actgctgcac cttcttaggc cggtttggtc ttgtttggaa cgcacggaat 420
gcccgatgca aaaaaaaaaa agaaatgctg ttaacaaatc actgtcctga cacgggtaat 480
taggtggtaa tttggtgcat ctgcaaagaa gcaacagatg ctttctttca ctgaaagcat 540
atttgcatga tttcttggtt ctgcttggtc tctctctgat gctgactgta ttccactctg 600
cgctgtaatg ccatgttagt gattaatatg ttcaaaagag cataaaagaa ttgccaattg 660
gatgttagag attactgtgt tgttcaaaag agcataaaag aattaccaat ttgatggtag 720
atgttactag caccaccttg gtgtttcccc atggttttct gcaattctgc ccatgatctt 780
tctgcttttc tgaaagacct atgtttcaga ggtcaagctt ctggaagggt attaggaggg 840
atgagtcgtc attttgctg tgggccccac tagtcagtgt caatagtgtt aaagggtaga 900
aattttcttg ctgtttttct tggaacaat ttcattgcgc ctgatctgat ggtcgggtctg 960
gtaatcaaat caccagatcc tgaaatccac caaatcaaac cgtgagatgt ttgcagaggc 1020
aaaacaagaa aagcatctgc tttatttctc tcttgcttcc ttttcatccc caaccagtcc 1080
ttttttcttc tgtttatttg tagaagtcta ccacctgcag tctattattc tacagagaaa 1140
aagattgaag ctttttttct ccaaagctga caatgggtgc ggcatatgct aataggatac 1200
tcccttcgtc taggaaaaaa ccaaccact acaattttga atatatattt attcagatgt 1260
gttatgcttc ctactccttc tcaggatagg tgagatattt catagtataa tgaatttgga 1320
catatatttg tccaaattca tcgcattatg aaatgtctcg ttcatctat gttgttatat 1380
tatagacgga gatagtagat tcggttattt ttggacagag aaagtactcg cctgtgctag 1440
tgacatgatt agtgacacca tcagattaaa aaaacatatg ttttgattaa aaaaatgggg 1500
aatttggggg gagcaataat ttgggggttat ccattgctgt ttcattcatgt cagctgaaag 1560
gccctaccac taaaccaata tctgtactat tctaccacct atcagaattc agagcactgg 1620
ggttttgcaa ctatttattg gtccttctgg atctcggaga aacctccat tcgtttgctc 1680
ttaattaaaa gggcaattct gcagatatcc atcacactgg cggccgctcg agcatgcac 1740
tagaggccca attcgccca 1759

```

```

<210> 6
<211> 1563
<212> ДНК
<213> Кукурудза звичайна

```

```

<220>
<223> Послідовність нуклеїнової кислоти кукурудзи - OsNRT2.3b
відповідний ген

```

```

<400> 6
atggcgagg gggagttaa gcccgcgcg atgcaggtgg aggtcctgc cgaggcgcg 60
gcggcgccgt ccaagcgcg gttcaggatg cccgtcgact ccgacaaca gccaccgag 120
ttctggctct tctccttcgc gagccgcac atgagcgct tccacatgtc gtggttctcc 180
ttcttctgct gcttctctc caccttcgc gcgccgcgc tgctcccgct catccgggac 240
acgctggggc tcacggccac ggacatcggc aacgccggga tcgcctccgt gtccggcgcg 300
gtcttcgcgc gcgtggccat gggcacggcg tgcgacctg tgggcccgcg cctggcgctc 360
gcggccatca tactcctcac cagcccgcc gtctactact ccgccgtcat cgactccgcc 420
tcgtcctacc tgctcgtgcg ctcttcaag ggttctcgc tcgctcctt cgtgtccacg 480
cagttctgga tgagctccat gttctcgcg cccaaggtgg ggctggcaa cggcgtcgcc 540
ggggggtgg gcaacctcg cgccggcgcc gtgcagctca tcatgccgt cgtgttcgag 600
gccatccgca aggcggggc cagccggtc acggcggtgc gcgtcgctt ctctgtccg 660
ggcctgctgc agacgtgtc ggccgtcgcc gtgctggcgt tcggccagga catgccgac 720
ggcaactacc gcaagctgca caggtccgc gacatgcaca aggacagctt cggcaactg 780
ctccgccag ccgtcacca ctaccgcgc tggatcctg cgctcaccta cggatactgc 840
ttcggcgtg agctcgccgt ggacaacatc gtcgcgcagt actctacga ccgcttcggc 900
gtcaagctca gcaccgcgc cttcatcgcc gccagcttc ggatggcaa catcgtctcc 960
cgccccggc gcggcctcct gtcggactg ctctccagc gcttcggcat gcgcggcagg 1020
ctgtggggcc tgtgggtgt gcagaccatc gggggcgctc tctgcgtcgt gctcggcgcc 1080
gtcgactact ccttcgcgc gtcctggcc gtcatgatac tcttctccat gttcgtgcag 1140
gcggcctgc ggctcacct tggcatcgt ccgttcgtc ccgaaggtc gctggggctc 1200
atctccggca tgaccggcg cgccggcaac gtggcgccg tgctcacgca gctcatctc 1260
ttccacggat ccaagtacaa gacggagac gggatcaagt acatggggtt catgatcatc 1320
gcctgcacgt tgccatcac gctcatctac ttcccgagt gggcgggcat gttcctggg 1380
ccgcggcccg gggcgacgc ggaggactac tacaaccgg agtggacagc gcacgagtg 1440
gacaagggtt tcaacaccg gagcgtacg tttgcggaga acagcgtgc ggaaggggga 1500
cgctcgggca gccagtcaa gcacactact gtgcccgtc agtcctcgc gcccgacgtg 1560
tga 1563

```

```

<210> 7
<211> 520
<212> PRT

```

<213> Кукурудза звичайна

<220>

<223> амінокислотна послідовність кукурудзи - OsNRT2.3b відповідний ген

<400> 7

Met Ala Glu Gly Glu Phe Lys Pro Ala Ala Met Gln Val Glu Ala Pro
1 5 10 15

Ala Glu Ala Ala Ala Ala Pro Ser Lys Pro Arg Phe Arg Met Pro Val
20 25 30

Asp Ser Asp Asn Lys Ala Thr Glu Phe Trp Leu Phe Ser Phe Ala Arg
35 40 45

Pro His Met Ser Ala Phe His Met Ser Trp Phe Ser Phe Phe Cys Cys
50 55 60

Phe Leu Ser Thr Phe Ala Ala Pro Pro Leu Leu Pro Leu Ile Arg Asp
65 70 75 80

Thr Leu Gly Leu Thr Ala Thr Asp Ile Gly Asn Ala Gly Ile Ala Ser
85 90 95

Val Ser Gly Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Met Gly Thr Ala Cys Asp
100 105 110

Leu Val Gly Pro Arg Leu Ala Ser Ala Ala Ile Ile Leu Leu Thr Thr
115 120 125

Pro Ala Val Tyr Tyr Ser Ala Val Ile Asp Ser Ala Ser Ser Tyr Leu
130 135 140

Leu Val Arg Phe Phe Thr Gly Phe Ser Leu Ala Ser Phe Val Ser Thr
145 150 155 160

Gln Phe Trp Met Ser Ser Met Phe Ser Pro Pro Lys Val Gly Leu Ala
165 170 175

Asn Gly Val Ala Gly Gly Trp Gly Asn Leu Gly Gly Gly Ala Val Gln
180 185 190

Leu Ile Met Pro Leu Val Phe Glu Ala Ile Arg Lys Ala Gly Ala Thr
195 200 205

Pro Phe Thr Ala Trp Arg Val Ala Phe Phe Val Pro Gly Leu Leu Gln

210	215	220
Thr Leu Ser Ala Val	Ala Val Leu Ala Phe Gly Gln Asp Met Pro Asp	
225	230	235 240
Gly Asn Tyr Arg Lys	Leu His Arg Ser Gly Asp Met His Lys Asp Ser	
	245	250 255
Phe Gly Asn Val Leu Arg His Ala Val Thr Asn Tyr Arg Ala Trp Ile		
	260	265 270
Leu Ala Leu Thr Tyr Gly Tyr Cys Phe Gly Val Glu Leu Ala Val Asp		
	275	280 285
Asn Ile Val Ala Gln Tyr Phe Tyr Asp Arg Phe Gly Val Lys Leu Ser		
	290	295 300
Thr Ala Gly Phe Ile Ala Ala Ser Phe Gly Met Ala Asn Ile Val Ser		
	305	310 315 320
Arg Pro Gly Gly Gly Leu Leu Ser Asp Trp Leu Ser Ser Arg Phe Gly		
	325	330 335
Met Arg Gly Arg Leu Trp Gly Leu Trp Val Val Gln Thr Ile Gly Gly		
	340	345 350
Val Leu Cys Val Val Leu Gly Ala Val Asp Tyr Ser Phe Ala Ala Ser		
	355	360 365
Val Ala Val Met Ile Leu Phe Ser Met Phe Val Gln Ala Ala Cys Gly		
	370	375 380
Leu Thr Phe Gly Ile Val Pro Phe Val Ser Arg Arg Ser Leu Gly Leu		
	385	390 395 400
Ile Ser Gly Met Thr Gly Gly Gly Gly Asn Val Gly Ala Val Leu Thr		
	405	410 415
Gln Leu Ile Phe Phe His Gly Ser Lys Tyr Lys Thr Glu Thr Gly Ile		
	420	425 430
Lys Tyr Met Gly Phe Met Ile Ile Ala Cys Thr Leu Pro Ile Thr Leu		
	435	440 445
Ile Tyr Phe Pro Gln Trp Gly Gly Met Phe Leu Gly Pro Arg Pro Gly		

450	455	460
Ala Thr Ala Glu Asp Tyr Tyr Asn Arg Glu Trp Thr Ala His Glu Cys		
465	470	475 480
Asp Lys Gly Phe Asn Thr Ala Ser Val Arg Phe Ala Glu Asn Ser Val		
	485	490 495
Arg Glu Gly Gly Arg Ser Gly Ser Gln Ser Lys His Thr Thr Val Pro		
	500	505 510
Val Glu Ser Ser Pro Ala Asp Val		
	515	520

<210> 8
 <211> 1890
 <212> ДНК
 <213> Соя

<220>
 <223> послідовність нуклеїнової кислоти сої- OsNRT2.3b відповідний ген

<400> 8	
tcacactttc ttccttaatt ttctagctct tgcacgtac ttgaattcaa ttagttatta	60
atggtgaga ttgaggttc tcccggaagc tccatgcatg gagtaacagg aagagaacaa	120
acattttag cctcagttgc ttctccaatt gtccctacag acaccacagc caaatttgct	180
ctcccagtgg attcagaaca caaggccaag gttttcaaac tcttctccct ggccaatccc	240
cacatgagaa ccttcacact ttcttgatc tcttcttca cctgcttcgt ctgacattc	300
gcagcagcac ctcttggtcc catcatccgc gacaacctta acctcaccaa aagcgacatt	360
ggaaacgccg gggttgcttc tgtctccgga agcatcttct caaggctcgc aatgggtgca	420
gtctgtgaca tgttgggtcc acgctatggc tgcgccttcc tcatcatgct ttcggcccct	480
acgggtgtct gcatgtcctt tgtgaaagat gctgcggggt acatagcggg tcggttcttg	540
attgggttct cgttgccgac gtttgtgtcg tgccagtact ggatgagcac gatgttcaac	600
agtaagatta tagggcttgc gaatgggact gctgcggggt gggggaacat ggggtgtgga	660
gccactcagc tcataatgcc ttgtgtgtat gagcttatca gaagagctgg ggctactccc	720
ttcactgctt ggaggattgc cttctttgtt ccgggtttca tgcattgcat catggggatt	780
cttgtctca ctctaggcca ggacttgctt gatggaaacc tcggggcctt gcggaagaag	840
gggtgatgtag ctaaagacaa gttttccaag gtgctatggt atgccataac aaattacagg	900
acatggattt ttgctctcct ctatgggtac tccatgggag ttgaattaac aactgacaat	960


```

gtcattgctg agtattttcta tgacagattt aatctcaagc tacacactgc tggaatcatt 1020
gctgcttcat ttggaatggc aaacttagtt gctcgacctt ttggtggata tgcttcagat 1080
gttgacagcca ggctgttttg catgagggga agactctgga ccttttggat cctccaaacc 1140
ttaggagggg ttttctgtat ttggcttggc cgtgccaaatt ctcttcctat tgctgtattg 1200
gccatgatcc tgttctctat aggagctcaa gctgcattgt gtgcaacttt tggcatcatt 1260
cctttcatct caagaaggtc tttggggatc atatcaggtc taactgggtg aggtggaaac 1320
tttgggtctg gcctcaccca attggtcttc ttttcaacct ccaaattctc tactgccaca 1380
ggctctctct tgatgggtgt aatgatagtg gcttgacctc taccagttag tttgtttcac 1440
ttccacagct ggggtagcat gtttctacca cctcaaaag atgtcagcaa atccactgaa 1500
gaattctatt acacctctga atggaatgag gaagagaagc agaagggttt gcaccagcaa 1560
agtctcaaat ttgctgagaa tagccgatct gagagaggaa agcgagtggc ttcagacca 1620
acacctcaa atgcaactcc cactcatgtc tagccatagc acttcaatca aagaagatca 1680
tgaacataa ttactgagca gtattgggaa tgaagaacca tgagttgaag aattttctaa 1740
taagaaatct tgtaacatgt agacatagaa tgttctgggt ctggtttgctg tgtggtgtaa 1800
gagttgtcta cttgtggtaa gtcataagta tcataatcag tatgtcaatg cagatcttga 1860
tgctgagtat caatagtatc aaaaaaaaaa 1890

```

<210> 9

<211> 530

<212> PRT

<213> Соя

<220>

<223> амінокислотна послідовність сої - OsNRT2.3b відповідний ген

<400> 9

```

Met Ala Glu Ile Glu Gly Ser Pro Gly Ser Ser Met His Gly Val Thr
1           5           10           15

```

```

Gly Arg Glu Gln Thr Phe Val Ala Ser Val Ala Ser Pro Ile Val Pro
20           25           30

```

```

Thr Asp Thr Thr Ala Lys Phe Ala Leu Pro Val Asp Ser Glu His Lys
35           40           45

```

```

Ala Lys Val Phe Lys Leu Phe Ser Leu Ala Asn Pro His Met Arg Thr
50           55           60

```

```

Phe His Leu Ser Trp Ile Ser Phe Phe Thr Cys Phe Val Ser Thr Phe

```

65		70		75		80									
Ala	Ala	Ala	Pro	Leu	Val	Pro	Ile	Ile	Arg	Asp	Asn	Leu	Asn	Leu	Thr
				85					90					95	
Lys	Ser	Asp	Ile	Gly	Asn	Ala	Gly	Val	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Ile
			100					105					110		
Phe	Ser	Arg	Leu	Ala	Met	Gly	Ala	Val	Cys	Asp	Met	Leu	Gly	Pro	Arg
			115				120					125			
Tyr	Gly	Cys	Ala	Phe	Leu	Ile	Met	Leu	Ser	Ala	Pro	Thr	Val	Phe	Cys
	130					135					140				
Met	Ser	Phe	Val	Lys	Asp	Ala	Ala	Gly	Tyr	Ile	Ala	Val	Arg	Phe	Leu
145				150						155					160
Ile	Gly	Phe	Ser	Leu	Ala	Thr	Phe	Val	Ser	Cys	Gln	Tyr	Trp	Met	Ser
				165					170					175	
Thr	Met	Phe	Asn	Ser	Lys	Ile	Ile	Gly	Leu	Ala	Asn	Gly	Thr	Ala	Ala
			180					185					190		
Gly	Trp	Gly	Asn	Met	Gly	Gly	Gly	Ala	Thr	Gln	Leu	Ile	Met	Pro	Leu
		195					200					205			
Val	Tyr	Glu	Leu	Ile	Arg	Arg	Ala	Gly	Ala	Thr	Pro	Phe	Thr	Ala	Trp
	210					215					220				
Arg	Ile	Ala	Phe	Phe	Val	Pro	Gly	Phe	Met	His	Val	Ile	Met	Gly	Ile
225					230					235					240
Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Gly	Gln	Asp	Leu	Pro	Asp	Gly	Asn	Leu	Gly	Ala
				245					250				255		
Leu	Arg	Lys	Lys	Gly	Asp	Val	Ala	Lys	Asp	Lys	Phe	Ser	Lys	Val	Leu
			260					265					270		
Trp	Tyr	Ala	Ile	Thr	Asn	Tyr	Arg	Thr	Trp	Ile	Phe	Ala	Leu	Leu	Tyr
		275					280					285			
Gly	Tyr	Ser	Met	Gly	Val	Glu	Leu	Thr	Thr	Asp	Asn	Val	Ile	Ala	Glu
	290					295					300				
Tyr	Phe	Tyr	Asp	Arg	Phe	Asn	Leu	Lys	Leu	His	Thr	Ala	Gly	Ile	Ile

305	310	315	320
Ala Ala Ser Phe Gly Met Ala Asn Leu Val Ala Arg Pro Phe Gly Gly	325	330	335
Tyr Ala Ser Asp Val Ala Ala Arg Leu Phe Gly Met Arg Gly Arg Leu	340	345	350
Trp Thr Leu Trp Ile Leu Gln Thr Leu Gly Gly Val Phe Cys Ile Trp	355	360	365
Leu Gly Arg Ala Asn Ser Leu Pro Ile Ala Val Leu Ala Met Ile Leu	370	375	380
Phe Ser Ile Gly Ala Gln Ala Ala Cys Gly Ala Thr Phe Gly Ile Ile	385	390	395
Pro Phe Ile Ser Arg Arg Ser Leu Gly Ile Ile Ser Gly Leu Thr Gly	405	410	415
Ala Gly Gly Asn Phe Gly Ser Gly Leu Thr Gln Leu Val Phe Phe Ser	420	425	430
Thr Ser Lys Phe Ser Thr Ala Thr Gly Leu Ser Leu Met Gly Val Met	435	440	445
Ile Val Ala Cys Thr Leu Pro Val Ser Val Val His Phe Pro Gln Trp	450	455	460
Gly Ser Met Phe Leu Pro Pro Ser Lys Asp Val Ser Lys Ser Thr Glu	465	470	475
Glu Phe Tyr Tyr Thr Ser Glu Trp Asn Glu Glu Glu Lys Gln Lys Gly	485	490	495
Leu His Gln Gln Ser Leu Lys Phe Ala Glu Asn Ser Arg Ser Glu Arg	500	505	510
Gly Lys Arg Val Ala Ser Ala Pro Thr Pro Pro Asn Ala Thr Pro Thr	515	520	525
His Val	530		

<210> 10

<211> 1590
 <212> ДНК
 <213> СоЯ

<220>

<223> послідовність нуклеїнової кислоти сої - OsNRT2.3b відповідний ген

<400> 10

```

atggctgaga ttgagggttc tcctggaagc tccatgcatg gagtaacagg aagagaacaa      60
acattcgtag cctcaattgc ttctccaatt gtcccccacag acaccacagc caaatttgct      120
ctcccagtag actcagagca caaggccaag attttcaaac tcttctccat ggccaatccc      180
cacatgagaa ccttcacact ttcttgatc tccttcttca cctgcttcgt ctgcaccttc      240
gcagcagccc ctcttgccc catcatccgc gacaacctta acctcaccaa aagcgacatt      300
ggaaacgccg ggggtgcttc tgtctccgga agcatcttct ctaggcttgc aatgggtgcg      360
gtctgtgacc tattaggtcc acgttatggc tgtgccttcc tcatcatgct ctgggccccca      420
accgtgttct gcatgtcctt tgtgaaagat gctgcggggg acataatggt tcggttcttg      480
atagggttct ccttggaac gttcgtgtca tgccagtact ggatgagcac gatgttcaac      540
agtaagatta tagggcttgc gaatggaact gctgcggggg gggggaacat ggggtgtgga      600
gccactcagc tcataatgcc tttggtgtat gagcttatca gaagagctgg ggctactccc      660
ttcactgctt ggaggatagc cttctttgta ccgggtttca tgcatgtcat catggggatc      720
cttgctctaa ctctaggcca ggacttgctt gatggaaacc ttgcggcctt gcagaagaag      780
ggatgatgtg caaaagacaa gttttccaag gtgctatggt atgccataac aaattacagg      840
acatggattt ttgccctcct ctatgggtac tcaatgggag ttgaattgac aactgacaat      900
gtcattgctg agtatttcta tgacagggtt aatctgaagc tgcacactgc tggaatcatt      960
gctgcttcat ttggaatggc aaacttagtt gctcgaccct ttggtggata tgcttctgat      1020
gttgacagca gattgtttgg catgagggga agactctgga ccctttggat cctccaaaca      1080
ttaggagggg ttttctgtat ttgcttggc cgagccaatt ctcttctat tgctattttg      1140
gctatgatcc tgttctcttt aggagctcaa gctgcatgtg gtgcaacttt tggcatcatt      1200
cccttcatct caagaaggtc attggggatc atatcaggtc tcaactggtg aggtgggaac      1260
tttgggtctg gcctcaccac attggtcttc ttttcaacat ccaaattctc cactgccaca      1320
ggctctctct tgatgggtgt gatgatagtg gcttgactc ttctgtgag tgttgttcat      1380
tttccacagt ggggtagcat gttcctacca ccatcaaaag atgtcaacaa atccactgaa      1440
gaattctatt acacctctga atggaatgag gaagagaggc agaaaggctt gcatcagcaa      1500
agtctcaagt ttgctgagaa tagccgatcc gagagaggaa agcgagtggc ttcagcacca      1560

```

acacctccga atgcaactcc cactcatgtc

1590

<210> 11
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Соя

<220>
 <223> амінокислотна послідовність сої - OsNRT2.3b відповідний ген

<400> 11

Met Ala Glu Ile Glu Gly Ser Pro Gly Ser Ser Met His Gly Val Thr
 1 5 10 15

Gly Arg Glu Gln Thr Phe Val Ala Ser Ile Ala Ser Pro Ile Val Pro
 20 25 30

Thr Asp Thr Thr Ala Lys Phe Ala Leu Pro Val Asp Ser Glu His Lys
 35 40 45

Ala Lys Ile Phe Lys Leu Phe Ser Met Ala Asn Pro His Met Arg Thr
 50 55 60

Phe His Leu Ser Trp Ile Ser Phe Phe Thr Cys Phe Val Ser Thr Phe
 65 70 75 80

Ala Ala Ala Pro Leu Val Pro Ile Ile Arg Asp Asn Leu Asn Leu Thr
 85 90 95

Lys Ser Asp Ile Gly Asn Ala Gly Val Ala Ser Val Ser Gly Ser Ile
 100 105 110

Phe Ser Arg Leu Ala Met Gly Ala Val Cys Asp Leu Leu Gly Pro Arg
 115 120 125

Tyr Gly Cys Ala Phe Leu Ile Met Leu Ser Ala Pro Thr Val Phe Cys
 130 135 140

Met Ser Phe Val Lys Asp Ala Ala Gly Tyr Ile Met Val Arg Phe Leu
 145 150 155 160

Ile Gly Phe Ser Leu Ala Thr Phe Val Ser Cys Gln Tyr Trp Met Ser
 165 170 175

Thr Met Phe Asn Ser Lys Ile Ile Gly Leu Ala Asn Gly Thr Ala Ala
 180 185 190

Gly Trp Gly Asn Met Gly Gly Gly Ala Thr Gln Leu Ile Met Pro Leu
195 200 205

Val Tyr Glu Leu Ile Arg Arg Ala Gly Ala Thr Pro Phe Thr Ala Trp
210 215 220

Arg Ile Ala Phe Phe Val Pro Gly Phe Met His Val Ile Met Gly Ile
225 230 235 240

Leu Val Leu Thr Leu Gly Gln Asp Leu Pro Asp Gly Asn Leu Ala Ala
245 250 255

Leu Gln Lys Lys Gly Asp Val Ala Lys Asp Lys Phe Ser Lys Val Leu
260 265 270

Trp Tyr Ala Ile Thr Asn Tyr Arg Thr Trp Ile Phe Ala Leu Leu Tyr
275 280 285

Gly Tyr Ser Met Gly Val Glu Leu Thr Thr Asp Asn Val Ile Ala Glu
290 295 300

Tyr Phe Tyr Asp Arg Phe Asn Leu Lys Leu His Thr Ala Gly Ile Ile
305 310 315 320

Ala Ala Ser Phe Gly Met Ala Asn Leu Val Ala Arg Pro Phe Gly Gly
325 330 335

Tyr Ala Ser Asp Val Ala Ala Arg Leu Phe Gly Met Arg Gly Arg Leu
340 345 350

Trp Thr Leu Trp Ile Leu Gln Thr Leu Gly Gly Val Phe Cys Ile Trp
355 360 365

Leu Gly Arg Ala Asn Ser Leu Pro Ile Ala Ile Leu Ala Met Ile Leu
370 375 380

Phe Ser Leu Gly Ala Gln Ala Ala Cys Gly Ala Thr Phe Gly Ile Ile
385 390 395 400

Pro Phe Ile Ser Arg Arg Ser Leu Gly Ile Ile Ser Gly Leu Thr Gly
405 410 415

Ala Gly Gly Asn Phe Gly Ser Gly Leu Thr Gln Leu Val Phe Phe Ser
420 425 430

Thr Ser Lys Phe Ser Thr Ala Thr Gly Leu Ser Leu Met Gly Val Met
435 440 445

Ile Val Ala Cys Thr Leu Pro Val Ser Val Val His Phe Pro Gln Trp
450 455 460

Gly Ser Met Phe Leu Pro Pro Ser Lys Asp Val Asn Lys Ser Thr Glu
465 470 475 480

Glu Phe Tyr Tyr Thr Ser Glu Trp Asn Glu Glu Glu Arg Gln Lys Gly
485 490 495

Leu His Gln Gln Ser Leu Lys Phe Ala Glu Asn Ser Arg Ser Glu Arg
500 505 510

Gly Lys Arg Val Ala Ser Ala Pro Thr Pro Pro Asn Ala Thr Pro Thr
515 520 525

His Val
530

<210> 12
<211> 1875
<212> ДНК
<213> Ячмінь звичайний

<220>
<223> послідовність нуклеїнової кислоти ячміню - OsNRT2.3b відповідний ген

<400> 12
ccacgcgtcc gctcattgca tacgaggttg ccaacactac acaggtgtag cagcagccaa 60
ggcagctggt gagatggagg gggagtccaa gccggcgccg atgggggtgc aggcggcgcc 120
caagggcaag ttcaggatac cgggtggactc ggacaacaag gccaccgagt tctggctttt 180
ctcgttcgtg aggccgcaca tgagcgcctt ccacctctcg tggttctcct tcttctgctg 240
cttcgtctcc accttcgccg cgcgcgccct cctgccgctc atccgggaca acctcggcct 300
cacgggcaag gacatcgga acgccggcat cgcgtccgtg tccggcgccg tggtcgcgcg 360
tctcgccatg ggcacggcct gcgacctggt cgggccccgc ctggcgctcc cggccatcat 420
actgctcacc acccccgcgg tgtactgctc cgccatcacc gagtccgcct cgtcgttcct 480
gctcgtgcgc ttcttcacgg gcttctcgtc cgcctccttc gtgtcgacgc agttctggat 540
gagctccatg ttctcttcgc ccaagggtgg gctggccaat ggcgtcgccg gcggtctggg 600

```

caacctgggc gggggcgccg tgcagctcct catgccgtc gtgttcgagg ccgtccgcaa 660
gatcggcagc acggatttca tcgcgtggcg cgtcgccctt tcatcccg gcgatcatgca 720
gacgtttctcg gccatcgccg tgcgtggcgtt cgggcaggac atgccggacg gcaactaccg 780
taagctgcac aagagcgggg agatgcacaa ggacagcttc ggcaacgtgc tgcgccacgc 840
ggtcacgaac taccgcgcct ggatcctggc gctcacctac ggctactcct tcggcgtgga 900
gctcgccgtg gacaacatcg tcgcgcagta cttctacgac cgcttcgacg tcaacctcca 960
cacggccggg ctcatcgccg ccagcttcgg gatggccaac atcatctccc gcccgggcgg 1020
cgggctcatg tccgactggc tctccgaccg gttcggcatg cgcggcaggc tgtgggggct 1080
gtgggtcgtg cagaccatcg gcggcatcct ctgcatcgtg ctcggcacg tcgactactc 1140
gttcggcgcg tcggtggccg tcatgatcct cttctccttc ttcgtgcagg cggcgtgcgg 1200
gctcacgttc ggcatcgtgc cgttcgtgtc gcggaggctg ctggggctca tctccggaat 1260
gaccggccgc ggcggcaacg tgggggccgt gctgacgcag gtcattctct tccgcggcac 1320
caagtacaag acggagacgg ggatcatgta catggggctg atgatcctgg catgcacgct 1380
gccatcacg ctcatctact tcccgagtg gggcggcatg ttcgtcgggc cgcggaaagg 1440
ggcgacggcg gaggagtact acagcaagga gtggaccgag gaggagcgtg ccaaggggta 1500
cagcgccgcg accgagcgtt tcgcgagaa cagcgtgcgc gagggcgggc ggagggcggc 1560
gtcgggcagc cagtcaaggc acaccgtccc cgtcgacggc tcgccggccg acgtgtgagg 1620
tccgaagagc tcccgtact acgtggtcca cgggtgcaat gggggaatac gatcgcgctg 1680
cacggccgcc cgggtttggg ccgtcttcg tgcacatacg tagtactacg aacgcacgca 1740
cgcacgccgg ctttgtgtg cttctagtag tgtacgtacg tttgggttg gtgtgctcgc 1800
ttaccttaat actgctccgc atgttgatgt ttatatgctc ccttgtgaaa tacagtttta 1860
aaaaaaaaaaaa 1875

```

```

<210> 13
<211> 514
<212> PRT
<213> Ячмінь звичайний

```

```

<220>
<223> амінокислотна послідовність ячміню - OsNRT2.3b відповідний ген
<400> 13

```

```

Met Glu Gly Glu Ser Lys Pro Ala Ala Met Gly Val Gln Ala Ala Pro
1           5           10           15

```

```

Lys Gly Lys Phe Arg Ile Pro Val Asp Ser Asp Asn Lys Ala Thr Glu

```


			20						25						30			
Phe	Trp	Leu	Phe	Ser	Phe	Val	Arg	Pro	His	Met	Ser	Ala	Phe	His	Leu			
		35					40					45						
Ser	Trp	Phe	Ser	Phe	Phe	Cys	Cys	Phe	Val	Ser	Thr	Phe	Ala	Ala	Pro			
	50					55					60							
Pro	Leu	Leu	Pro	Leu	Ile	Arg	Asp	Asn	Leu	Gly	Leu	Thr	Gly	Lys	Asp			
65					70					75					80			
Ile	Gly	Asn	Ala	Gly	Ile	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ala	Val	Phe	Ala	Arg			
				85					90					95				
Leu	Ala	Met	Gly	Thr	Ala	Cys	Asp	Leu	Val	Gly	Pro	Arg	Leu	Ala	Ser			
			100					105					110					
Ala	Ala	Ile	Ile	Leu	Leu	Thr	Thr	Pro	Ala	Val	Tyr	Cys	Ser	Ala	Ile			
		115					120					125						
Ile	Glu	Ser	Ala	Ser	Ser	Phe	Leu	Leu	Val	Arg	Phe	Phe	Thr	Gly	Phe			
	130					135					140							
Ser	Leu	Ala	Ser	Phe	Val	Ser	Thr	Gln	Phe	Trp	Met	Ser	Ser	Met	Phe			
145					150					155					160			
Ser	Ser	Pro	Lys	Val	Gly	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Ala	Gly	Gly	Trp	Gly			
				165					170					175				
Asn	Leu	Gly	Gly	Gly	Ala	Val	Gln	Leu	Leu	Met	Pro	Leu	Val	Phe	Glu			
			180					185					190					
Ala	Val	Arg	Lys	Ile	Gly	Ser	Thr	Asp	Phe	Ile	Ala	Trp	Arg	Val	Ala			
		195					200					205						
Phe	Phe	Ile	Pro	Gly	Val	Met	Gln	Thr	Phe	Ser	Ala	Ile	Ala	Val	Leu			
	210					215					220							
Ala	Phe	Gly	Gln	Asp	Met	Pro	Asp	Gly	Asn	Tyr	Arg	Lys	Leu	His	Lys			
225					230					235					240			
Ser	Gly	Glu	Met	His	Lys	Asp	Ser	Phe	Gly	Asn	Val	Leu	Arg	His	Ala			
				245					250					255				
Val	Thr	Asn	Tyr	Arg	Ala	Trp	Ile	Leu	Ala	Leu	Thr	Tyr	Gly	Tyr	Ser			

260	265	270
Phe Gly Val Glu Leu Ala Val	Asp Asn Ile Val Ala Gln Tyr Phe Tyr	
275	280	285
Asp Arg Phe Asp Val Asn Leu His Thr Ala Gly Leu Ile Ala Ala Ser		
290	295	300
Phe Gly Met Ala Asn Ile Ile Ser Arg Pro Gly Gly Gly Leu Met Ser		
305	310	315
Asp Trp Leu Ser Asp Arg Phe Gly Met Arg Gly Arg Leu Trp Gly Leu		
325	330	335
Trp Val Val Gln Thr Ile Gly Gly Ile Leu Cys Ile Val Leu Gly Ile		
340	345	350
Val Asp Tyr Ser Phe Gly Ala Ser Val Ala Val Met Ile Leu Phe Ser		
355	360	365
Phe Phe Val Gln Ala Ala Cys Gly Leu Thr Phe Gly Ile Val Pro Phe		
370	375	380
Val Ser Arg Arg Ser Leu Gly Leu Ile Ser Gly Met Thr Gly Gly Gly		
385	390	395
Gly Asn Val Gly Ala Val Leu Thr Gln Val Ile Phe Phe Arg Gly Thr		
405	410	415
Lys Tyr Lys Thr Glu Thr Gly Ile Met Tyr Met Gly Leu Met Ile Leu		
420	425	430
Ala Cys Thr Leu Pro Ile Thr Leu Ile Tyr Phe Pro Gln Trp Gly Gly		
435	440	445
Met Phe Val Gly Pro Arg Lys Gly Ala Thr Ala Glu Glu Tyr Tyr Ser		
450	455	460
Lys Glu Trp Thr Glu Glu Glu Arg Ala Lys Gly Tyr Ser Ala Ala Thr		
465	470	475
Glu Arg Phe Ala Glu Asn Ser Val Arg Glu Gly Gly Arg Arg Ala Ala		
485	490	495
Ser Gly Ser Gln Ser Arg His Thr Val Pro Val Asp Gly Ser Pro Ala		

500

505

510

Asp Val

<210> 14
 <211> 1900
 <212> ДНК
 <213> *Brachypodium distachyon*

<220>
 <223> послідовність нуклеїнової кислоти пурпурної коротконожки -
 OsNRT2.3b відповідний ген

<400> 14
 atgggggggg agtcgaagcc ggcggcgatg gatgtggagg cgccgtccaa ggcgaagttc 60
 aggatccccg tggactccga caacaaggcg acggagttct ggctcttctc cttcgcgcgg 120
 ccgcacatga gcgcgttcca cctgtcgtgg ttctccttct tctgtgtctt cgtgtccacc 180
 ttcgcgcgcg cgccgctgct gccgctcatc cgggacaatc tggggctcac ggcgaaggac 240
 atcggcaacg ccgggatcgc gtcgggtgctg ggcgcctgtg tcgcgcgtct cgccatgggc 300
 acggcctgcg acctggtcgg ccccgctg gcgtccgcgg ccatacact gctcaccacc 360
 ccggcgggtg actgctcggc catcatcgac tcggcgtcgt cgttctgct cgtgcgcttc 420
 ttcaagggtt tctccctggc ctcttcgtg tccacgcagt tctggatgag ctccatgttc 480
 tcctcgccca aggtgggtct ggccaacggc gtggccgggg gctggggcaa cctcggcggc 540
 ggcgcctgac agctgatcat gccgctggtg ttcgaggctg tgcgcaagat cgggagcacg 600
 cgtttcacgg cgtggcgcgt ggccttcttc atcccgggcg tcatgcagac gttctcggcc 660
 atcgcctgac tggcgttcgg gcaggacatg ccggacggca actaccacaa gctgcacaag 720
 accggggaga tgcacaggga cagcttccgc aacgtgctgc gccacgcggt caccaactac 780
 cgcgcctgga tcctggcgct cacctacggc tactgcttcg gcgtggagct cgccgtggac 840
 aacatcgtgg cgcagtactt ctacgaccgc ttcggcgtca acctccacac ggcggggctc 900
 atgcgcccca gcttcgggat ggccaacatc gtctcgcgcc cgggcggcgg gctcatgtcc 960
 gactggctct cggcccggtt cggcatgcgc ggcaggctgt ggggcctgtg ggtcgtgcag 1020
 accatcggcg gcgtcctctg cgtggtgctc ggcgtggtgg actactcctt cggcgcgtcc 1080
 gtggcagtcg tgatactctt ctccctgttc gtgcaggccg cgtgcgggct caccttcggc 1140
 atcgtgccgt tcgtgtcgcg gaggtcgtg gggctcatct ctggcatgac cggcggcggg 1200
 ggaaatgtgg gcgcgtgct gacgcaggtc atcttcttcc acgggtccag gtacaagacg 1260
 gagacgggga tcatgtacat gggggtcatg atcatcgcgt gcacgctgcc catcacgctc 1320

```

atctactttcc cgcagtgagg cggcatgttc accggggccgc ggccgggggc caccgaggag 1380
gagtattaca gctcggagtg gaccgaggag gagcgggaaga aagggtacaa cgccgcgaca 1440
gagcgttttcg cggagaacag cctgcgcgag ggagggcgga ggccgcgctc gggcagccag 1500
tccaagcata ccgtcccctt ggacggatca ccgcccggccg acgtgtgaag aaaatcccat 1560
agaccatagt gtacgttttcg tatgtctcgc gtcataacg agtcatacgg tcgccacggg 1620
cgccggtctg gttacgtgag ttggcttttt tatgtgttgt accttttggc ttttggtgct 1680
cctttgtctt gttgctgtaa aagggtgtca aatactccac ttttcttttc cgcagacgtg 1740
aaatacttct gtaggtgtac gtcactgaaa ggaaactgtt catatggcat ccacatacaa 1800
aaccatgttt tcttatattg ctagtatatt cgtttttctt atttcgacga aactagcatt 1860
ccgcgtctat tattattcgt aagatacttc cgatcgaaaa 1900

```

```

<210> 15
<211> 515
<212> PRT
<213> Brachypodium distachyon

```

```

<220>
<223> амінокислотна послідовність пурпурної коротконожки - OsNRT2.3b
відповідний ген

```

```

<400> 15

```

```

Met Gly Gly Glu Ser Lys Pro Ala Ala Met Asp Val Glu Ala Pro Ser
1           5           10           15

```

```

Lys Ala Lys Phe Arg Ile Pro Val Asp Ser Asp Asn Lys Ala Thr Glu
20           25           30

```

```

Phe Trp Leu Phe Ser Phe Ala Arg Pro His Met Ser Ala Phe His Leu
35           40           45

```

```

Ser Trp Phe Ser Phe Phe Cys Cys Phe Val Ser Thr Phe Ala Ala Pro
50           55           60

```

```

Pro Leu Leu Pro Leu Ile Arg Asp Asn Leu Gly Leu Thr Ala Lys Asp
65           70           75           80

```

```

Ile Gly Asn Ala Gly Ile Ala Ser Val Ser Gly Ala Val Phe Ala Arg
85           90           95

```

```

Leu Ala Met Gly Thr Ala Cys Asp Leu Val Gly Pro Arg Leu Ala Ser
100          105          110

```

Ala Ala Ile Ile Leu Leu Thr Thr Pro Ala Val Tyr Cys Ser Ala Ile
115 120 125

Ile Asp Ser Ala Ser Ser Phe Leu Leu Val Arg Phe Phe Thr Gly Phe
130 135 140

Ser Leu Ala Ser Phe Val Ser Thr Gln Phe Trp Met Ser Ser Met Phe
145 150 155 160

Ser Ser Pro Lys Val Gly Leu Ala Asn Gly Val Ala Gly Gly Trp Gly
165 170 175

Asn Leu Gly Gly Gly Ala Val Gln Leu Ile Met Pro Leu Val Phe Glu
180 185 190

Val Val Arg Lys Ile Gly Ser Thr Arg Phe Thr Ala Trp Arg Val Ala
195 200 205

Phe Phe Ile Pro Gly Val Met Gln Thr Phe Ser Ala Ile Ala Val Leu
210 215 220

Ala Phe Gly Gln Asp Met Pro Asp Gly Asn Tyr His Lys Leu His Lys
225 230 235 240

Thr Gly Glu Met His Arg Asp Ser Phe Arg Asn Val Leu Arg His Ala
245 250 255

Val Thr Asn Tyr Arg Ala Trp Ile Leu Ala Leu Thr Tyr Gly Tyr Cys
260 265 270

Phe Gly Val Glu Leu Ala Val Asp Asn Ile Val Ala Gln Tyr Phe Tyr
275 280 285

Asp Arg Phe Gly Val Asn Leu His Thr Ala Gly Leu Ile Ala Ala Ser
290 295 300

Phe Gly Met Ala Asn Ile Val Ser Arg Pro Gly Gly Gly Leu Met Ser
305 310 315 320

Asp Trp Leu Ser Ala Arg Phe Gly Met Arg Gly Arg Leu Trp Gly Leu
325 330 335

Trp Val Val Gln Thr Ile Gly Gly Val Leu Cys Val Val Leu Gly Val
340 345 350

Val Asp Tyr Ser Phe Gly Ala Ser Val Ala Val Met Ile Leu Phe Ser
355 360 365

Leu Phe Val Gln Ala Ala Cys Gly Leu Thr Phe Gly Ile Val Pro Phe
370 375 380

Val Ser Arg Arg Ser Leu Gly Leu Ile Ser Gly Met Thr Gly Gly Gly
385 390 395 400

Gly Asn Val Gly Ala Val Leu Thr Gln Val Ile Phe Phe His Gly Ser
405 410 415

Arg Tyr Lys Thr Glu Thr Gly Ile Met Tyr Met Gly Val Met Ile Ile
420 425 430

Ala Cys Thr Leu Pro Ile Thr Leu Ile Tyr Phe Pro Gln Trp Gly Gly
435 440 445

Met Phe Thr Gly Pro Arg Pro Gly Ala Thr Ala Glu Glu Tyr Tyr Ser
450 455 460

Ser Glu Trp Thr Glu Glu Glu Arg Lys Lys Gly Tyr Asn Ala Ala Thr
465 470 475 480

Glu Arg Phe Ala Glu Asn Ser Leu Arg Glu Gly Gly Arg Arg Ala Ala
485 490 495

Ser Gly Ser Gln Ser Lys His Thr Val Pro Val Asp Gly Ser Pro Pro
500 505 510

Ala Asp Val
515

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<220>
<223> рН Чутливий мотив

<400> 16

Val Tyr Glu Ala Ile His Lys Ile
1 5

<210> 17

<211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна

 <220>
 <223> Прямий праймер

 <400> 17
 ggaattctca caccscggcc gg 22

 <210> 18
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Штучна

 <220>
 <223> Зворотний праймер

 <400> 18
 cgggatccat gtggggcggc atgctc 26

 <210> 19
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна

 <220>
 <223> РНК in situ гібридизаційний зонд - смислова послідовність

 <400> 19
 cgatggttgg gtgcggcgag a 21

 <210> 20
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна

 <220>
 <223> РНК in situ гібридизаційний зонд - попсмилова послідовність

 <400> 20
 gctaccaacc caccscgctc t 21

 <210> 21
 <211> 13
 <212> ДНК
 <213> Штучна

 <220>
 <223> RT-PCR Прямий праймер - OsNRT2.3b (AK072215)

 <400> 21
 cgttcgccgt gtt 13

 <210> 22

```

<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> RT-PCR Зворотний праймер - OsNRT2.3b (AK072215)

<400> 22
tcgaagcggg cgtagaag 18

<210> 23
<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> RT-PCR Прямий праймер - Actin

<400> 23
ttatggttgg gatgggaca 19

<210> 24
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> RT-PCR Зворотний праймер - Actin

<400> 24
agcacggcctt gaatagcg 18

<210> 25
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Прямий праймер з використанням конструктив надекспресії (Вектор:
rSAMBIA1302)

<400> 25
atccatggag atctcagggc acagcggatg 30

<210> 26
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Зворотний праймер з використанням конструктив надекспресії
(Вектор:
rSAMBIA1302)

<400> 26
atccatggag atctacaccc cggccgg 27

```


<210> 27
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Прямий праймер для конструкта надекспресії (Вектор: рТСК303)

<400> 27
 саастаgтgс taccacgtgt tggagatg 28

<210> 28
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Зворотний праймер для конструкта надекспресії (Вектор: рТСК303)

<400> 28
 гаастаgтgа gсааассасс аасааgс 27

<210> 29
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Прямий субклонуючий праймер

<400> 29
 аатсagатсt ttggagctcc accgc 25

<210> 30
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Зворотний субклонуючий праймер

<400> 30
 сагаастаgт cccccctcg aagg 24

<210> 31
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Мутагенний праймер для мутації H167R-F

<400> 31
 gccattcgaa agatcggtag cacgc 25

```

<210> 32
<211> 25
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Вихідна послідовність

<400> 32
gccatccaca agatcggtag cacgc 25

<210> 33
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Мутагенний праймер для мутації H167R-R

<400> 33
gcattctaga ttcgaatggc ctcgtacacg 30

<210> 34
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Мутагенний праймер для мутації 67RB-R

<400> 34
gcattctaga ttcgaatggc ctcgtacacg 30

<210> 35
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Прямий РЧ-ПЛР праймер для OsNRT2.3a (AK072215)

<400> 35
gctcatccgc gacaccct 18

<210> 36
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Зворотний РЧ-ПЛР праймер для OsNRT2.3a (AK072215)

<400> 36
gtcgaagcgg tcgtagaa 18

```

```

<210> 37
<211> 13
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Прямий РЧ-ПЛР праймер для OsNRT2.3b (AK072215)

<400> 37
cgttcgccgt gtt                                     13

<210> 38
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Прямий РЧ-ПЛР праймер для OsNRT2.3b (AK072215)

<400> 38
tcgaagcggg cgtagaag                                18

<210> 39
<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Прямий РЧ-ПЛР праймер для OsActin (NM_197297)

<400> 39
ttatggttgg gatgggaca                                19

<210> 40
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Зворотний РЧ-ПЛР праймер для OsActin (NM_197297)

<400> 40
agcacggcctt gaatagcg                                18

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 41

Phe Phe Val Gly Phe Ser Leu Ala Asn Phe
1                               5                               10

```

<210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 42

Glu Ile Leu Ile Gly Gly Leu Gly Asn
 1 5

<210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis lyrata

<400> 43

Phe Phe Val Gly Phe Ser Leu Ala Asn Phe
 1 5 10

<210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis lyrata

<400> 44

Glu Ile Leu Ile Gly Gly Leu Gly Asn
 1 5

<210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Capsella rubella

<400> 45

Phe Phe Val Gly Phe Ser Leu Ala Asn Phe
 1 5 10

<210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Capsella rubella

<400> 46

Glu Ile Leu Ile Gly Gly Leu Gly Asn
 1 5

<210> 47
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Capsella rubella

<400> 47

Phe Ser Val Ala Ser Pro Ile
1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Capsella rubella

<400> 48

Leu Trp Ile Ile Gln Thr Ala Gly Gly
1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Populus trichocarpa

<220>

<221> MiscFeature

<222> (1)..(7)

<223> Potri.009G008500

<400> 49

Phe Ser Val Ala Ser Pro Ile
1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Populus trichocarpa

<220>

<221> MiscFeature

<222> (1)..(9)

<223> Potri.009G008500

<400> 50

Leu Trp Ile Ile Gln Thr Ala Gly Gly
1 5

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Populus trichocarpa

<220>

<221> MiscFeature

<222> (1)..(7)

<223> Potri.009G008600

<400> 51

Phe Ser Val Ala Ser Pro Ile
1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Populus trichocarpa

<220>

<221> MiscFeature

<222> (1)..(9)

<223> Potri.009G008600

<400> 52

Leu Trp Ile Ile Gln Thr Ala Gly Gly
1 5

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Cucumis sativus

<400> 53

Trp Arg Ile Ala Phe Phe Val Pro Gly Phe
1 5 10

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Cucumis sativus

<400> 54

Leu Trp Ile Leu Gln Thr Leu Gly Gly Val Phe
1 5 10

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Malus domestica

<400> 55

Phe Ser Val Ala Ser Pro Ile
1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT
<213> Malus domestica

<400> 56

Leu Trp Ile Ile Gln Thr Ala Gly Gly
1 5

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Prunus persica

<400> 57

Phe Ser Val Ala Ser Pro Ile
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> Prunus persica

<400> 58

Leu Trp Ile Ile Gln Thr Ala Gly Gly
1 5

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> Соя

<220>
<221> MiscFeature
<222> (1)..(10)
<223> Glyma13g39850

<400> 59

Trp Arg Ile Ala Phe Phe Val Pro Gly Phe
1 5 10

<210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> Соя

<220>
<221> MiscFeature
<222> (1)..(11)
<223> Glyma13g39850

<400> 60

Leu Trp Ile Leu Gln Thr Leu Gly Gly Val Phe
1 5 10

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> Coa

<220>
<221> MiscFeature
<222> (1)..(10)
<223> Glyma12g30050

<400> 61

Trp Arg Ile Ala Phe Phe Val Pro Gly Phe
1 5 10

<210> 62
<211> 11
<212> PRT
<213> Coa

<220>
<221> MiscFeature
<222> (1)..(11)
<223> Glyma12g30050

<400> 62

Leu Trp Ile Leu Gln Thr Leu Gly Gly Val Phe
1 5 10

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> Brachypodium distachyon

<400> 63

Phe Phe Ile Pro Gly Val Met Gln Thr Phe
1 5 10

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Brachypodium distachyon

<400> 64

Leu Trp Val Val Gln Thr Ile Gly Gly
1 5

<210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Ячмінь звичайний

<400> 65

Phe Phe Ile Pro Gly Val Met Gln Thr Phe
 1 5 10

<210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Ячмінь звичайний

<400> 66

Leu Trp Val Val Gln Thr Ile Gly Gly
 1 5

<210> 67
 <211> 2000
 <212> ДНК
 <213> Oryza sativa

<400> 67

gagcgccggc ctcccaccgg tcgcgtaaga tcacgccga aatctttatt cattttctct
 60

ccaccggttg ccctctcgcc gcacccaacc atcgcgccac gccgcggcgc gctgcccggag
 120

ccgcgctttc cgctatgcta taagagctga cgcgcagggc acagcggatg tacgtacaca
 180

cagtcactag ctaagctgct agccttgcta ccacgtgttg gagatggagg ctaagccggt
 240

ggcgatggag gtggaggggg tcgaggcggc ggggggcaag ccgcggttca ggatgccggt
 300

ggactccgac ctcaaggcga cggagttctg gctcttctcc ttcgcgaggc cacacatggc
 360

ctccttccac atggcggtgt tctccttctt ctgctgcttc gtgtccacgt tcgccgtgtt
 420

cgcgcgtctg gccatgggca cggcgtgcga cctggtcggg ccagggctgg cctccgcgtc
 480

tctgatcctc ctaccacac cggcgggtgta ctgctcctcc atcatccagt ccccgctcggg
 540

gtacctcctc gtgcgcttct tcacgggcat ctgcgtggcg tcgttcgtgt cggcgcagtt
 600

ctggatgagc tccatgttct cggcccccaa agtggggctg gccaacggcg tggcggcgcg
660

ctggggcaac ctggcgggcg gcgccgtcca gctgctcatg ccgctcgtgt acgaggccat
720

ccacaagatc ggtagcacgc cgttcacggc gtggcgcacg gccttcttca tcccgggcct
780

gatgcagacg ttctcggcca tcgccgtgct ggcgttcggg caggacatgc ccggcggcaa
840

ctacgggaag ctccacaaga ctggcgacat gcacaaggac agcttcggca acgtgctgcg
900

ccacgccctc accaactacc gcggctggat cctggcgctc acctacggct acagcttcgg
960

cgtcagctc accatcgaca acgtcgtgca ccagtacttc tacgaccgct tcgacgtcaa
1020

cctccagacc gccgggctca tcgcccag cttcgggatg gccaacatca tctcccgcc
1080

cggcggcggg ctactctcgg actggctctc cagccggtag ggcctgcg cgaggctgtg
1140

ggggctgtgg actgtgcaga ccatcggcgg cgtcctctgc gtgggtgctcg gaatcgtcga
1200

cttctccttc gccgcgtcgg tcgccgtgat ggtgctcttc tcttcttcg tccaggcgcg
1260

gtgcgggctc accttcggca tcgtgccgtt cgtgtcgcgg aggtcgtg ggctcatctc
1320

cgggatgacc ggccggcggg gcaacgtggg cgcctgctg acgcagtaca tcttcttcca
1380

cggcacaag tacaagacgg agaccgggat caagtacatg gggctcatga tcatcgctg
1440

cacgtgccc gtcctgctca tctacttccc gcagtggggc ggcctgctcg taggcccag
1500

gaagggggcc acggcgagg agtactacag ccgggagtgg tcggatcacg agcgcgagaa
1560

gggtttcaac gcggccagcg tcgggttcgc ggagaacagc gtgcgcgagg gcgggaggtc
1620

gtcggcgaat ggccgacagc ccaggcacac cgtccccgtc gacgcgtcgc cggccggggt
1680

gtgaagaatg ccacggacaa taaggctcgc gttgtagtac aactgtacaa attgatggta
1740

cgtgtcgttt gaccgcgcgc gcgcacagtg tgggtcgtgg cctcgtgggc ttagtgaggt
1800

acagtgaggg gtgtacgtgt gtcgtggcgc gcgcggtcac ctcggtggcc ttgggattgg
1860

gggggcacta tacgctagta ctccagatat atacgggttt gatttacttc tgtggatcgg
1920

cgcttggttg tggtttgctc cctgtgggtt ttgtgatggg aatcatactc atactcaaac
1980

agtcaaaact ttttgatgcg
2000

<210> 68
<211> 1893
<212> ДНК
<213> *Oryza sativa*

<400> 68
agtcactagc taagctgcta gccttgctac cacgtgttgg agatggaggc taagccggtg
60

gcgatggagg tggagggggg cgaggcggcg gggggcaagc cgcggttcag gatgccggtg
120

gactccgacc tcaaggcgac ggagttcttg ctcttctctt tcgcgaggcc acacatggcc
180

tccttcacaa tggcgtgggt ctcttcttct tgetgcttcg tgtccacgtt cgccgcgcgc
240

ccgctgctgc cgctcatccg cgacaccctc gggctcacgg ccacggacat cggcaacgcc
300

gggatcgcggt ccgtgtcggg cgccgtgttc gcgcgtcttg ccatgggcac ggctgtcgac
360

ctggtcgggc ccaggctggc ctccgcgtct ctgatcctcc tcaccacacc ggcggtgtac
420

tgtctctcca tcatccagtc ccgctcgggg tacctcctcg tgcgcttctt caccgggcatc
480

tcgctggcgt cgttcgtgtc ggcgcagttc tggatgagct ccatgttctc ggccccaaa
540

gtggggctgg ccaacggcgt ggccggcggc tggggcaacc tcggcggcgg cgccgtccag
600

ctgctcatgc cgctcgtgta cgaggccatc cacaagatcg gtagcacgcc gttcacggcg
660

tggcgcatcg ctttcttcat cccgggcctg atgcagacgt tctcggccat cgcggtgctg
720

gcgttcgggc aggacatgcc cggcggcaac tacgggaagc tccacaagac tggcgacatg
780

cacaaggaca gcttcggcaa cgtgctgcgc cagccctca ccaactaccg cggtggatc
840

ctggcgctca cctacggcta cagcttcggc gtcgagctca ccatcgacaa cgtcgtgcac
900

cagtacttct acgaccgctt cgacgtcaac ctccagaccg ccggggtcat cgcgcgcagc
960

ttcgggatgg ccaacatcat ctcccgcccc ggcggggggc tactctccga ctggctctcc
1020

agccgggtacg gcatgcgcgg caggctgtgg gggctgtgga ctgtgcagac catcgggcggc
1080

gtcctctgcg tgggtgctcg aatcgctgac ttctccttcg ccgcgtccgt cgcctgatg
1140

gtgctcttct ccttcttcgt ccaggccgcy tgcgggctca ccttcggcat cgtgccgttc
1200

gtgtcgcgga ggtcgctggg gctcatctcc gggatgaccg gcggcggggg caacgtgggc
1260

gccgtgctga cgcagtacat cttcttcac gccacaaagt acaagacgga gaccgggac
1320

aagtacatgg ggctcatgat catcgctgc acgtgcccg tcctgctcat ctacttccc
1380

cagtggggcg gcatgctcgt agggccgagg aagggggcca cggcgaggga gtactacagc
1440

cgggagtggc cggatcacga gcgcgagaag ggtttcaacg cggccagcgt gcggttcgcy
1500

gagaacagcy tgcgcgaggg cgggaggtcg tcggcgaatg gcggacagcc caggcacacc
1560

gtccccgtcg acgcgtcgcc ggccgggggtg tgaagaatgc cacggacaat aaggtcgcy
1620

ttgtagtaca actgtacaaa ttgatggtag gtgtcgtttg accgcgcgcg cgcacagtgt
1680

gggtcggtgc ctggtgggt tagtgagta cagtgagggg tgtacgtgtg tcgtggcgcy
1740

cgcggtcacc tcggtggcct tgggattggg ggggcactat acgctagtag tccagatata
1800

tacgggttg atttacttct gtggatcgcy gcttggtggg ggttgctcc ctgtgggttt
1860

tgtgatgga atcatactca tactcaaaca gtc
1893

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб підвищення росту, врожайності, коефіцієнта застосування азоту, транспорту азоту, стійкості до стресу азоту, стійкості до патогену, виживаності та/або поглинання азоту рослиною, за яким вводять та експресують конструкт нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, як визначено в SEQ ID NO: 3, її функціональний варіант або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, де, якщо
- 10 послідовність нуклеїнової кислоти кодує поліпептид, як визначено в SEQ ID NO: 3, зазначена рослина не є рисом; де зазначений функціональний варіант або гомолог:
 - а) має цитозольний pH чутливий мотив VYEAIHKI (SEQ ID NO: 16); або

b) має щонайменше 85 % ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 3; або

c) вибирається із послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, як визначено у SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 і 15, або амінокислотної послідовності з щонайменше 90 % ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 або 15.

5 2. Спосіб за пунктом 1, в якому зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний або сильний промотор, що спрямовує надекспресію зазначеної нуклеїнової кислоти.

3. Спосіб за пунктом 2, в якому зазначений конститутивний або сильний промотор вибирають з CaMV-35S, CaMV-35Somega, убіквітину арабідопсису UBQ1.

10 4. Спосіб за пунктом 1, в якому зазначена регуляторна послідовність являє собою специфічний промотор флоєми.

5. Спосіб за пунктом 4, в якому зазначений специфічний промотор флоєми містить нуклеїнову кислоту, яка включає SEQ ID NO: 5.

15 6. Спосіб одержання трансгенної рослини, яка має підвищений ріст, врожайність, транспорт азоту, поглинання азоту, стійкість до стресу азоту та/або коефіцієнт застосування азоту, за яким:

вводять та експресують в рослині або рослинній клітині конструкт нуклеїнової кислоти, який містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, як визначено в SEQ ID NO: 3, її функціональний варіант або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю де, якщо послідовність нуклеїнової кислоти кодує поліпептид, як визначено в SEQ ID NO: 3, зазначена рослина не є рисом; де зазначений функціональний варіант або гомолог:

a) має цитозольний pH чутливий мотив VYEAIHKI (SEQ ID NO: 16); або

b) має щонайменше 85% ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 3; або

25 c) вибирається із послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, як визначено у SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 і 15, або амінокислотної послідовності з щонайменше 90 % ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 або 15.

7. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-6, в якому зазначена рослина являє собою сільськогосподарську культурну рослину або біопаливну рослину.

8. Спосіб за пунктом 7, в якому зазначену сільськогосподарську культурну рослину вибирають з кукурудзи, пшениці, тютюну, олійного рапсу, сорго, сої, картоплі, помідора, винограду, ячменю, гороху, квасолі, кормових бобів, салату, бавовнику, цукрової тростини, цукрового буряку, броколі або інших овочевих капуст, або тополі.

9. Рослина, одержана за способом, як визначено в будь-якому з пунктів 6-8.

35 10. Трансгенна рослина, яка експресує конструкт нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, як визначено в SEQ ID NO: 1, її функціональний варіант або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю, де, якщо послідовність нуклеїнової кислоти є такою, як визначено в SEQ ID NO: 1, зазначена рослина не є рисом; де зазначений функціональний варіант або гомолог:

a) має цитозольний pH чутливий мотив VYEAIHKI (SEQ ID NO: 16); або

40 b) має щонайменше 85% ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 1; або

c) вибраний з послідовності нуклеїнової кислоти, що містить SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12 і 14, або амінокислотної послідовності з щонайменше 90 % ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12 і 14.

45 11. Рослина за пунктом 9 або 10, в якій зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний або сильний промотор, який спрямовує надекспресію зазначеної нуклеїнової кислоти.

12. Рослина за пунктом 11, в якій зазначений конститутивний промотор або сильний вибирають з CaMV-35S, CaMV-35Somega, убіквітину арабідопсису UBQ1.

50 13. Рослина за будь-яким з пунктів 9 або 10, в якій зазначена регуляторна послідовність являє собою специфічний промотор флоєми.

14. Рослина за пунктом 13, в якій зазначений специфічний промотор флоєми містить нуклеїнову кислоту, яка включає SEQ ID NO: 5.

15. Рослина за будь-яким з пунктів 9-14, в якій зазначена рослина являє собою сільськогосподарську культурну рослину або біопаливну рослину.

55 16. Рослина за пунктом 15, в якій зазначену сільськогосподарську культурну рослину вибирають із кукурудзи, пшениці, олійного рапсу, тютюну, сорго, сої, картоплі, помідора, винограду, ячменю, гороху, квасолі, кормових бобів, салату, бавовнику, цукрової тростини, цукрового буряку, броколі або інших овочевих капуст, або тополі.

60 17. Спосіб регулювання pH гомеостазу, за яким вводять та експресують конструкт нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, як визначено у

SEQ ID NO: 3, її функціональний варіант або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині; де зазначений функціональний варіант або гомолог:

а) має цитозольний pH чутливий мотив VYEAIHKI (SEQ ID NO: 16); або

б) має щонайменше 85% ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 3; або

5 с) вибирається із послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, як визначено у SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 і 15, або амінокислотної послідовності з щонайменше 90 % ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 або 15.

18. Спосіб зниження кислотності в рослині, за яким вводять та експресують конструкт нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, як визначено у SEQ ID NO: 3, її функціональний варіант або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині; де зазначений функціональний варіант або гомолог:

а) має цитозольний pH чутливий мотив VYEAIHKI (SEQ ID NO: 16); або

б) має щонайменше 85% ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 3; або

15 с) вибраний із послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, як визначено у SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 і 15, або амінокислотної послідовності з щонайменше 90 % ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 або 15.

19. Спосіб зміни нітратного транспорту та pH гомеостазу в рослині, за яким вводять та експресують конструкт нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, як визначено у SEQ ID NO: 3, її функціональний варіант або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, в якій зазначена нуклеїнова кислота містить мутацію в pH чутливому мотиві VYEAIHKI (SEQ ID NO: 16), де зазначений функціональний варіант або гомолог

а) має цитозольний pH чутливий мотив VYEAIHKI (SEQ ID NO: 16); або

б) має щонайменше 85% ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 3; або

25 с) вибирається із послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, як визначено у SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 і 15, або амінокислотної послідовності з щонайменше 90 % ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 або 15.

20. Застосування нуклеїнової кислоти з гомологічністю до SEQ ID NO: 1, її функціонального варіанта або гомолога, що містить pH чутливий мотив VYEAIHKI (SEQ ID NO: 16), в регулюванні pH, в зміні нітратного транспорту та pH гомеостазу в рослині, де зазначений функціональний варіант або гомолог:

а) має цитозольний pH чутливий мотив VYEAIHKI (SEQ ID NO: 16); або

б) має щонайменше 85% ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 3; або

35 с) вибирається із послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, як визначено у SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 і 15, або амінокислотної послідовності з щонайменше 90 % ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 або 15.

21. Спосіб підвищення росту, врожайності, коефіцієнта застосування азоту, транспорту азоту, стійкості до патогену, виживаності, стійкості до стресу азоту та/або поглинання азоту рослини, за яким вводять та експресують конструкт нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, як визначено в SEQ ID NO: 3, її функціональний варіант або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, в якій зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний промотор або специфічний промотор флорми, в якій зазначена рослина не надекспресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID NO: 2; і де зазначений функціональний варіант або гомолог

а) має цитозольний pH чутливий мотив VYEAIHKI (SEQ ID NO: 16); або

б) має щонайменше 85% ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 3; або

45 с) вибирається із послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, як визначено у SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 і 15, або амінокислотної послідовності з щонайменше 90 % ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 або 15.

50 22. Спосіб одержання трансгенної рослини, яка має підвищений ріст, врожайність, транспорт азоту, поглинання азоту, стійкість до стресу азоту та/або коефіцієнт застосування азоту, за яким:

вводять та експресують в рослині або рослинній клітині конструкт нуклеїнової кислоти, який містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, як визначено в SEQ ID NO: 3, її функціональний варіант або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю, де зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний промотор або специфічний промотор флорми, де зазначена рослина не надекспресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID NO: 2; і де зазначений функціональний варіант або гомолог:

60 а) має цитозольний pH чутливий мотив VYEAIHKI (SEQ ID NO: 16); або

b) має щонайменше 85 % ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 3: або

c) вибирається із послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, як визначено у SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 і 15, або амінокислотної послідовності з щонайменше 90 % ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 або 15.

5 23. Спосіб за будь-яким з пунктів 21 або 22, в якому зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний або сильний промотор, що спрямовує надекспресію зазначеної нуклеїнової кислоти.

24. Спосіб за пунктом 23, в якому зазначений конститутивний або сильний промотор вибирають із CaMV-35S, CaMV-35Somega, убіквітину арабідопсису UBQ1.

10 25. Спосіб за будь-яким з пунктів 21 або 22, в якому зазначена регуляторна послідовність являє собою специфічний промотор флоеми.

26. Спосіб за пунктом 25, в якому зазначений специфічний промотор флоеми містить нуклеїнову кислоту, яка включає SEQ ID NO: 5.

15 27. Спосіб за будь-яким з пунктів 21-26, в якому зазначена рослина являє собою сільськогосподарську культурну рослину або біопаливну рослину.

28. Спосіб за пунктом 27, в якому зазначену сільськогосподарську культурну рослину вибирають із кукурудзи, рису, пшениці, олійного рапсу, тютюну, сорго, сої, картоплі, помідора, винограду, ячменю, гороху, квасолі, кормових бобів, салату, бавовнику, цукрової тростини, цукрового буряку, броколі або інших овочевих капуст, або тополі.

20 29. Спосіб за пунктом 28, в якому зазначена сільськогосподарська культурна рослина не є рисом.

30. Рослина, одержана або яку можуть одержувати за способом, як визначено в будь-якому з пунктів 21-29.

25 31. Трансгенна рослина, яка експресує конструкт нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, як визначено в SEQ ID NO: 1, її функціональний варіант або гомолог, функціонально зв'язаний з регуляторною послідовністю в рослині, де зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний промотор або специфічний промотор флоеми, де зазначена рослина не надекспресує послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID NO: 2, і де зазначений функціональний варіант або гомолог:

30 а) має цитозольний pH чутливий мотив VYEAIHKI (SEQ ID NO: 16); або

b) має щонайменше 85% ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 1: або

c) вибраний із SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12 і 14 або послідовності нуклеїнової кислоти з щонайменше 90 % ідентичності послідовностей з SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12 і 14.

35 32. Рослина за пунктом 30 або 31, де зазначена регуляторна послідовність являє собою конститутивний або сильний промотор, що спрямовує надекспресію зазначеної нуклеїнової кислоти.

33. Рослина за пунктом 32, в якій зазначений конститутивний промотор або сильний вибирають з CaMV-35S, CaMV-35Somega, убіквітину арабідопсису UBQ1.

40 34. Рослина за будь-яким з пунктів 30 або 31, в якій зазначена регуляторна послідовність являє собою специфічний промотор флоеми.

35. Рослина за пунктом 34, в якій зазначений специфічний промотор флоеми містить нуклеїнову кислоту, яка включає SEQ ID NO: 5.

36. Рослина за будь-яким з пунктів 31-35, де зазначена рослина являє собою сільськогосподарську культурну рослину або біопаливну рослину.

45 37. Рослина за пунктом 36, де зазначену сільськогосподарську культурну рослину вибирають із кукурудзи, рису, пшениці, олійного рапсу, сорго, сої, картоплі, помідора, винограду, ячменю, гороху, квасолі, кормових бобів, салату, бавовнику, цукрової тростини, цукрового буряку, броколі або інших овочевих капуст, або тополі.

38. Рослина за пунктом 37, де зазначена сільськогосподарська культурна рослина не є рисом.

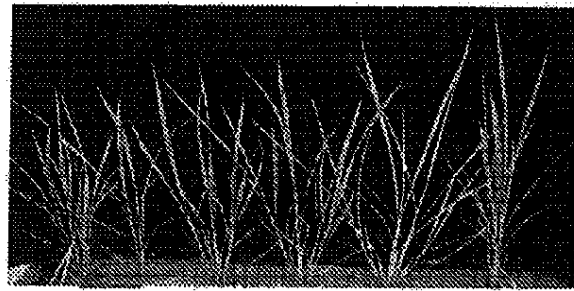
Φιγυρα 1

a



HT

a-U1



HT

b-U1

b-U2

b-S2

b



HT

a-U1

a-U2

b-S2

b-S6

b-U1

b-U2

C

HT

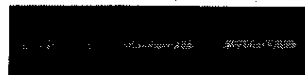
a-U1

a-U2

OsNRT2.3a



OsActin



HT

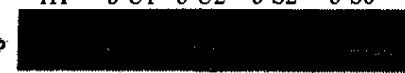
b-U1

b-U2

b-S2

b-S6

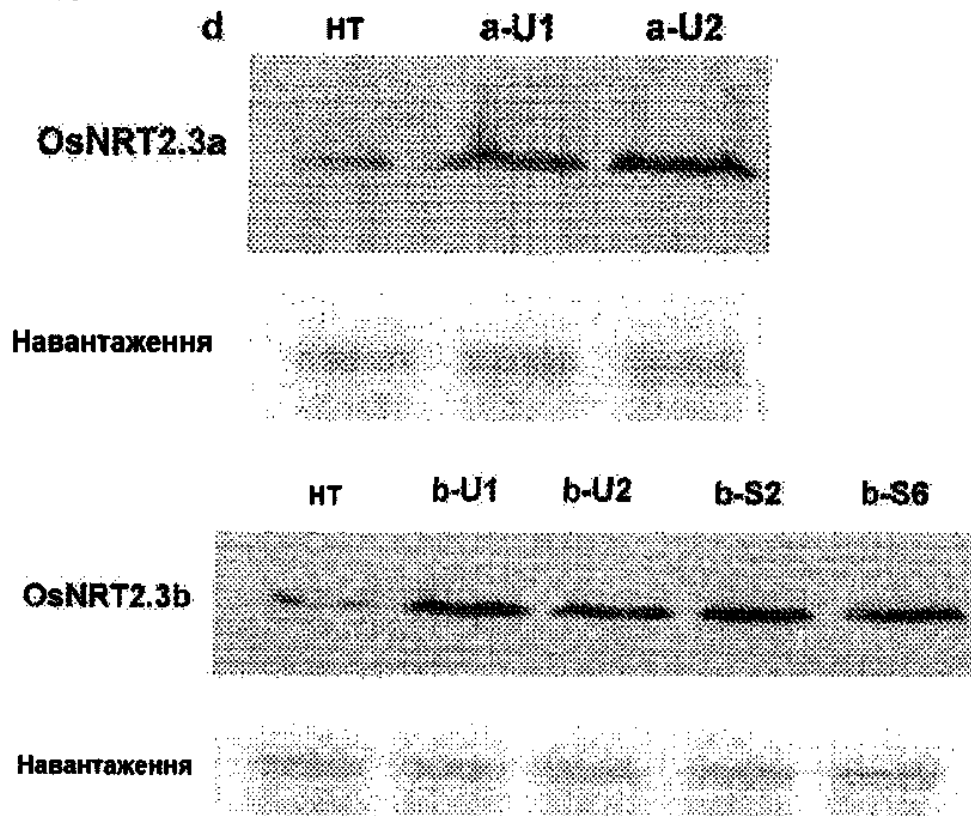
OsNRT2.3b



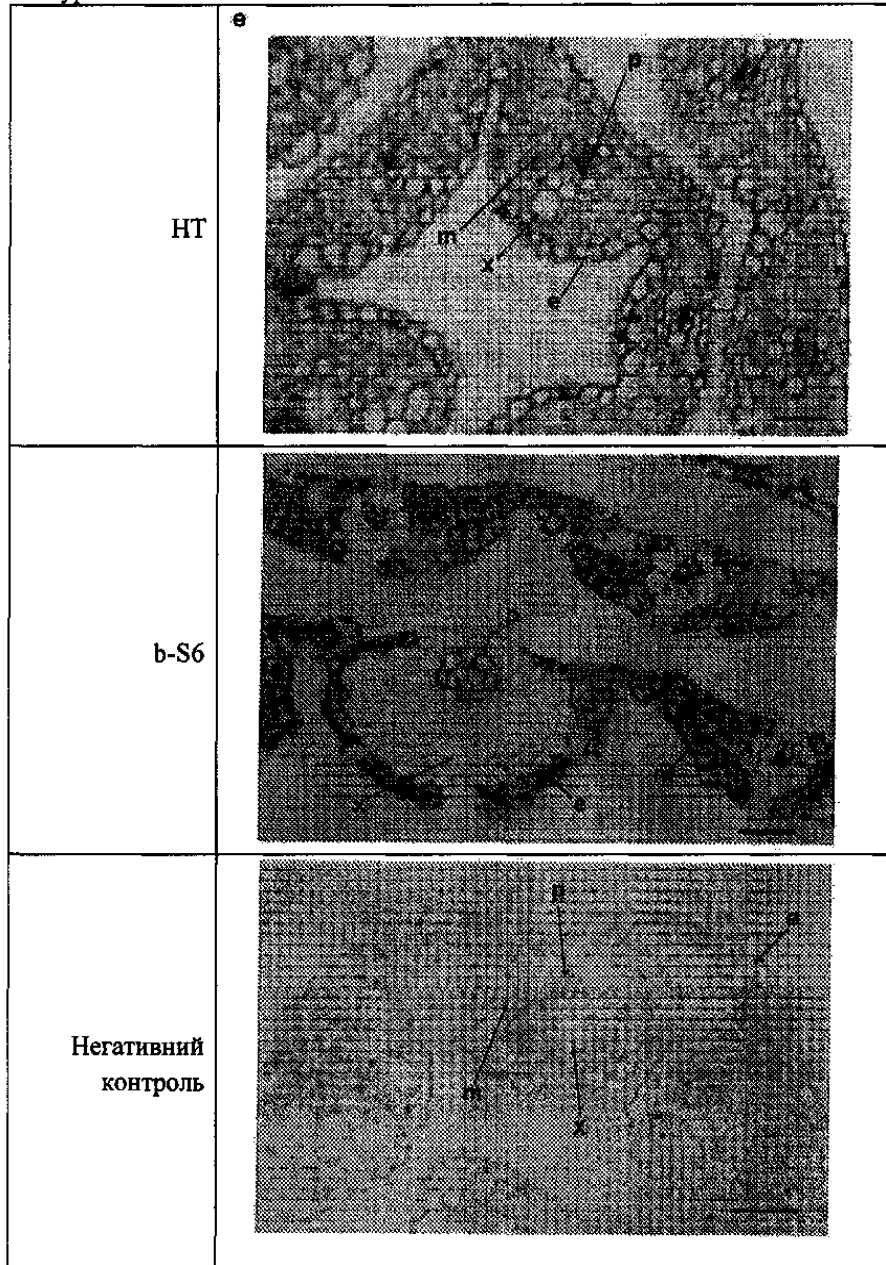
OsActin



Фігура 1

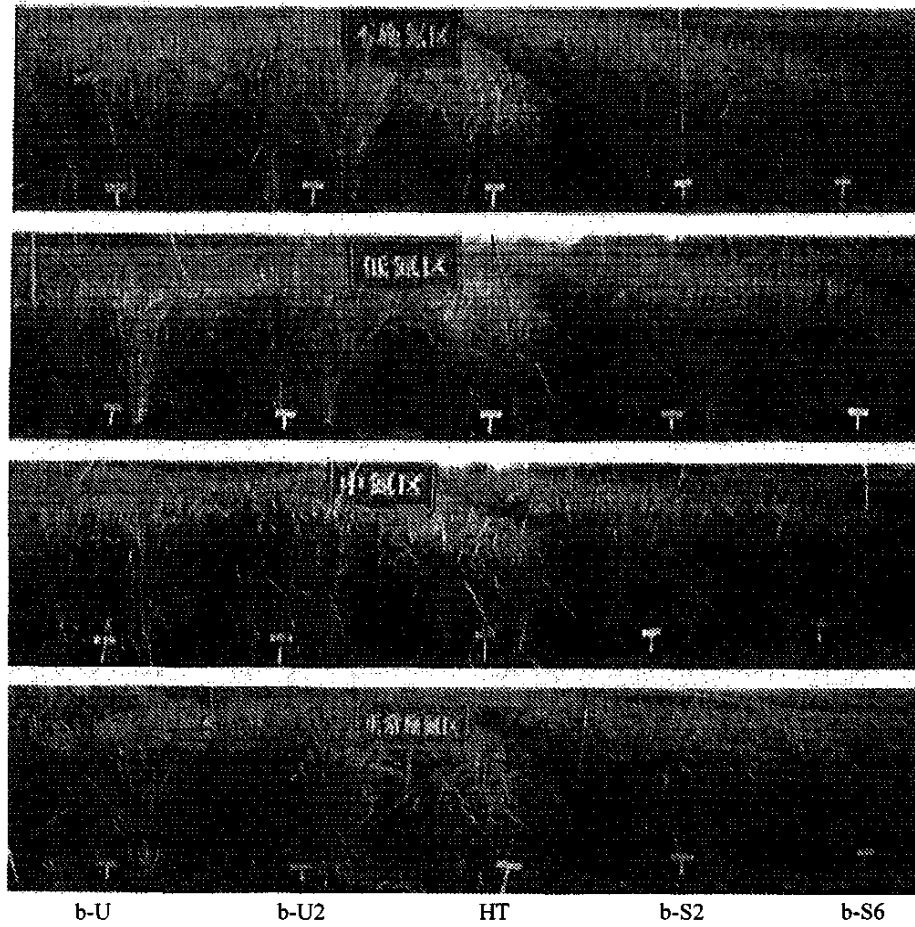


Фігура 1

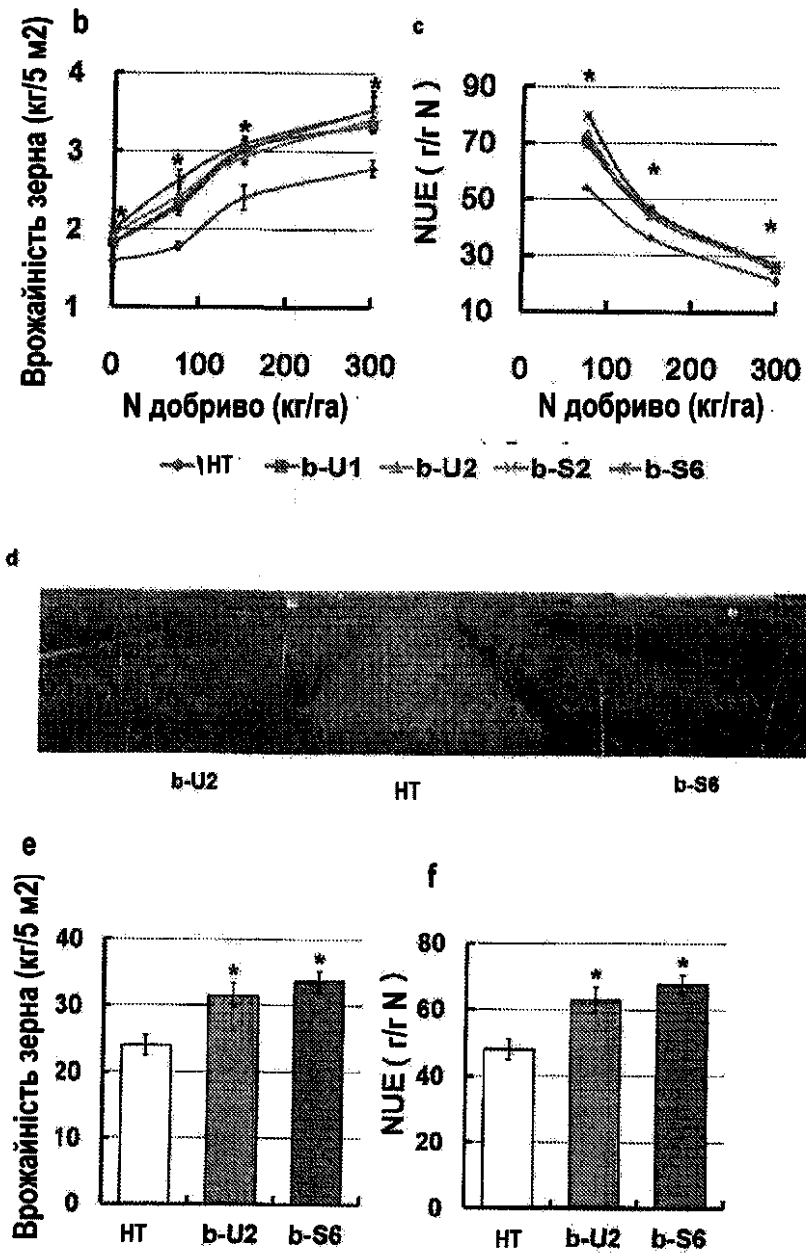


Фигура 2

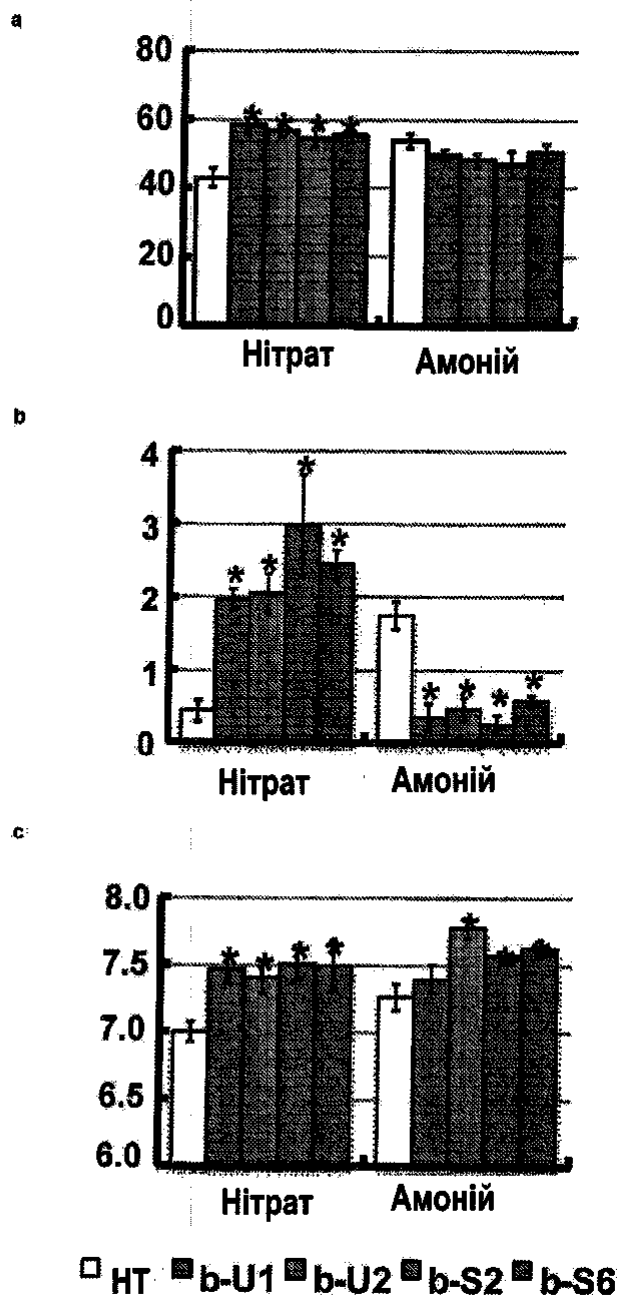
a



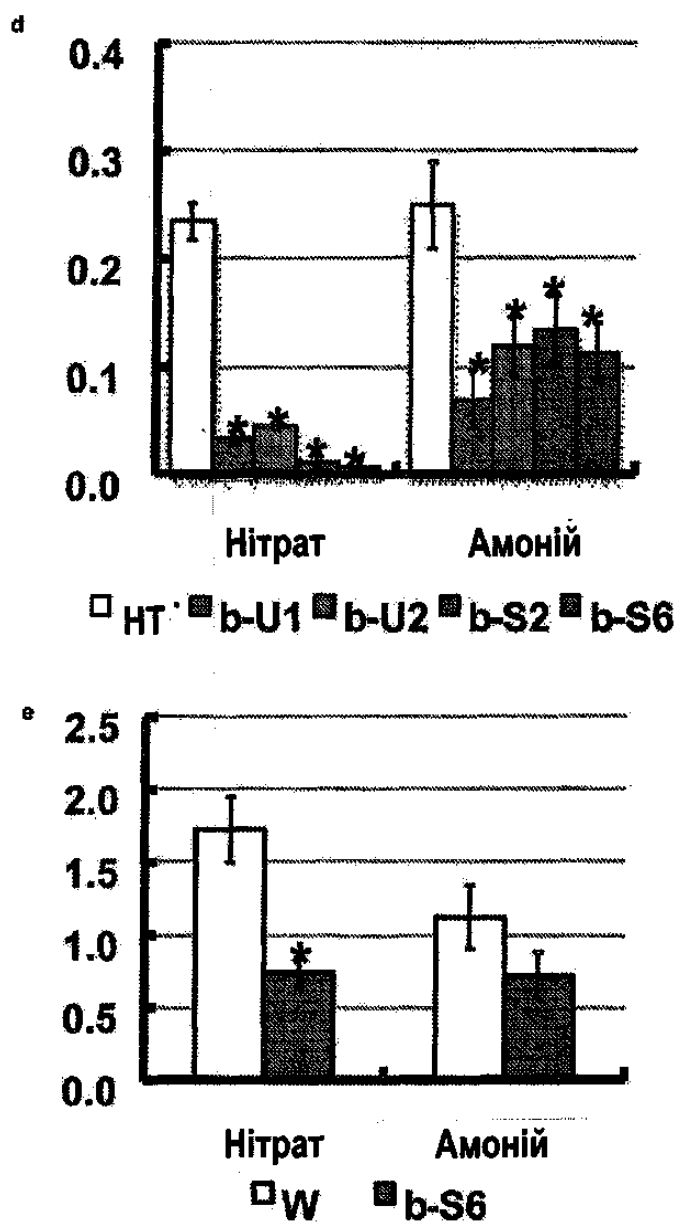
Фігура 2



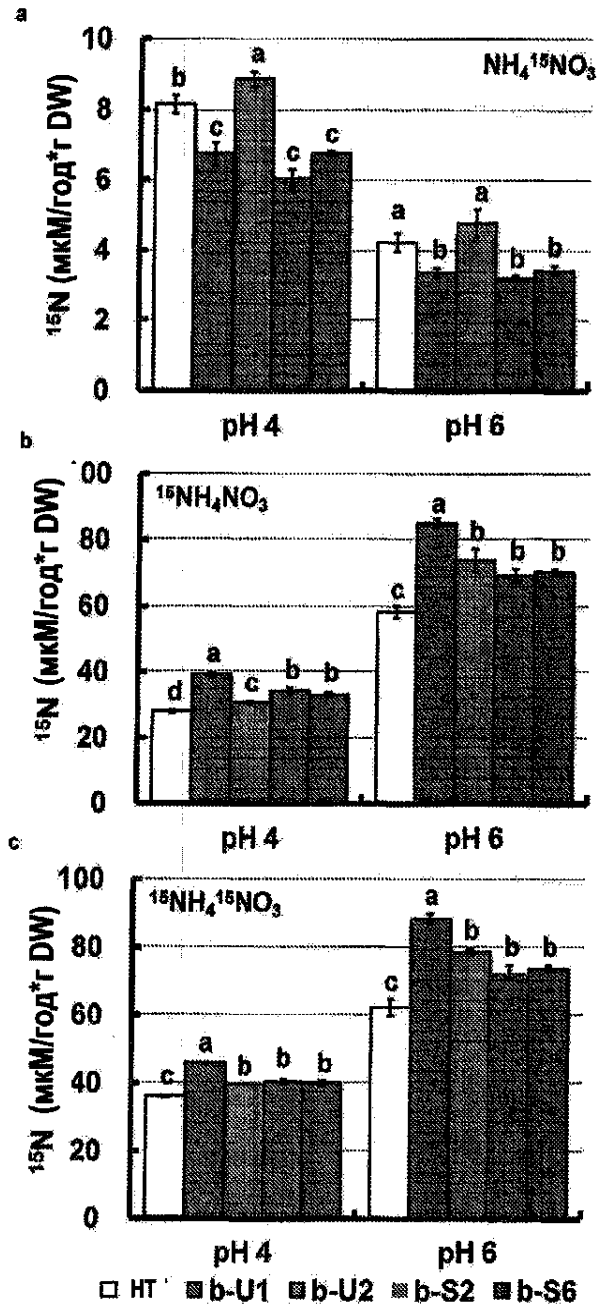
Фігура 3



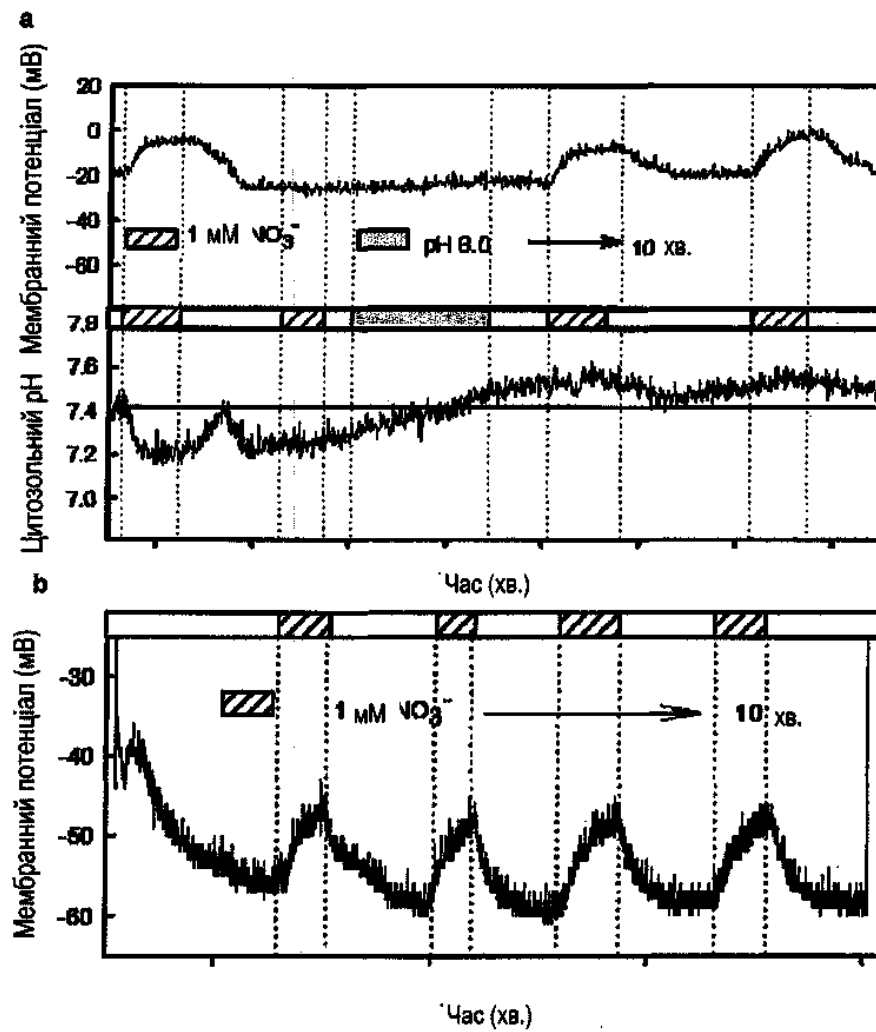
Фігура 3



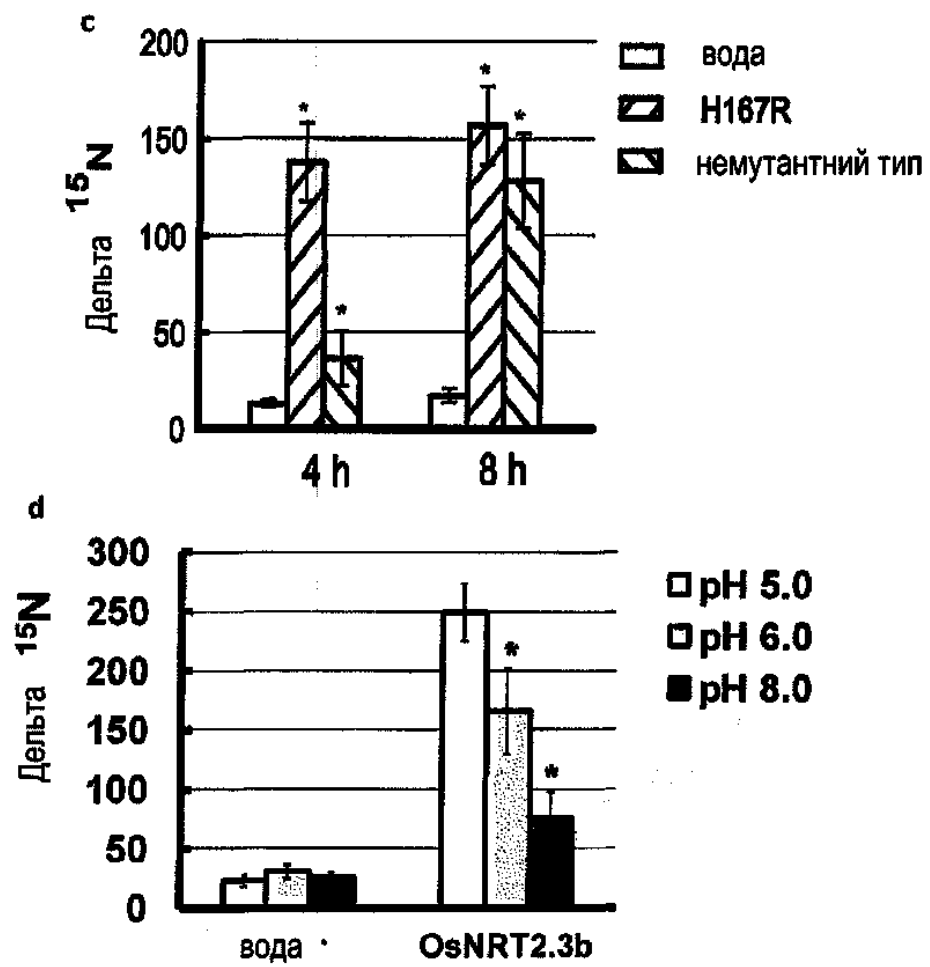
Фігура 4



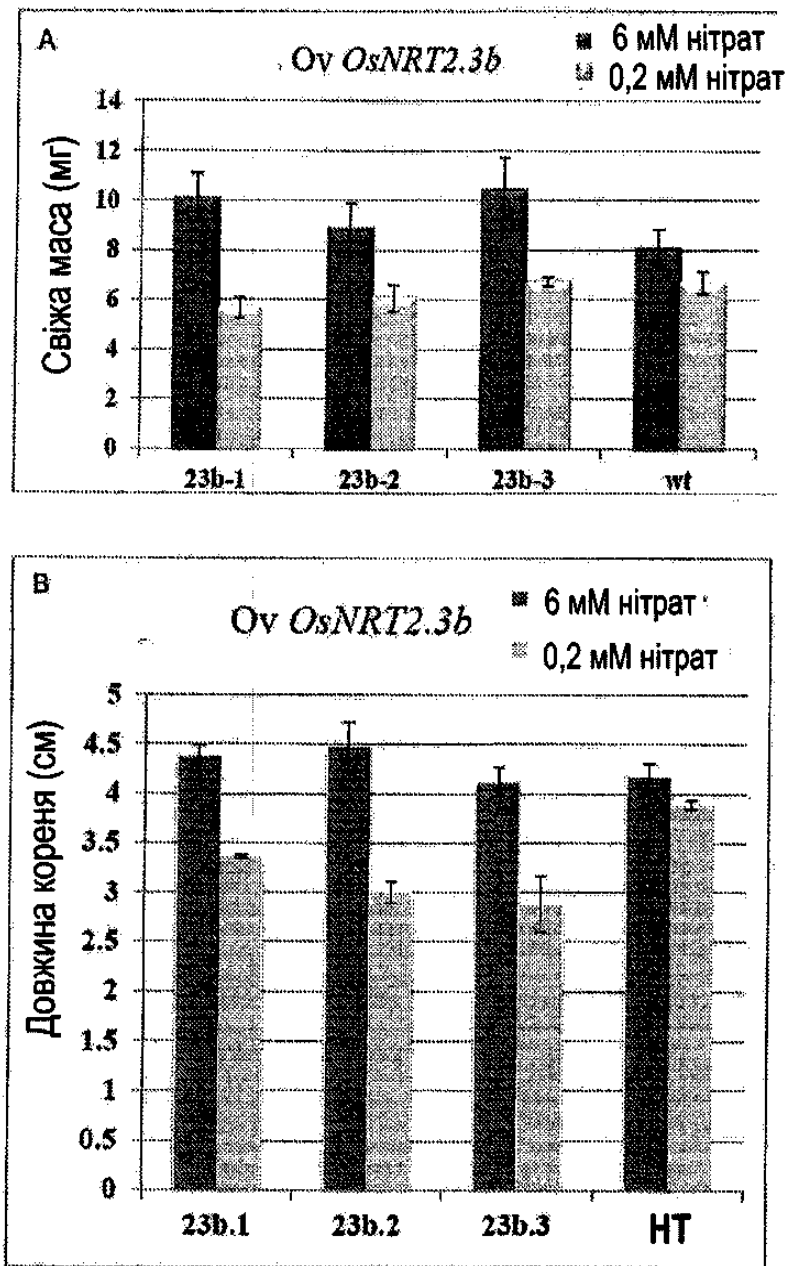
Фігура 5



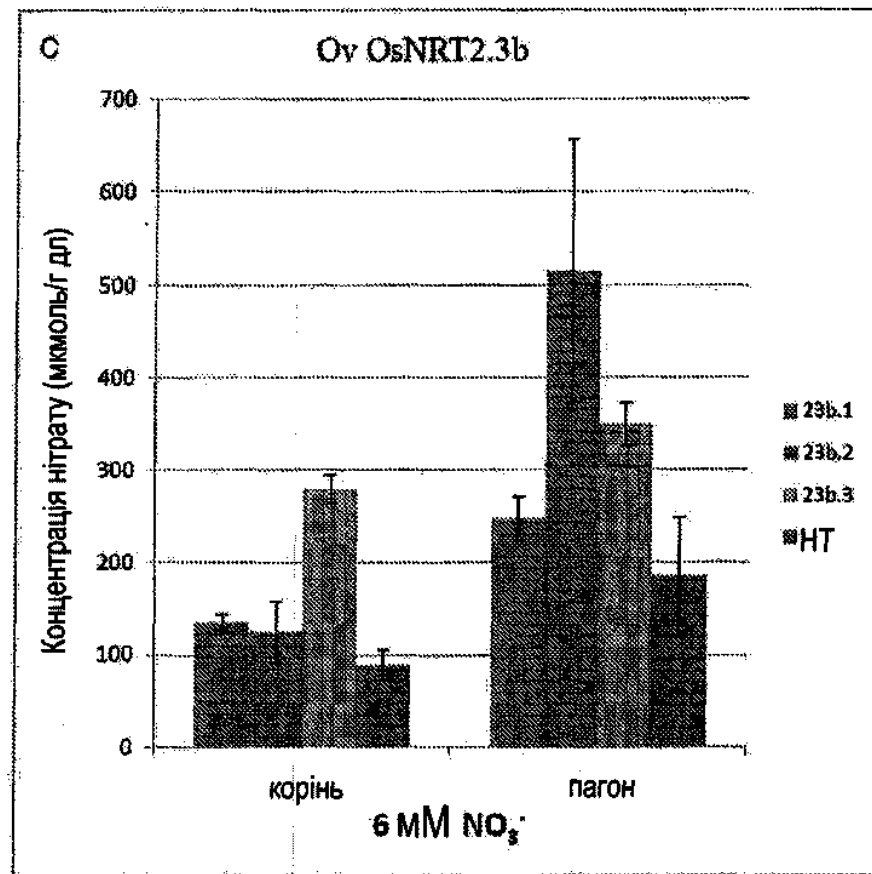
Фігура



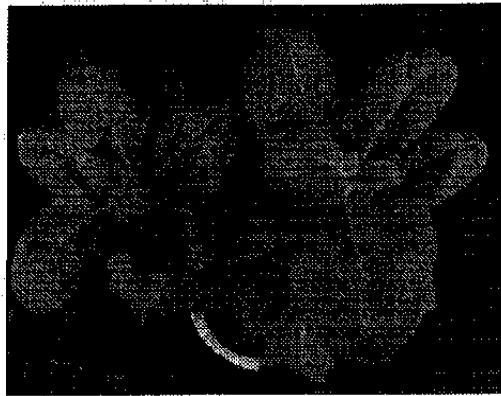
Фігура 6



Фігура 6



Фігура 7



HT

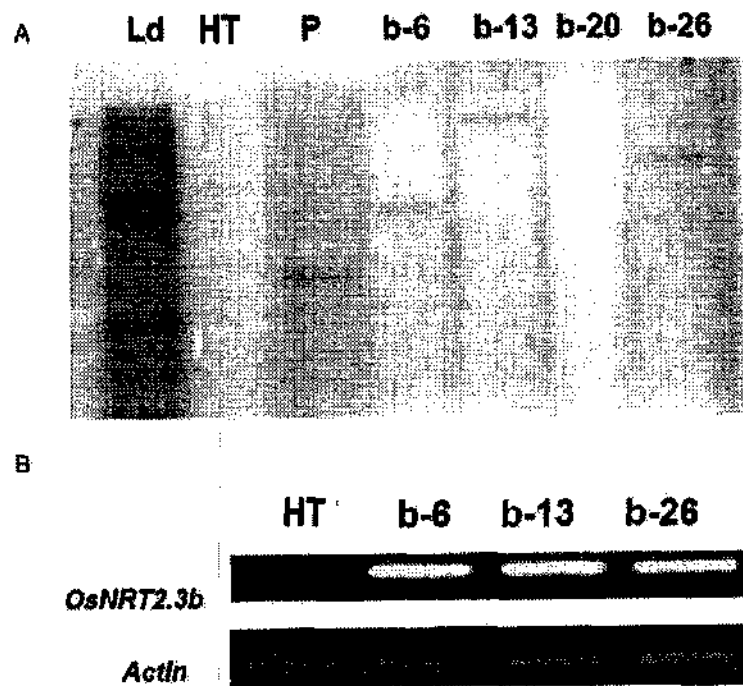
b-6



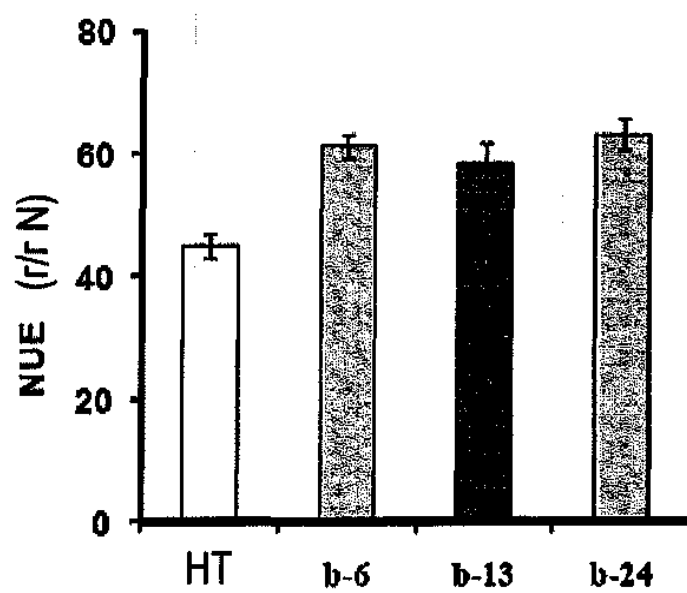
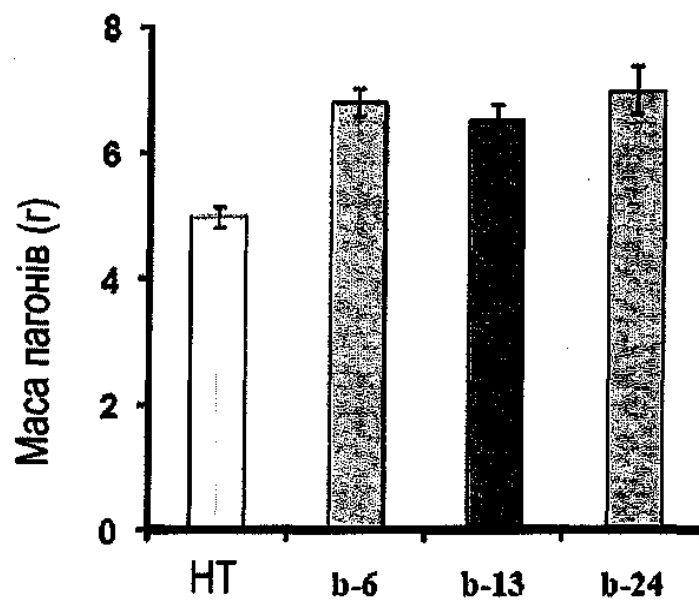
HT b-6

b-13 b-26

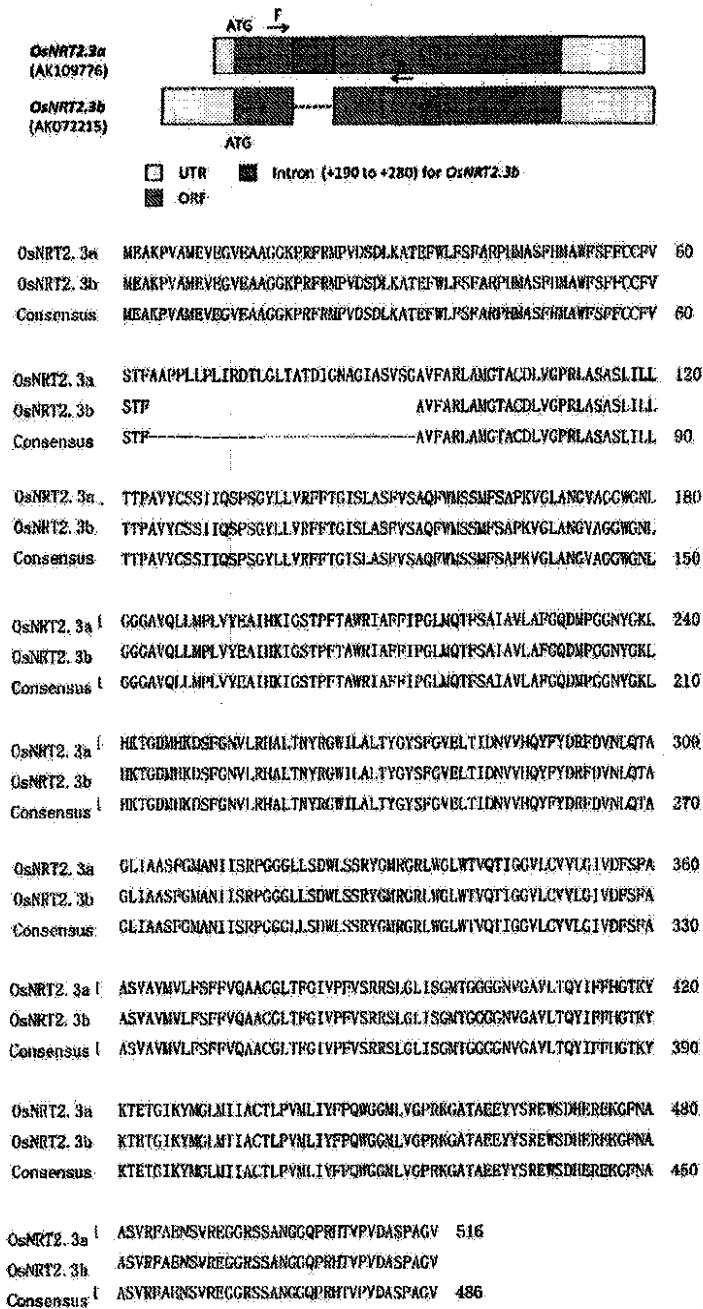
Фигура 8



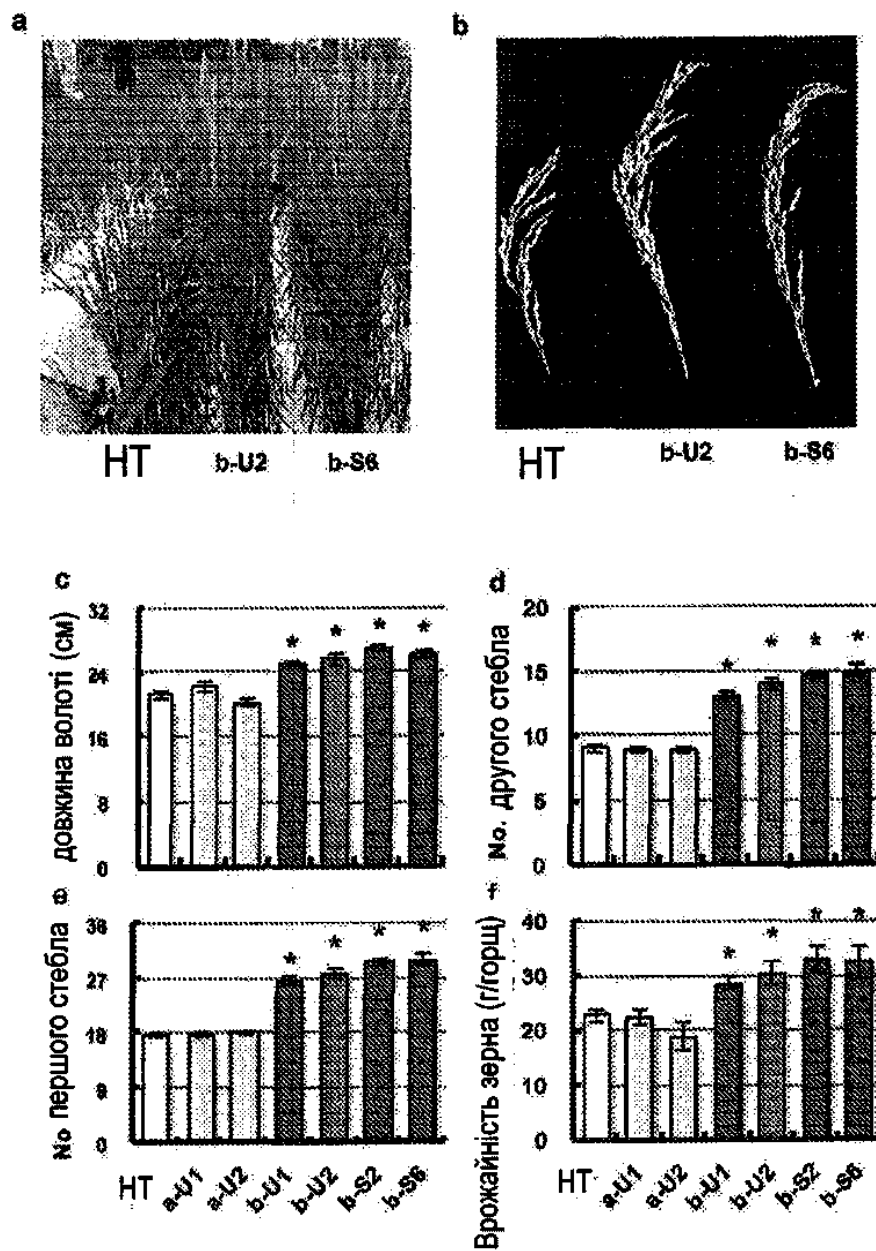
Фігура 9



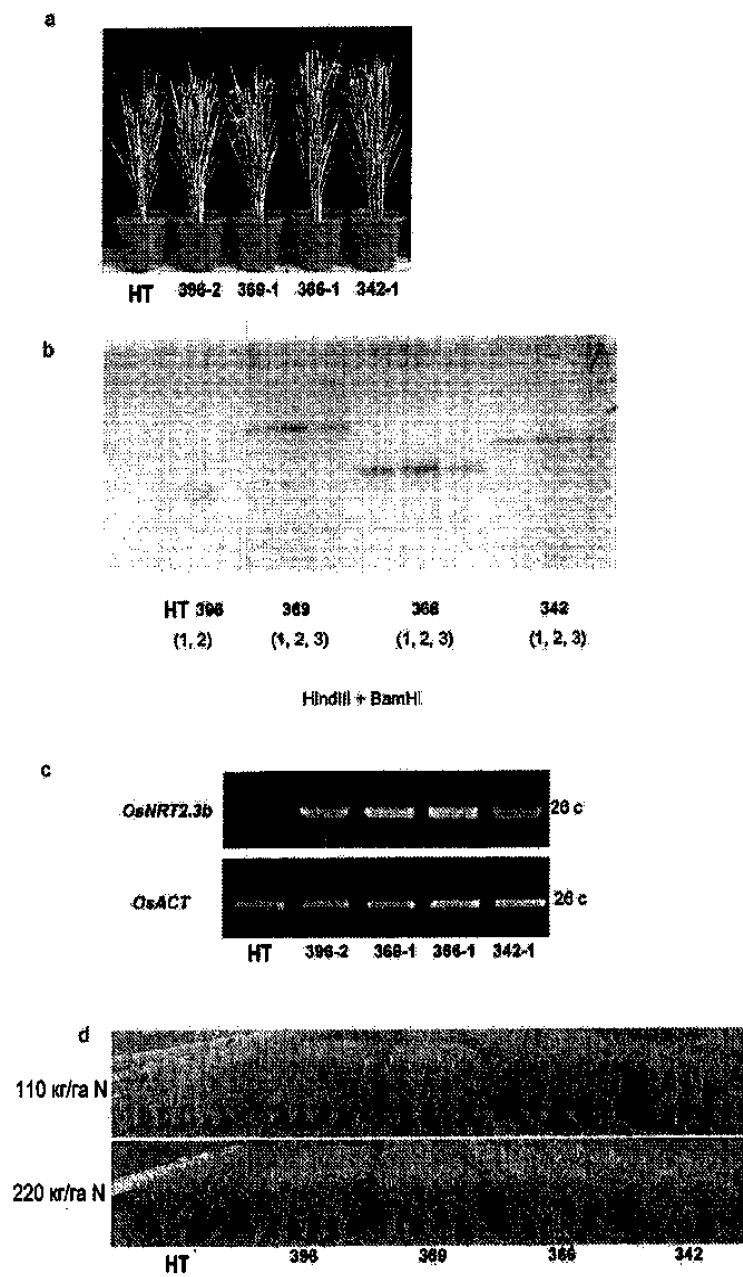
Φirypa 10

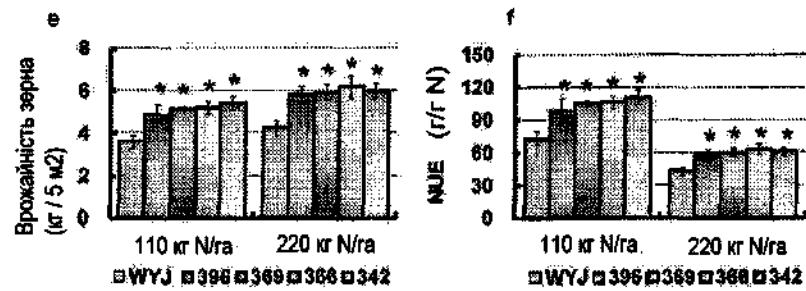


Фігура 11

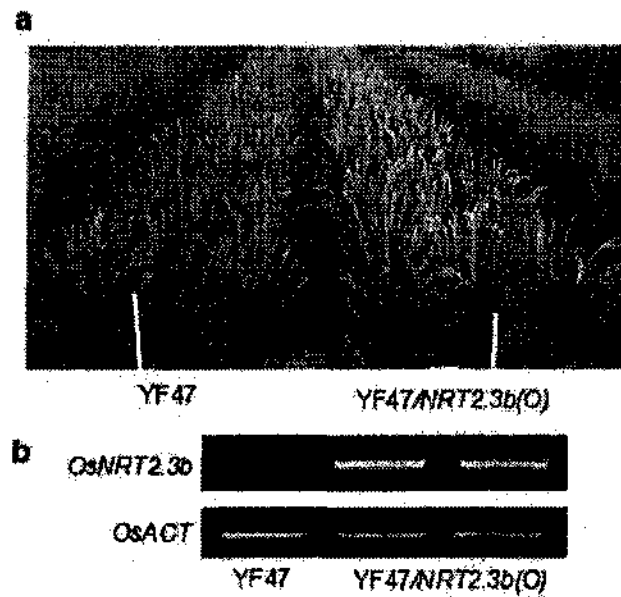


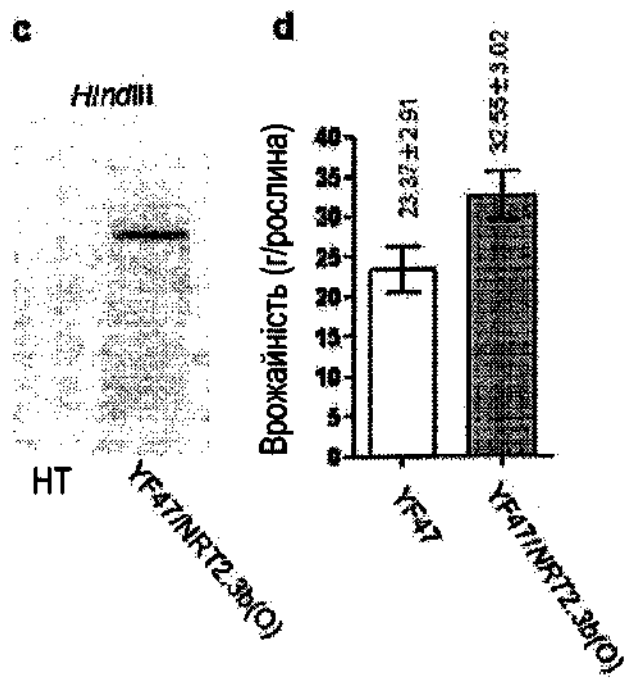
Фігура 12



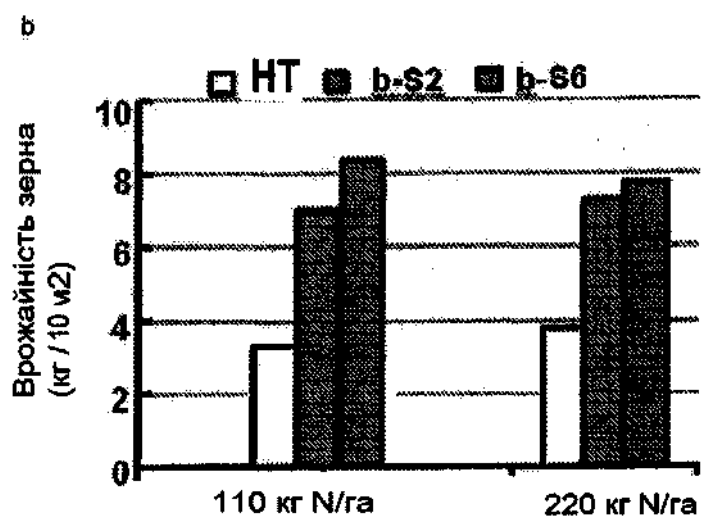
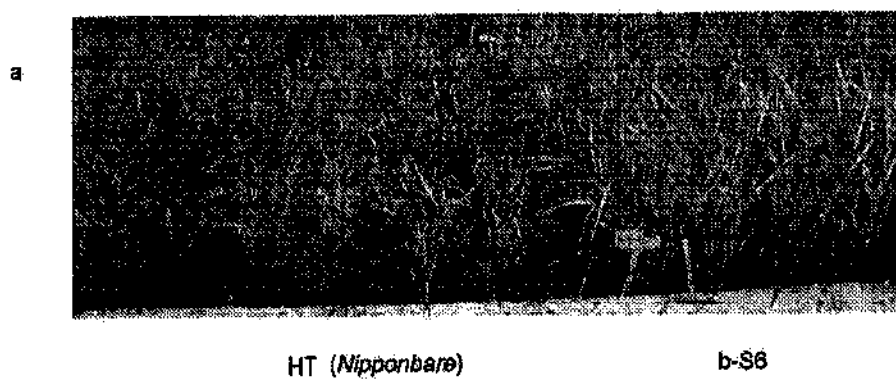


Фігура 13

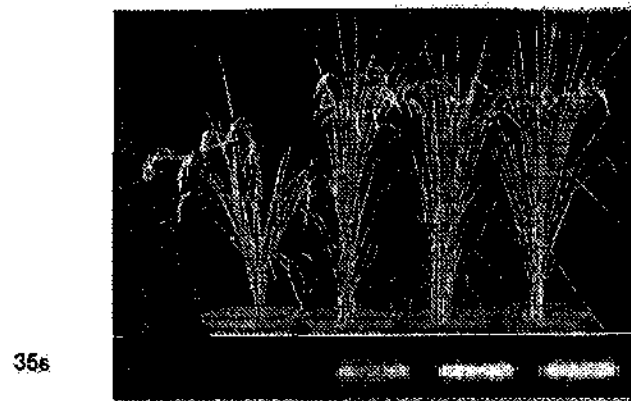




Фігура 14

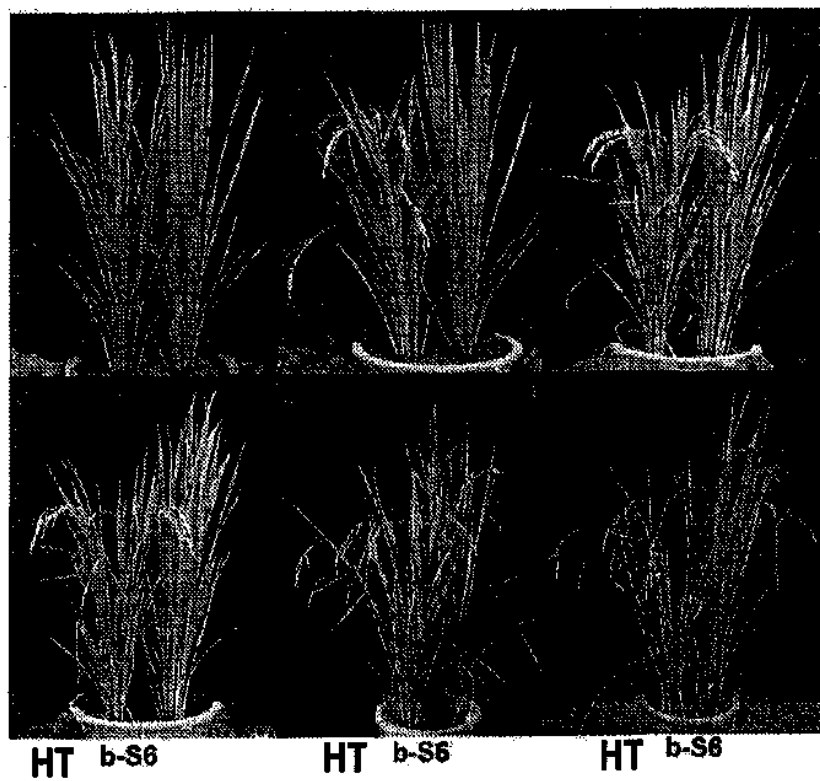


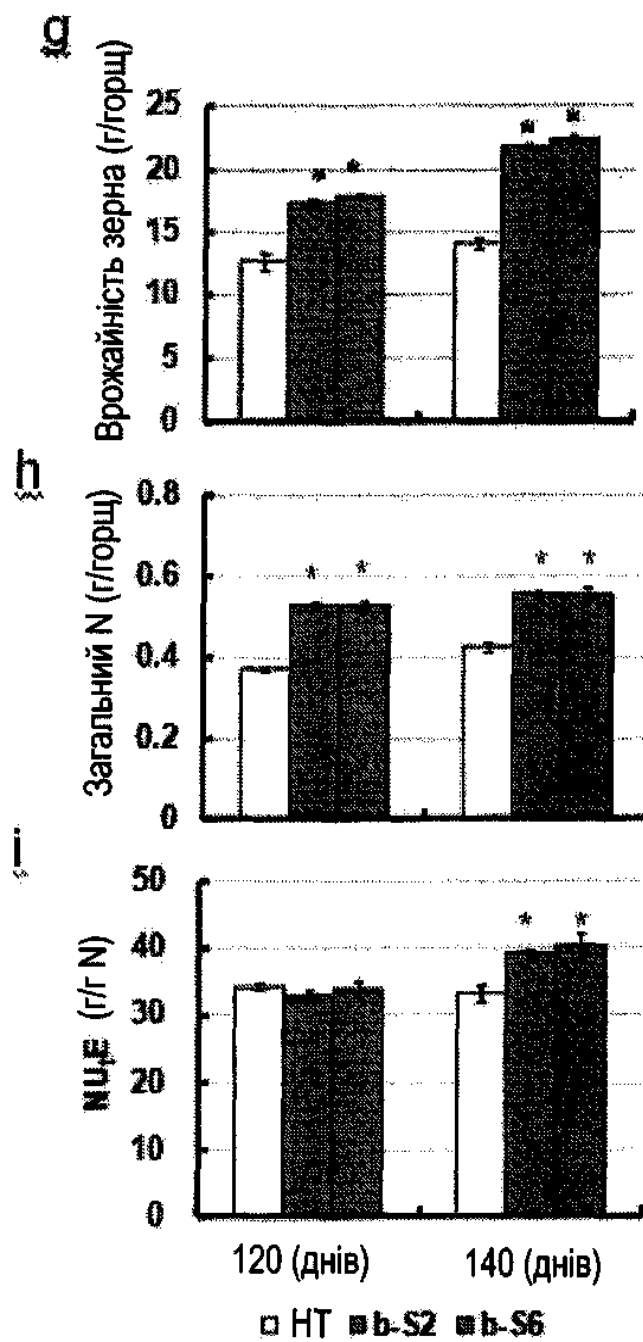
Фігура 16

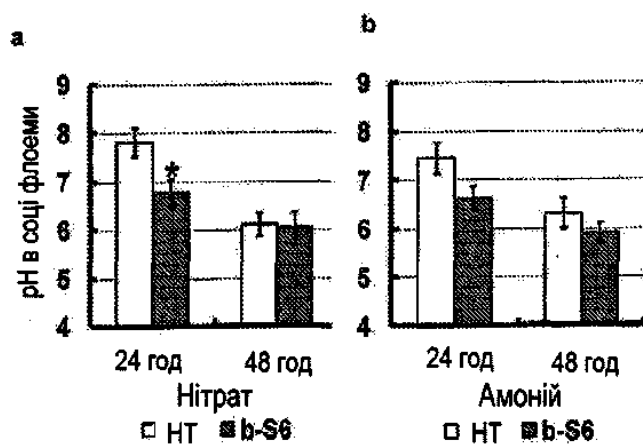


Гентип	aa	Aa	Aa	AA
Число копий	0.05	0.98	1.22	1.93

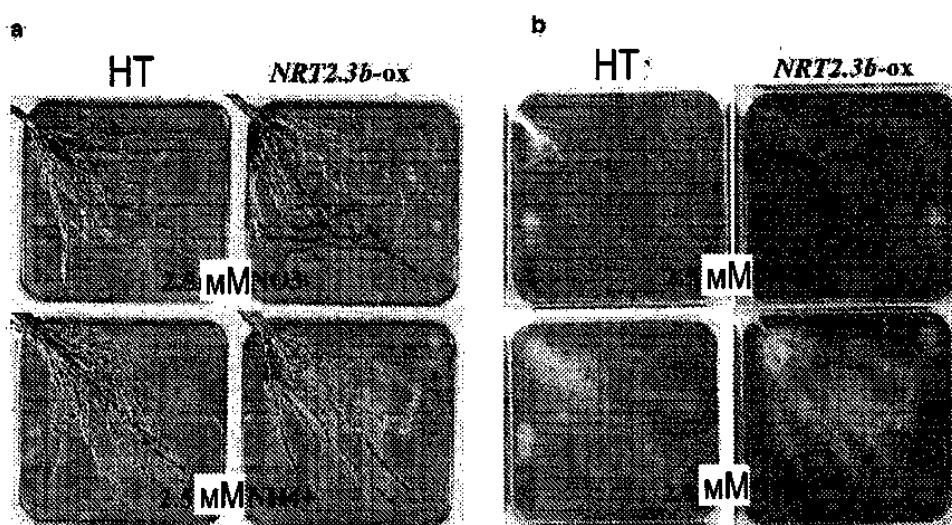
Фігура 16



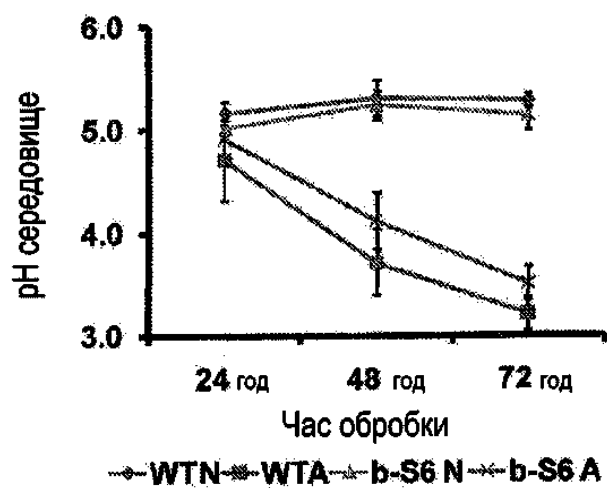




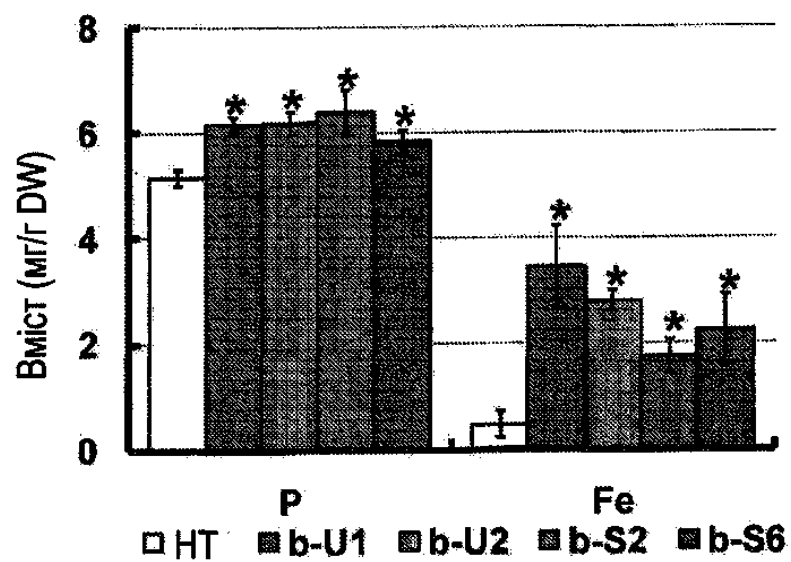
Фігура 18



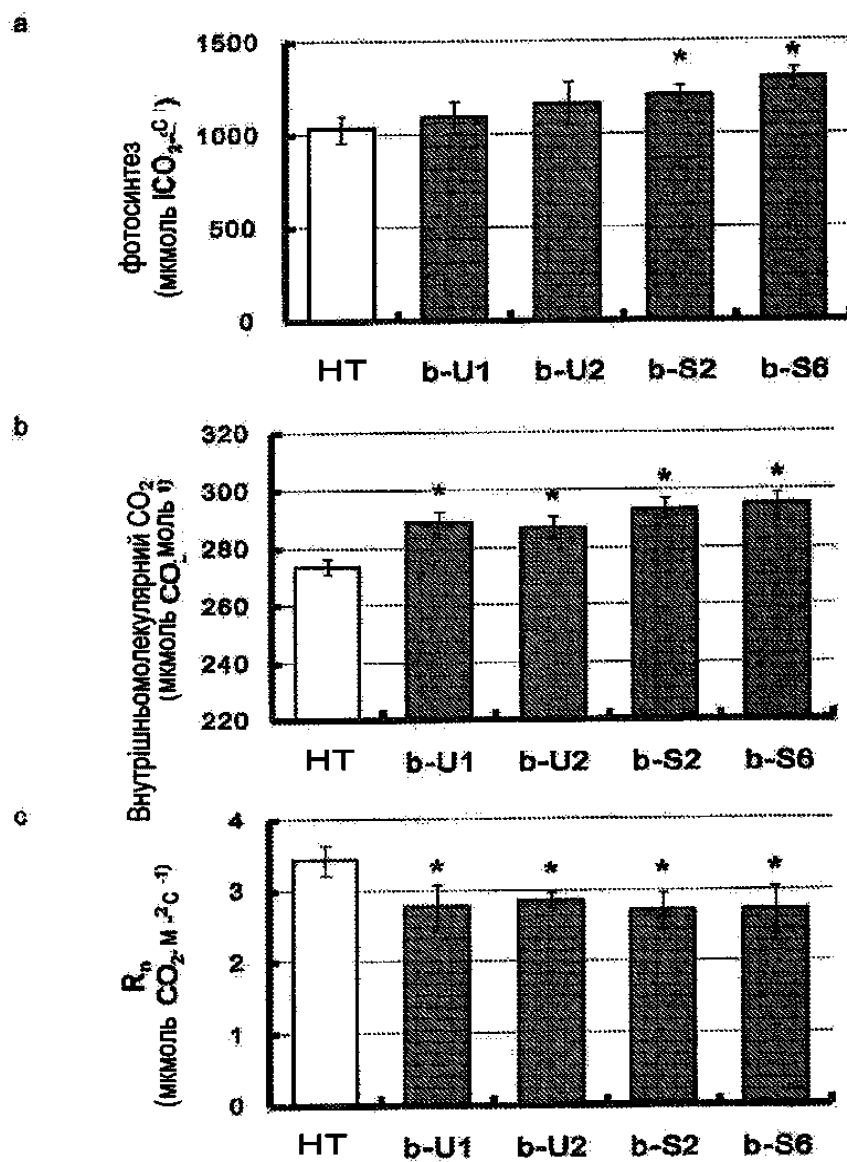
с



Фігура 19



Фігура 20



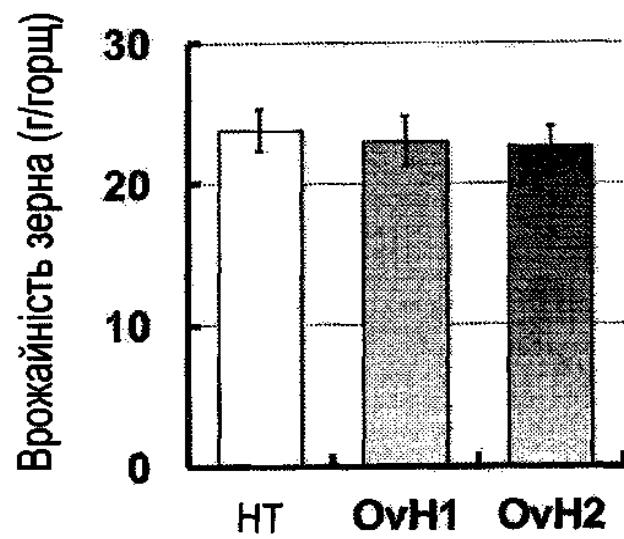
Фігура 21

a

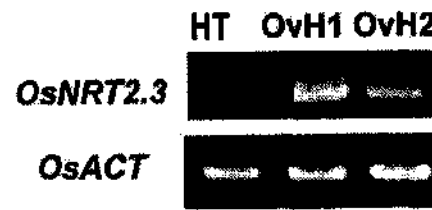


HT OvH1 OvH2

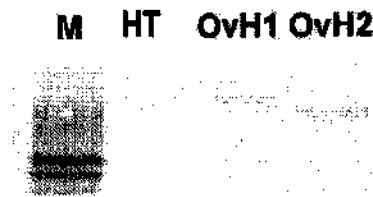
b



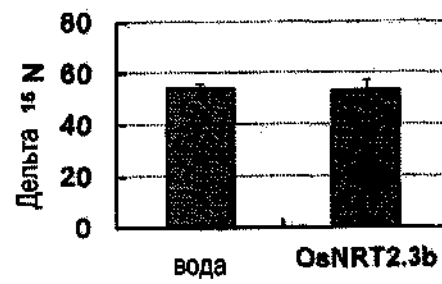
c



d

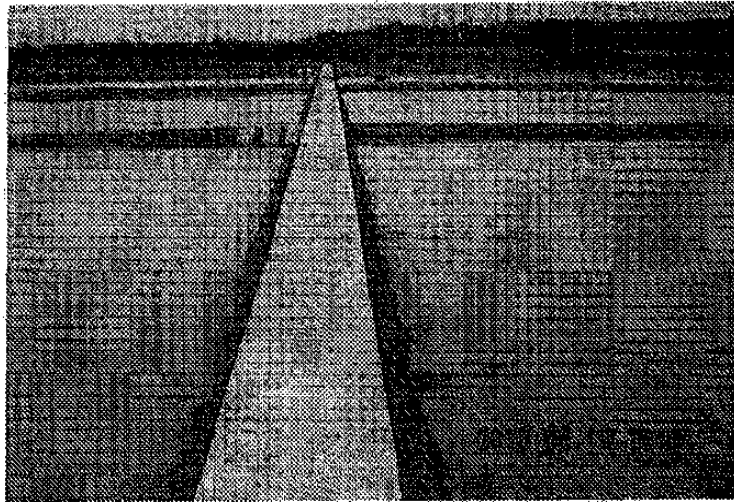


Фигура 22



Фігура 23

a



b

Великомасштабний експеримент	N обробки
0 кг N	300 кг N
75 кг N	150 кг N
75 кг N	75 кг N
75 кг N	0 кг N

c

Рослини в кожному блоку N обробки				
b-S2	b-U1	b-S6	HT	b-U2
b-U2	HT	b-U2	b-S6	b-S2
b-U1	b-U2	HT	b-S2	b-S6

d

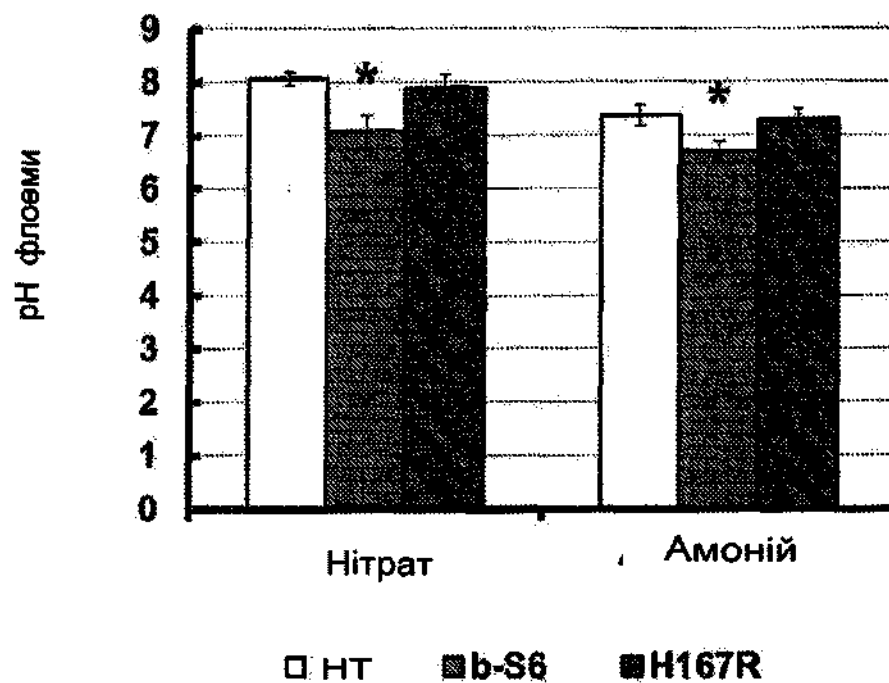
Рослини в кожному великомасштабному блоці з 75 кг N/га:		
b-U2	HT	b-S6
10 рядків (25 см) x 128 рослин (20 см)	10 рядків (25 см) x 128 рослин (20 см)	10 рядків (25 см) x 128 рослин (20 см)

Фігура 24

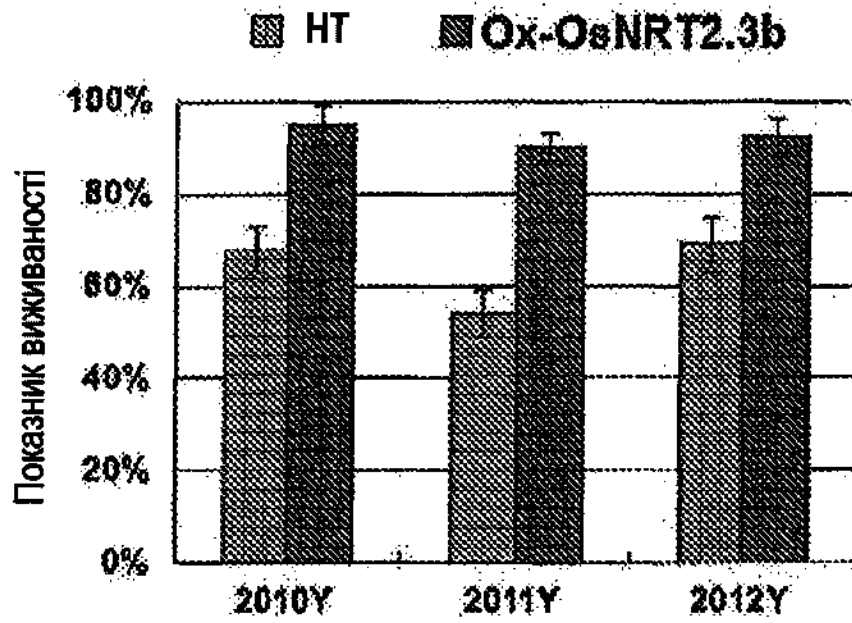
Загальна назва	Вид	Id номер	Мотив 1	Положення 1	Мотив 2	Положення 2
Арабідо- писис (AtNRT2.7)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT5G14570	FFVGFSLA NF SEQ ID No. 41	136	EILIGGLGN SEQ ID No. 42	259
A. lyr ata	<i>Arabidopsis lyrata</i>	350602	FFVGFSLA NF SEQ ID No. 43	136	EILIGGLGN SEQ ID No. 44	259
грицики	<i>Capsella rubella</i>	Carubv1000893 2m.g	FFVGFSLA NF SEQ ID No. 45	136	EILIGGLGN SEQ ID No. 46	251
		Carubv1001102 8m	FSVASPI SEQ ID No. 47	24	LWIIQTAGG SEQ ID No. 48	355
тополь	<i>Populus trichocarpa</i>	Potri.009G0085 00	FSVASPI SEQ ID No. 49	24	LWIIQTAGG SEQ ID No. 50	355
		Potri.009G0086 00	FSVASPI SEQ ID No. 51	20	LWIIQTAGG SEQ ID No. 52	351
огірок	<i>Cucumis sativus</i>	Cucsa.268720	WRIAFFVP GF SEQ ID No. 53	213	LWILQTLG GVF SEQ ID No. 54	344
яблуко	<i>Malus domestica</i>	MDP000023953 7	FSVASPI SEQ ID No. 55	24	LWIIQTAGG SEQ ID No. 56	335
персик	<i>Prunus persica</i>	ppa004104m.g	FSVASPI SEQ ID No. 57	24	LWIIQTAGG SEQ ID No. 58	355
соя	<i>Glycine max</i>	Glyma13g39850	WRIAFFVP GF SEQ ID No. 59	224	LWILQTLG GVF SEQ ID No. 60	355
		Glyma12g30050	WRIAFFVP	224	LWILQTLG	355

			GF SEQ ID No 61		GVF SEQ ID No. 62	
пурпурна коротко ножка	<i>Brachypodium distachyon</i>	Bradi2g47640	FFIPGVMO TF SEQ ID No. 63	209	LWVVQTIG G SEQ ID No. 64	336
ячмінь	<i>Hordeum vulgare</i>	MLOC_75087.1 *	FFIPGVMO TF SEQ ID No. 65	209	LWVVQTIG G SEQ ID No. 66	336
кукурудза	<i>Zea mays</i>	GRMZM2G4551 24*				
пшениця	<i>Triticum aestivum</i>	contig276340*				
		contig14141				
		contig2095384				

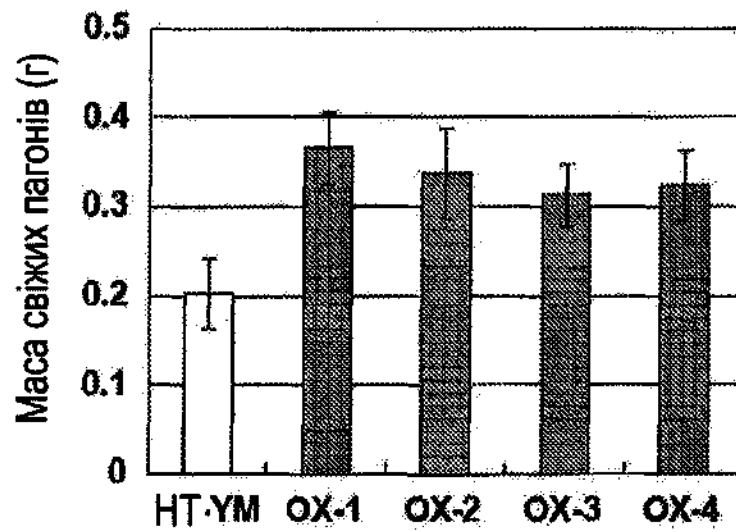
Фігура 25



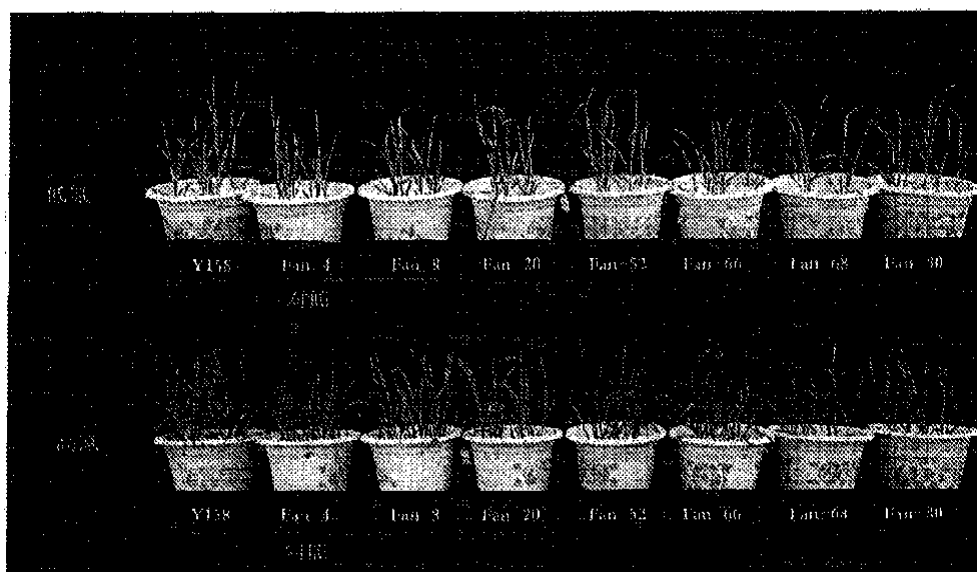
Фігура 26



Фігура 27



Фігура 28



Комп'ютерна верстка О. Рябко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601