



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 122386

(13) C2

(51) МПК

A01H 6/46 (2018.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2016 00802
(22) Дата подання заявки: 01.07.2014
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 11.11.2020
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 13174566.3
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 01.07.2013
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: ЕР
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.05.2016, Бюл.№ 9
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 10.11.2020, Бюл.№ 21
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/ЕР2014/063985, 01.07.2014

(72) Винахідник(и):
Гойтен Коен (BE),
Кауфманн Керстін (DE),
Руеленс Філіп (BE)
(73) Володілець (володільці):
БАЙЕР КРОПСАЄНС НВ,
J.E. Mommaertslaan 14, B-1831 Diegem, Belgium (BE),
БАЙЕР КРОПСАЄНС ЛП,
2 T.W. Alexander Drive, Research Triangle Park, Durham, NC 27709, United States of America (US)
(74) Представник:
Федорова Ірина Олександрівна, реєстр. №11
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
S. Lee et al, "Further Characterization of a Rice AGL12 Group MADS-Box Gene, OsMADS26", Plant Physiology, 01.01.2008, vol. 147, no. 1, 9, P. 156-168
"Triticum aestivum MADS-box transcription factor TaAGL12 (AGL12) mRNA, partial cds.", EMBL, 20.05.2006, Database accession no. DQ512367
Tao Zhao et al, "Characterization and expression of 42 MADS-box genes in wheat (Triticum aestivum L.)", Molecular Genetics and Genomics, Springer, Berlin, DE, 21.07.2006, vol. 276, no. 4, P. 334 - 350
Rudhoy Szabolcs et al, "FLC-like factors in wheat (cv. Mv15) and Conyza sp", Acta Biologica Szegediensis, & 7th Hungarian Congress on Plant Physiology; Szeged, Hungary; 24-27.07.2002, vol. 46, no. 3-4, P. 45-46
Tadege Million et al, "Reciprocal control of flowering time by OsSOC1 in transgenic Arabidopsis and by FLC in transgenic rice", Plant Biotechnology Journal, Blackwell, Oxford, GB, 01.09.2003, vol. 1, no. 5, P. 361-369
"Triticum aestivum cDNA clone:whchan39e05, 5' end.", EMBL, 14.04.2007, Database accession no. CJ929266
DATABASE UniProt [Online] (19.10.2011)
"SubName: Full=Type I MADS-box protein", retrieved from EBI accession no. UNIPROT: G1FP79, Database accession no. G1FP79
WO 2009/135130 A2, 05.11.2009
WO 03/008540 A2, 30.01.2003
WO 2006/068432 A1, 29.06.2006

(54) СПОСІБ ПРИСКОРЕННЯ ЦВІТІННЯ, РОЗВИТКУ НАСІННЯ АБО УПОВІЛЬНЕННЯ ПРОРОСТАННЯ НАСІННЯ У ОДНОДОЛЬНИХ РОСЛИН

(57) Реферат:

UA 122386 C2

Винахід стосується способу прискорення цвітіння, розвитку насіння або уповільнення проростання насіння у однодольних рослин, який включає наступні етапи: (a) функціональне зв'язування рослинного промотору з нуклеїновою кислотою, яка кодує мовчазну РНК, гетерологічну стосовно вказаного промотору, при цьому мовчазна РНК орієнтована на FLC ген та/або білок у вказаній рослині, частині рослини, органі рослини або рослинній клітині вказаної рослини, та (b) введення химерного гена, утвореного на етапі a) в однодольну рослину, тим самим забезпечуючи зниження експресії та/або активності вказаного FLC гена. Винахід також стосується способу одержання однодольної рослини, вибраної з кукурудзи, ячменю, пшениці, жита або вівса, у якій прискорюються цвітіння та розвиток насіння або уповільнюється проростання насіння; рослини; та способу ідентифікації однодольної рослини з прискореним або уповільненим цвітінням, розвитком насіння та уповільненим або прискореним проростанням насіння.

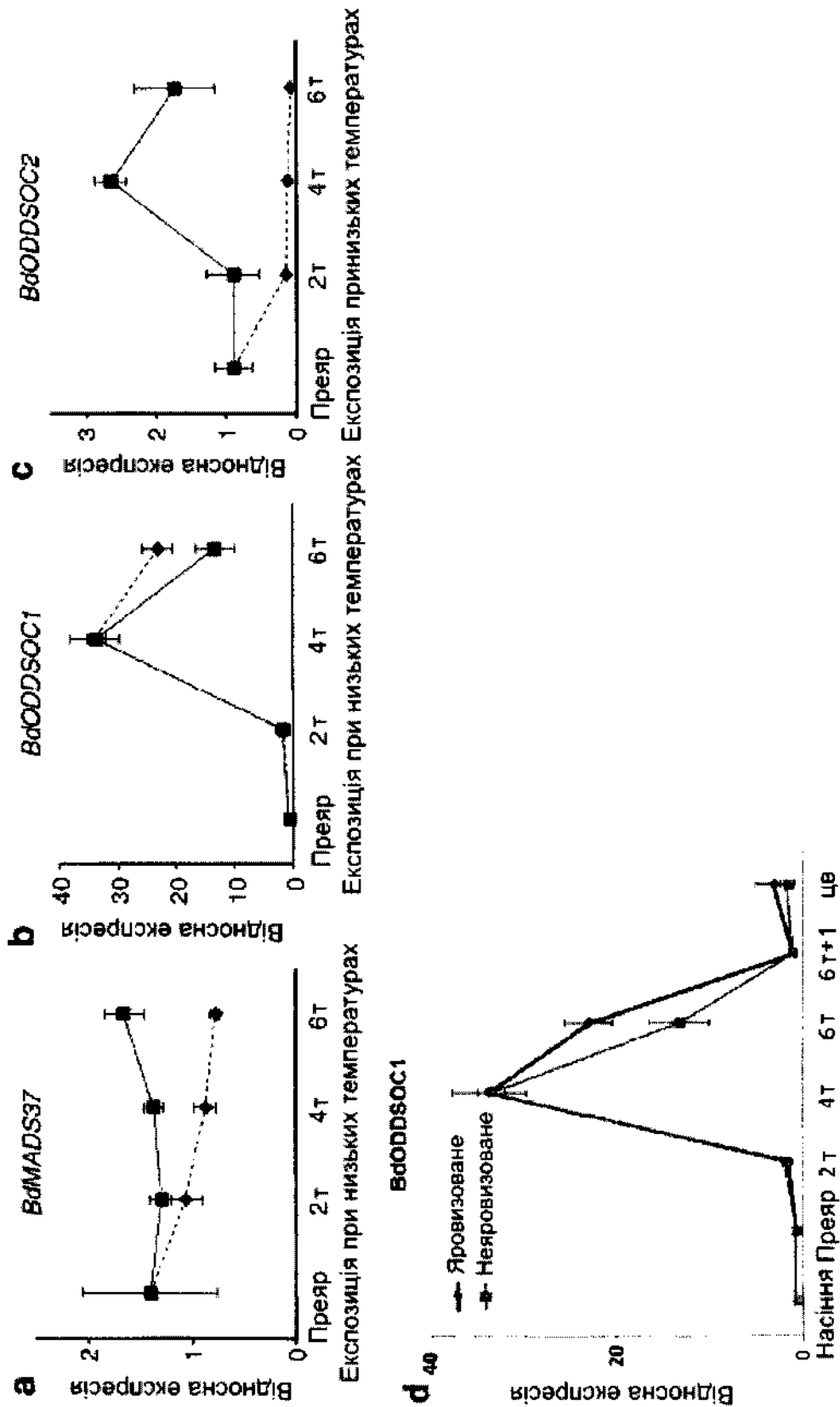


Fig. 3

Галузь винаходу

Цей винахід пов'язаний із галуззю молекулярної біології рослин і стосується способу модуляції часу цвітіння. Більш конкретно, цей винахід стосується способу прискорення чи уповільнення часу цвітіння, який включає зміну експресії та/або активності FLOWERING LOCUS C (FLC) гена та/або білка у однодольних рослин. Винахід також забезпечує химерні гени, нуклеїнові кислоти, які кодують такі FLC білки однодольних.

Передумови винаходу

У процесі еволюційного розвитку квіткових рослин виник надзвичайно складний та різноманітний перехід від вегетативного до генеративного росту. Зовнішні та внутрішні чинники інтегруються у кількісній реакції цвітіння, яка варіює між видами та навіть між екотипами (Anderson et al (2011) Trends Genet. 27: 258). Рослини, які ростуть в умовах помірного клімату, використовують фотоперіод або тривалість дня у доповнення до яровизації або експозиції до низьких температур, для того щоб відчувати перехід від зимових умов до умов навколишнього середовища, які є оптимальними для репродукції (Amasino et al (2010) Plant Physiol 154: 516). Вдосконалення репродуктивного розвитку у квіткових рослин пов'язане з виникненням та диверсифікацією генів, які контролюють розвиток, найвідомішими серед яких є члени родини факторів транскрипції MADS-box. походження декількох підродин MADS-box генів, що мають вирішальну роль для переходу у флоральний стан, залишається покритим таємницею, тому що вони, очевидно, присутні лише у квіткових рослин або у певних філогенетичних лініях квіткових рослин.

Однією з філогенетичних ліній MADS-box генів із надзвичайно енігматичним походженням є клада FLOWERING LOCUS C (FLC) генів. У модельній рослині *Arabidopsis thaliana*, FLC є основним репресором переходу у флоральний стан (Michaels & Amasino (1999) Plant Cell 11, 949), де він інгібує цвітіння безпосереднім пригніченням активності центральних промоторів цвітіння, а саме, SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION CONSTANS (SOC1), FLOWERING LOCUS D (FD) та FLOWERING LOCUS T (FT) (Anderson et al (2011) (supra); Amasino et al (2010) (supra); Michaels & Amasino (1999) (supra); Adrian et al (2009) Mol. Plant. 2, 628; Searle et al (2006) Genes. Dev. 20, 898). Яровизація послаблює цю репресію шляхом негативної регуляції FLC експресії через епігенетичні модифікації структури хроматину в FLC локусі (Amasino et al (2010) (supra); Adrian et al (2009) (supra). FLC також здійснює трансдукцію температурних сигналів упродовж проростання насіння Chiang et al (2009) Proc Natl Acad Sci USA 106:11661). FLC має п'ять близько споріднених паралогів в геномі *Arabidopsis thaliana*, деякі з яких також діють як репресори переходу у флоральний стан розвитку (Ratcliffe et al (2001) Plant Physiol. 126, 122; Ratcliffe et al (2003) Plant Cell 15, 1159; Kim & Sung (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107, 17029). Ці паралоги виникли в процесі еволюції через послідовні тандемні та геномні дуплікації в межах порядку Brassicales (Schranz et al (2002) Genetics, 162, 1457; Nah & Chen (2010) New Phytol. 186, 228). Тандемні дуплікації FLC-подібних генів, очевидно, не є рідкісним явищем, оскільки вони також були виявлені у інших видів *Arabidopsis* (Nah & Chen (2010) (supra). Поза межами порядку Brassicales FLC-подібні гени були ідентифіковані у більш віддалених лініях справжніх дводольних видів рослин. Наприклад, у цукрового буряка (*Beta vulgaris*), сільськогосподарської культури з сильними вимогами щодо яровизації, експресія FLC також реагує на яровизацію. Це дає підставу припустити, що роль FLC у холодовій індукції цвітіння зберігається у справжніх дводольних (Reeves et al (2007) Genetics 176, 295). Гомологи FLC, однак, не були ідентифіковані поза межами справжніх дводольних і філогенетичне положення цієї підродини у більш широкому розумінні філогенії MADS-box гена, і, відповідно, її еволюційне походження залишається невизначеним. Таким чином, стверджується, що FLC гени не існують у однодольних і сучасні моделі регулювання часу цвітіння у зернових культур не включають FLC (Alexandre & Hennig (2008) J. Exp. Bot. 59, 1127; Colasanti & Coneva (2009) Plant Physiol. 149: 56-62, Jarillo & Pineiro (2011) Plant Sci. 181: 364-378; Yan et al (2003) PNAS 100:6263-6268; Yan et al (2004) Science 303:1640-1644; Yan et al (2006) PNAS 103:19581-19586; Cockram et al (2007) J Exp Bot 58:1231-1244). Історично, яровизація вперше була описана та широко досліджувалась у однодольних сільськогосподарських культур помірного клімату, на зразок озимих різновидів пшениці та ячменю (Chouard (1960) Annu. Rev. Plant Physiol. 11, 191). Це свідчить про агрономічну важливість цієї ознаки. Для того щоб істотно прискорити цвітіння та подальше зав'язування насіння, озимі зернові культури потребують достатньо тривалого періоду холоду. На відміну від *Arabidopsis*, однак, відомі наразі елементи їх реакції яровизації лише включають інших членів родини MADS-box генів, а також інші гени (Chouard (1960) (supra); Alexandre & Hennig (2008), supra; Kim et al (2009) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 25, 277). Відповідно, раніше було висловлено припущення, що реакція верналізації (яровизації) у зернових культур та справжніх дводольних еволюціонувала незалежно (Alexandre & Hennig (2008) (supra); Kim et al (2009)

(supra); Hemming & Trevaskis (2011) *Plant Sei.* 180, 447; Ream et al. (2013) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* doi:10.1101/sqb.2013.77.014449) і, відповідно, як правило, без залучення FLC.

FLC-подібні гени - не єдина підродина MADS-box генів із нез'ясованим походженням. В той час, як підродина SQUAMOSA (SQUA) та SEPALLATA (SEP) були ідентифіковані у всіх великих філогенетичних групах квіткових рослин, вони не були виявлені досі у жодного представника голонасінних, незважаючи на надзвичайно великий обсяг транскриптомних даних та інтенсивні зусилля, спрямовані на цільове клонування Rigault et al. (2011) *Plant Physiol.* 157:14-28; Melzer et al (2010) *Semin. Cell Dev Biol.* 21:118-128. У покритонасінних раунди поліплоїдизації (дуплікації всього генома), можливо, призвели до виникнення дуплікацій, які спостерігаються у генів із SQUA та SEP підродин

(Veron et al. (2007), *Mol. Biol. Evol.* 24:670-678; Shan et al (2009) *Mol. Biol. Evol.* 26:2229-2244; Jiao et al (2012) *Genome Biol.* 13:R3; Vekemans et al. (2012) *Mol. Biol. Evol.* doi: 10.1093/molbev/mss183). Члени підродина SQUA, як правило, є позитивними регуляторами переходу до флоральної стадії розвитку, оскільки вони контролюють утворення суцвіття та флоральних меристем (Bowman et al (1993) *Development*, 119(3):721-743). SEP гени діють як ключові регулятори розвитку флоральних органів, і частково у надлишковий спосіб із SQUA-подібними генами у процесі диференціації флоральної меристеми (Pelaz et al (2000) *Nature* 405:200-203; Kaufmann et al. (2009) *PLoS Biol.* 7, e1000090).

Greenup et al. ((2010) *Plant Physiol.* 153, 1062) описує ідентифікацію MADS-box білка-репресора переходу до флоральної стадії розвитку ячменю, чутливого до яровизації.

Winfield et al ((2009) *BMC Plant Biol.* 9, 55) описує зміни у транскриптомі пшениці, індуковані холодом та світлом, які призводять до переходу від фази вегетативного до фази генеративного росту.

WO2006/068432 розкриває регулятор часу цвітіння та/або видовження стебла, виділений із рису, ДНК конструкцію, яка містить цей регулятор, трансгенну рослину, її частину та рослинну клітину, трансформовану за допомогою ДНК конструкції, та способи контролю часу цвітіння та/або видовження стебла за допомогою цього регулятора.

З'ясування походження цієї енігматичної підродина FLC, а також з'ясування походження SEP та SQUA значною мірою можуть вплинути на наше розуміння еволюції квіткових рослин. Тут ми об'єднали метод геномного аналізу, оснований на синтенії генів, та філогенетичній реконструкції для розуміння історії еволюції цих підродин MADS-box генів. Це дає нам змогу ідентифікувати ортологи FLC у однодольних. Аналогічно до FLC у *Arabidopsis*, експресія цих FLC-подібних генів чутлива до тривалого періоду холоду. Ідентифіковане тандемне розташування підродин FLC, SEP і SQUA дає підставу висловити припущення щодо походження цих підродин шляхом древньої тандемної дуплікації, що відбулась до виникнення існуючих на сьогодні квіткових рослин, з наступними дуплікаціями сегментів, пов'язаними з раундами поліплоїдизації. Наші результати закривають важливу прогалину в нашому розумінні походження ключових регуляторних генів квіткових рослин.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

В одному аспекті цього винаходу, забезпечується спосіб модуляції (зміни) цвітіння, розвитку насіння та/або проростання насіння, такого як температурозалежне цвітіння, розвиток насіння та/або проростання насіння, у однодольних рослин, який включає етап зміни експресії та/або активності FLC гена та/або білка у вказаній рослині або частини рослини, органа рослини або рослинної клітини вказаній рослині. У наступному аспекті цього винаходу забезпечується спосіб одержання однодольної рослини, у якій час

цвітіння, розвиток насіння та/або проростання насіння, такі як температурозалежне цвітіння, розвиток насіння та/або проростання насіння, модулюються, вказаний спосіб, який включає експресію у вказаній рослині нуклеїнової кислоти, експресія якої призводить до зміненої експресії та/або активності FLC гена та/або білка у вказаній рослині. У наступному втіленні модуляція часу цвітіння, розвитку насіння, досягання насіння включає прискорення часу цвітіння, або модуляцію чи проростання насіння включає уповільнення проростання насіння.

У ще іншому аспекті забезпечуються способи згідно з винаходом, де зміна експресії та/або активності FLC гена та/або білка включає зниження експресії та/або активності FLC гена та/або білка у вказаній рослині, частині рослини, органі рослини або рослинній клітині. У навіть ще одному втіленні, вказане зниження експресії та/або активності FLC гена та/або білка включає експресію у вказаній рослині, частині рослини, органі рослини або рослинній клітині химерного гена, що включає наступні функціонально зв'язані елементи:

a. рослинний промотор,

b. нуклеїнову кислоту, яка в результаті транскрипції призводить до зниження експресії та/або активності FLC гена та/або білка, переважно ендегенного FLC гена та/або білка у

вказаній однодольній рослині, частині рослини, органі рослини або рослинній клітині, та, необов'язково

с. 3'-кінцеву ділянку залучену до термінації транскрипції та поліаденілування, функціональну у рослин.

5 У ще наступному втіленні, вказана нуклеїнова кислота кодує FLC "мовчазну" РНК, яка включає:

а. щонайменше 19 з 20 послідовних нуклеотидів нуклеотидної послідовності FLC гена, що присутній у вказаній однодольній рослині;

10 б. щонайменше 19 з 20 послідовних нуклеотидів комплементу нуклеотидної послідовності ендogenous FLC гена, присутнього у вказаній однодольній рослині; або

с. смислову ділянку, яка включає нуклеотидну послідовність із щонайменше 19 з 20 послідовних нуклеотидів нуклеотидної послідовності FLC гена, представлену у вказаній рослині та антисмислову ділянку, яка включає нуклеотидну послідовність із щонайменше 19 з 20 послідовних нуклеотидів комплементу нуклеотидної послідовності вказаного FLC гена, який присутній у вказаній рослині, де вказана смислова та антисмислова ділянки здатні утворювати ділянку двохланцюгової РНК, яка включає щонайменше 19 із 20 послідовних нуклеотидів.

У ще одному втіленні забезпечуються способи згідно з винаходом, які включають етап введення мутантного алеля ендogenous FLC гена, який не кодує функціональний FLC білок у вказаній рослині.

20 У наступному аспекті цього винаходу, забезпечується спосіб уповільнення (температурозалежного) цвітіння, розвиток насіння та/або прискорення (температурозалежного) проростання насіння у однодольних рослин, який включає етап зміни експресії та/або активності FLC гена та/або білка у вказаній рослині або частині рослини, органа рослини або рослинної клітини вказаній рослині. У наступному аспекті цього винаходу, забезпечується спосіб одержання однодольної рослини, у якій (температурозалежний) час цвітіння або розвитку насіння уповільнюється, або проростання насіння прискорюється, вказаний спосіб включає зміну експресії та/або активності FLC гена та/або білка у вказаній рослині. У наступному аспекті цього винаходу, вказана змінена експресія та/або активність FLC гена та/або білка включає підвищення експресії та/або активності FLC гена та/або білка у вказаній рослині, частині рослини, органі рослини або рослинній клітині. У ще подальшому втіленні, вказана підвищена експресія та/або активності FLC гена та/або білок включає експресію у вказаній рослині, частині рослини, рослинному органі або рослинній клітині химерного гена, який включає наступні функціонально зв'язані елементи:

а. рослинний промотор,

35 б. нуклеїнову кислоту, яка після транскрипції забезпечує підвищену активність та/або експресію FLC гена та/або білка у вказаній однодольній рослині, частині рослини, рослинному органу або рослинній клітині, і

с. необов'язково, 3'-кінцеву ділянку, функціональну у рослин.

У ще наступному втіленні, вказана нуклеїнова кислота кодує FLC білок.

40 Додаткове втілення забезпечує способи згідно з винаходом, в яких вказаною однодольною рослиною є злакова рослина, така як злакова рослина помірного клімату, така як, рослина пшениці.

У ще одному втіленні, кодуюча ділянка вказаного FLC гена містить нуклеотидну послідовність, яка має щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 і 17 або вказаний FLC білок містить амінокислотну послідовність, що має щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 або 18.

Також забезпечується химерний ген, як описано в способах винаходу, і рослина, частина рослини, орган рослини, рослинна клітина або насіння, які містять вказаний химерний ген.

50 Винахід також забезпечує однодольну рослину, частину рослини, орган рослини, рослинну клітину або насіння, які можуть бути одержані відповідно до способів згідно з винаходом, де експресія та/або активність FLC гена та/або білка була змінена у порівнянні з контрольною рослиною. Також забезпечується однодольна рослина, яка містить мутантний алель FLC гена, вказаний мутантний алель викликає зміну експресії та/або активності FLC білка, закодованого вказаним геном, у порівнянні з рослиною, яка не

містить вказану мутацію, яка, необов'язково, модулює (температурозалежний) час цвітіння, розвиток насіння, досягання насіння або проростання насіння у порівнянні з вказаною рослиною, яка не містить вказану мутацію.

60 Згідно з подальшим втіленням, FLC білок рослини згідно з винаходом має щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14,

16 і 18, або де вказаний FLC білок кодується нуклеотидною послідовністю, яка виявляє щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 та 17. У навіть ще одному втіленні, рослина згідно з винаходом - це злакова рослина, така як, злакова рослина помірного клімату, така як, рослина пшениці.

5 Також забезпечується спосіб для ідентифікації однодольної рослини, як, наприклад, сільськогосподарська зернова культура або сільськогосподарська зернова культура помірного клімату або рослина пшениці, зі зміненим (модульованим) (температурозалежним) часом цвітіння, який включає етапи:

10 а. забезпечення популяції однодольних рослин, наприклад, популяції, яку піддавали мутагенезу,

б. ідентифікації однієї або більше рослин з мутантним алелем FLC гена, таким як FLC ген, який має щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 та 17, або FLC ген, який кодує білок, що виявляє щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 або 18, та

15 с. ідентифікації серед вказаних рослин з мутантним алелем FLC гена, як, наприклад, FLC гена, який має щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 та 17, або FLC гена, який кодує білок, що виявляє щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 та 18, однієї або більше рослин, які мають змінений (температурозалежний) час цвітіння у порівнянні з рослиною того ж виду, який не включає вказаної мутації.

20 У наступному втіленні забезпечується FLC білок або його функціональний фрагмент, які можуть бути одержані із однодольної рослини, такої, як, наприклад, сільськогосподарська зернова рослина, як, наприклад, із рослини пшениці, як, наприклад, FLC білок, що має амінокислотну послідовність, яка виявляє щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 і 18.

У наступному втіленні забезпечується нуклеотидна послідовність, яка кодує FLC білок згідно з винаходом, така як молекула нуклеїнової кислоти, яка має щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 та 17.

30 Наступний аспект винаходу забезпечує використання химерного гена згідно з винаходом, білка згідно з винаходом або нуклеотидної послідовності згідно з винаходом для зміни (модуляції) (температурозалежного) часу цвітіння, розвитку насіння та/або проростання насіння у однодольної рослини, такої як злакова рослина, такої як злакова рослина помірного клімату, така як, рослина пшениці.

35 КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фігура 1: Консервативні тандемні розташування MADS-box генів у Amborella, Oryza, Brachypodium, Vitis, Populus і Solanum. Гени, які виявляють консервативну синтенію в межах всієї групи покритонасінних, представлені стрілочками зі специфічним символом і з'єднані вертикальними лініями, які позначені у верхній частині фігури. Локуси у незабарвлених стрілочках без символа не виявляють синтенії. SBP-подібні гени, які належать до різних монофілетичних груп, диференціюються різними символами. З лівого боку кожного геномного фрагмента наведені координати положення.

40 Фігура 2: Дерево максимальної правдоподібності FLC-подібних генів із SQUAMOSA-подібним геном в якості кореня. Числа, найближчі до кожного вузла, свідчать про значення бутстрепної підтримки із 100 непараметричних бутстрепів. Філогенетичний аналіз був проведений за допомогою програми PhyML 3.0.

Фігура 3: Експресія FLC гомологів у Brachypodium distachyon, BdMADS37 (a), BdODDSOC1 (b) та (d) і BdODDSOC2 (c) у відповідь на тривалий період холоду. Моніторинг експресії FLC-подібних генів у Brachypodium проводили з використанням полімеразно-ланцюгової реакції у режимі реального часу (qRT-PCR) у рослин, які піддавали експозиції до 6 тижнів при 4 °C (яровизовані) або 28 °C (контроль). Експресія у яровизованих зразків представлена ромбами, натомість контрольні зразки показані квадратами. (Скорочення: Преяр: перед-яровизація, 2т: два тижні, 4т: чотири тижні, 6т: шість тижнів). Планки похибок представляють стандартні похибки середнього значення трьох біологічних повторностей.

55 Фігура 4: Дані стосовно експресії та підтвердження функціональності FLC-подібних генів узагальнено і графічно представлено у спрощеній FLC філогенії. Гени, чутливі до яровизації, позначені Ф поряд із відповідним геном. (Філогенія базується на проведеному нами філогенетичному аналізі "максимальної правдоподібності" MADS-box генів MIKCS-типу).

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

60 Цей винахід оснований на ідентифікації FLC генів у однодольних рослин та регуляції їх

експресії за допомогою низьких температур. Новий підхід, який було застосовано вперше, дав змогу ідентифікувати FLC гени у однодольних рослин, такі як гени, сільськогосподарських зернових культур (помірного клімату), що, як вважали раніше, не

існують, базуючись на розташуванні консервативних тандемних повторів у геномах справжніх дводольних рослин між SEP3-, SEP1-, SQUA- та FLC-подібними генами, що було з'ясовано у цьому дослідженні. Шість FLC генів було ідентифіковано у *Triticum aestivum* (пшениця) і три FLC гени були ідентифіковані у *Brachypodium distachion*. Було встановлено, що у *Arabidopsis* FLC гени діють як репресори цвітіння та періоду спокою насіння. Відповідно, цей винахід відкриває новий і раніше невизнаний шлях для модуляції часу цвітіння, розвитку насіння, досягання насіння у однодольних рослин за допомогою зміни експресії FLC.

В одному аспекті цього винаходу, забезпечується спосіб для модуляції часу цвітіння, розвитку насіння, та/або проростання насіння у однодольних рослин, який включає етап зміни експресії та/або активності FLC гена та/або білка у вказаній рослини або частини рослини, органа рослини або рослинної клітини вказаної рослини. У наступному аспекті цього винаходу забезпечується спосіб для отримання однодольної рослини, у якої час цвітіння, розвиток насіння та/або проростання насіння змінюється (модулюється), вказаний спосіб який включає експресію у вказаній рослини нуклеїнової кислоти, експресія якої зумовлює змінену експресію та/або активність FLC гена та/або білка у вказаній рослини. Вказаний час цвітіння, розвитку насіння та/або проростання насіння може бути температурозалежний. У наступному втіленні, модуляція часу цвітіння включає прискорення часу цвітіння, розвитку насіння чи досягання насіння, або модуляція проростання насіння включає уповільнення проростання насіння.

Як тут використовується, термін "цвітіння", який поперемінне використовується з терміном "час цвітіння", стосується проміжку часу від проростання до появи суцвіття чи цвітіння. Модуляція цвітіння чи часу цвітіння у цьому відношенні, таким чином стосується модуляції (збільшення чи зменшення) періоду часу від проростання до появи суцвіття чи цвітіння. У кращому втіленні, винахід стосується модуляції (збільшення чи зменшення) температурозалежного цвітіння чи часу цвітіння.

Як тут використовується, "розвиток насіння", стосується розвитку від запліднення до досягання, включаючи розвиток зародка і досягання насіння. Розвиток насіння, як тут використовується, включає, зокрема, також досягання насіння, тобто, акумулювання запасуючої тканини в насінні. Модуляція розвитку насіння відповідно включає модулювання часу від запліднення до досягання насіння. У кращому втіленні винахід стосується модуляції (збільшення чи зменшення) температурозалежного розвитку насіння.

Як тут використовується, "проростання насіння", стосується появи (життєздатного) сіянця з насіння. Модуляція проростання насіння у цьому відношенні стосується модуляції (збільшення чи зменшення) тривалості періоду від набухання (експозиція до вологих умов, напр, шляхом контакту із середовищем для вирощування, таким як вирощування у ґрунті) до появи сіянця. У кращому втіленні, винахід стосується модуляції (збільшення чи зменшення) температурозалежного проростання насіння.

Має бути зрозуміло, що термін "FLC ген та/або білок" може означати точно один такий ген або білок, але також включає втілення, в якому розглядаються щонайменше один такий FLC ген та/або білок. Шість FLC генів було виявлено у *Triticum aestivum*, відповідно, для *T. Aestivum*, а також для інших однодольних рослин, які включають більше ніж один FLC ген, цей винахід у декількох втіленнях розглядає посилання на щонайменше один FLC ген та/або білок, однак також щонайменше на два, щонайменше на три, щонайменше на чотири, щонайменше на п'ять FLC або щонайменше на шість генів та/або білків. Якщо проводяться порівняльні посилання мутантного FLC гена/алеля з природно існуючим FLC геном та/або білком, зрозуміло, що у випадку, коли існує більше ніж один FLC ген та/або білок, посилання робиться на один із найвищою ідентичністю послідовності до мутантного FLC гена/алеля, який розглядається.

Термін "температурозалежний", що поперемінне використовується з терміном "індукований холодом", як тут використовується, стосується потреби певних видів рослин у періоді низької температури (холоду) для проходження певних процесів, наприклад, для того щоб цвітіння чи проростання насіння були активовані. Це необхідно передусім для видів рослин помірних широт, для того щоб вони були здатні перейти від зими до умов навколишнього середовища, які є оптимальними для репродукції (Amasino et al (2010), supra). Наприклад, озима пшениця потребує холодного періоду, який становить приблизно 8 тижнів перед індукцією цвітіння, тоді як для *Brachypodium* цей період становить приблизно 3-8 тижнів (Schwartz et al. (2010) Bioenergy Research 3: 38-46). Потрібна температура для такого прохолодного періоду, як правило, становить близько 4 °C.

У зв'язку із температурною залежністю, термін "яровизація", як тут використовується,

стосується експозиції рослини чи насіння до низьких температур упродовж генетичне детермінованого часу, для того щоб "запустити" цвітіння, розвиток насіння чи проростання насіння. Яровизація, таким чином, є, наприклад, набуття рослиною здатності цвісти навесні після експозиції до тривалого холодного зимового періоду. Після яровизації рослини набувають здатності до цвітіння, однак вони можуть потребувати додаткових сезонних стимулів чи тижнів росту, перед тим як вони дійсно зацвітуть. Багато рослин, які ростуть за умов помірного клімату, потребують яровизації та повинні пройти через період знижених зимових температур для ініціації чи прискорення процесу цвітіння. Це забезпечує репродуктивний розвиток та утворення насіння навесні та влітку, а не восени. Потрібний прохолодний період часто пов'язаний із холодними годинами. Типовими температурами для яровизації є температури 5 та 10 градусів за Цельсієм, однак за експериментальних умов часто використовується температура 4 градуси за Цельсієм.

Температурозалежне проростання стосується відсотка проростання насіння, після експозиції до конкретної температури, як, напр., описано у Chiang et al. 2009, *supra*.

FLC гени, також "Flowering Locus C гени" - це гени, які кодують FLC білки або "Flowering Locus C білки". FLC гени - це MADS-box гени. У *Arabidopsis thaliana*, FLC є центральним репресором переходу до флоральної стадії розвитку, де він інгібує цвітіння шляхом безпосередньої репресії активності центральних промоторів цвітіння, а саме SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION CONSTANS (SOC1), FLOWERING LOCUS D (FD) та FLOWERING LOCUS T (FT). У *Arabidopsis* FLC також контролює температурозалежне проростання насіння і природне варіювання в FLC локусі та у FLC експресії, асоційовані: природним варіюванням температурозалежного проростання (Chiang et al. 2009, *supra*) Термін "функціональний FLC білок" стосується активності FLC білка, який включає щонайменше одну та переважно більше ніж одну або навіть всі свої біологічні функції включаючи активацію або репресію експресії цільових послідовностей FLC по ход^ транскрипції (даунстрім), згадані у, напр. Deng et al., 2001 PNAS 108:6680-6685), або зг допомогою оцінювання зв'язування з партнерами взаємодії, такими як SVP (Lee et al. 2007, Genes Dev 21:397-402).

FLC генами, які представлені у однодольних, можуть бути будь-які FLC гени/ однодольних, як описано вище. Наприклад, FLC генами можуть бути FLC гени, як описане в Таблиці 1 нижче. FLC гени однодольних можуть також бути генами з кодуючою послідовністю, яка має щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 % щонайменше 95 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичності послідовності до SEQ ID NO: 1, або до SEQ ID NO: 3, або до SEQ ID NO: 5, або до SEQ ID NO: 7, або до SEQ ID NO: 9, або до SEQ ID NO: 11, або до SEQ ID NO: 13, або до SEQ ID NO: 15; або до SEQ ID NO: 17. Нг доповнення до ступеня ідентичності послідовності, як описано вище, такі FLC гени можуть також мати ту ж функціональність, що й гени будь-якої з-поміж SEQ ID №№: 1, 3, 5, 7, 9 11, 13, 15 та 17.

FLC білки можуть бути білками, закодованими FLC генами однодольних, як туї описано. Наприклад, FLC білки можуть бути FLC білками, закодованими FLC генами наведеними в Таблиці 1, як тут описано. FLC білки однодольних можуть також бути/ білками з амінокислотною послідовністю, яка має щонайменше 80 %, щонайменше 85 % щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичності послідовності до SEQ ID №: 2, або до SEQ ID №: 4, або до SEQ ID №: 6, або до SEQ ID №: 8, або до SEC ID №: 10, або до SEQ ID №: 12, або до SEQ ID №: 14, або до SEQ ID №: 16, або до SEQ IC №: 18.

FLC гени з інших видів однодольних рослин можуть бути ідентифіковані зг допомогою методів, описаних у Прикладі 2. Якщо FLC гени у певного виду однодольних рослин були ідентифіковані, ортологічні FLC гени у споріднених видів однодольних рослин або у інших культиварів чи різновидів можуть бути ідентифіковані за допомогою методів добре відомих з рівня техніки, напр., вирівнювань або вручну чи з використанням комп'ютерних програм, таких як BLAST (Altschul et al. (1990), Journal of Molecular Biology

215, 403-410), які підтримують Basic Local Alignment Search Tool або ClustalW (Thompson et al. (1994), Nucleic Acid Res., 22, 4673-4680), чи будь-якої іншої прийнятної програми, яка придатна для виконання вирівнювання послідовностей.

FLC гени у споріднених видів однодольних рослин чи у інших культиварів або різновидів можуть також бути ідентифіковані за допомогою гібридаційного зонда, який має нуклеотидні послідовності FLC гена чи його частини. Жорсткі умови гібридазації, такі як ті, що описані нижче, можуть бути використані для ідентифікації нуклеотидної послідовності, яка значною мірою є ідентичною до даної нуклеотидної послідовності. Наприклад, вказано, що FLC гени з інших видів однодольних рослин, ніж певні послідовності, розкриті у цій заявці, є значною мірою ідентичними або подібними, якщо вони можуть бути визначені шляхом гібридації за жорстких умов, переважно умов високої жорсткості. Умови жорсткості залежать від послідовності і можуть

бути різними за різних обставин. Як правило, умови жорсткості обираються таким чином, щоб вони були приблизно на 5 °C нижчими, ніж температурна точка плавлення (Т_т) для конкретної послідовності при визначеній іонній силі і рН. Т_т - це температура (за умов визначеної іонної сили та рН), при якій 50 % цільової послідовності гібридизує з досконало підібраним зондом. Як правило, обираються жорсткі умови, за яких сольова концентрація становить близько 0,02 молярної при рН 7 та температурі, яка становить щонайменше 60 °C. Зниження концентрації солей та/або підвищення температури підвищує умови жорсткості. Жорсткі умови для РНК-ДНК гібридизації (при Нозерн-блоттингу використовується зонд, напр., ЮОнт) - це ті умови, які включають щонайменше одне промивання в 0,2X SSC при 63 °C протягом 20 хв, або еквівалентні умови.

"Умови високої жорсткості" можуть бути забезпечені, наприклад, шляхом гібридизації при 65 °C у водному розчині, що містить 6x SSC (20x SSC містить 3,0 M NaCl, 0,3 M Na-цитрат, рН 7,0), 5x реактив Денгардта (100X реактив Денгардта містить 2 % Фікол, 2 % Полівініл піролідон, 2 % альбумін бичачої сироватки), 0,5 % додецилсульфат натрію (SDS) та 20 мкг/мл денатурованого носія ДНК (одноланцюгової ДНК риб'ячої сперми, з середньою довжиною 120-3000 нуклеотидів) як неспецифічної конкурентної речовини. Після гібридизації промивання "високої жорсткості" може бути проведене за декілька етапів, з кінцевим промиванням (близько 30 хв) при температурі гібридизації 0,2-0,1 x SSC, 0,1 % SDS.

Термін "умови помірної жорсткості" стосується умов, еквівалентних умовам гібридизації, що були вказані у вищеописаному розчині, однак при температурі близько 60-62 °C. Промивання "помірної жорсткості" можуть бути проведені при температурі гібридизації в 1x SSC, 0,1 % SDS.

Термін "низька жорсткість" стосується умов, еквівалентних умовам гібридизації, що були у вищеописаному розчині при температурі близько 50-52 °C. Промивання низької жорсткості може бути проведене при температурі гібридизації в 2x SSC, 0,1 % SDS. Див.

також Sambrook et al. (1989) та Sambrook and Russell (2001).

Однодольні рослини, відомі також як однодольні або однодольні рослини, є добре відомі з рівня техніки і являють собою рослини, які мають одні сім'ядолю в їхньому насінні. Однодольні рослини включають роди *Oryza* sp. (який включає рис), *Zea* sp. (який включає кукурудзу), *Saccharum* sp. (який включає цукрову тростину), *Triticum* sp. (який включає пшеницю), *Hordeum*, *Secale*, *Avena*, *Lolium*, *Festuca* *Brachypodium distachion*, *Musa* sp. (який включає банани).

Прискорення (температурозалежного) цвітіння або розвитку насіння (де розвиток насіння, як тут використовується, включає, зокрема, дозрівання насіння) може бути прискоренням (будь-який з них двох) на значний час, такий як від 1 до 60 днів, залежно від джерела надходження зразка, у порівнянні з часом цвітіння, розвитком насіння (включаючи досягання насіння) рослини з експресією FLC дикого типу та активністю, таким як прискорення приблизно від 1 до 60 днів, приблизно від 10 до 50 днів, приблизно від 1 до 20 днів, приблизно від 20 до 40 днів, приблизно від 40 до 60 днів, напр., прискоренням приблизно, що становить 5 днів, приблизно 10 днів, приблизно 20 днів, приблизно 30 днів, приблизно 40 днів, приблизно 50 днів або приблизно 60 днів. Уповільнення проростання насіння - може бути уповільненням проростання насіння на приблизно до 4 тижнів у порівнянні з проростанням насіння рослини з експресією FLC дикого типу та активністю, таким як уповільнення приблизно від 1 до 4 тижнів, приблизно від 1 до 2 тижнів, приблизно від 2 та 3 тижнів, приблизно від 2 до 4 тижнів, напр., уповільненням приблизно від 1 тижня, приблизно 2 тижнів, приблизно 3 тижнів або приблизно 4 тижнів. Уповільнення проростання насіння може також бути таким, що попереджає проростання насіння взагалі, тобто насіння не проростає. Рослини з експресією та активністю FLC дикого типу являють собою рослини, що мають експресію та/або активність щонайменше одного FLC гена, оскільки він найчастіше трапляється у природі. Вказані рослини не включають гетерологічну ДНК для підвищення чи зниження FLC експресії та/або активності, і вказані рослини не включають нокаутні FLC алелі.

Прискорення температурозалежного цвітіння у цьому відношенні також стосується скорочення тривалості холодного періоду, потрібного для індукції цвітіння. Тривалість холодного періоду, потрібного для індукції цвітіння, може бути зменшена до 8 тижнів, залежно від джерела надходження зразка, у порівнянні з тривалістю холодного періоду, необхідного для індукції цвітіння рослини з експресією та активністю FLC дикого типу, зменшення тривалості холодного періоду може становити між 1 та 8 тижнями, між 1 та 4 тижнями, між 4 та 8 тижнями, між 2 та 6 тижнями, між 3 та 5 тижнями, напр., зменшення до приблизно 1 тижня, до приблизно 2 тижнів, до приблизно 3 тижнів, до приблизно 4 тижнів, до приблизно 5 тижнів або до приблизно 6 тижнів, до приблизно 7 тижнів, або до приблизно 8 тижнів. Зменшення тривалості холодного періоду, потрібного для індукції цвітіння, у цьому відношенні може також означати повну елімінацію потреби у наявності прохолодного періоду перед цвітінням. Рослини з

експресією та активністю FLC дикого типу - це рослини, які мають експресію та/або активність щонайменше одного FLC гена, оскільки він найчастіше трапляється у природі. Вказані рослини не включають гетерологічну ДНК для підвищення чи зниження FLC експресії та/або активності, і вказані рослини не включають нокаутні FLC алелі.

5 Прискорення температурозалежного цвітіння у цьому відношенні також стосується підвищення найнижчої температури холодного періоду, потрібного для індукції цвітіння. Найнижча температура холодного періоду, потрібного для індукції цвітіння, може, залежно від джерела надходження зразка, бути підвищена до 10 °C, як, наприклад, величина підвищення може становити між 1 і 10 °C, між 5 і 10 °C, між 1 і 5 °C, між 3 і 8 °C, між 4 і 6 °C, напр., величина
10 підвищення - приблизно на 2 °C, приблизно на 4 °C, приблизно на 5 °C, приблизно на 6 °C, приблизно на 8 °C, приблизно на 10 °C, у порівнянні з найнижчими температурами, потрібними для індукції цвітіння рослини з "диким типом" FLC експресії та активності. Підвищення найнижчої температури холодного періоду, потрібного для індукції цвітіння, у цьому відношенні може також означати повну елімінацію потреби у наявності холодного періоду перед цвітінням.
15 Рослини з FLC експресією та активністю "дикого типу" - це рослини, які мають експресію та/або активність щонайменше одного FLC гена, оскільки він найчастіше трапляється у природі. Вказані рослини не включають гетерологічну ДНК для підвищення чи зниження FLC експресії та/або активності, і вказані рослини не включають нокаутні FLC алелі.

Терміни "експресія у вказаній рослині", а також "експресія в рослині, частині рослини, рослинному органі або рослинній клітині", як використовується скрізь у даній заявці, стосуються присутності продукту експресії нуклеїнової кислоти, що утворюється внаслідок транскрипції вказаної нуклеїнової кислоти. У зв'язку з деякими втіленнями способу згідно з винаходом, термін може додатково включати введення химерного гена, який включає нуклеїнову кислоту, яка буде експресуватись у рослині.

25 У ще іншому аспекті забезпечуються способи згідно з винаходом, де зміна експресії та/або активності FLC гена та/або білка включає зниження експресії та/або активності FLC гена та/або білка у вказаній рослині, частині рослини, органі рослини або рослинній клітині. У навіть наступному втіленні, вказане зниження експресії та/або активності FLC гена та/або білка включає експресію у вказаній рослині, частині рослини, рослинному органі або рослинній
30 клітині химерного гену, який включає наступні функціонально зв'язані елементи:

a. рослинний промотор,

b. нуклеїнову кислоту, яка в результаті транскрипції забезпечує утворення молекули РНК, яка призводить до зниження експресії та/або активності ендogenous FLC гена та/або білка, тобто, FLC гена, який присутній у природному стані (тобто, ендogenous) у вказаній

35 одностільній рослині, частині рослини, рослинному органі або рослинній клітині, та, необов'язково

c. 3'-кінцеву ділянку, залучену до термінації транскрипції та поліаденілування, функціональну у рослин.

Химерний ген - це штучний ген, утворений функціонально зв'язаними фрагментами
40 неспоріднених генів чи іншими нуклеотидними послідовностями. Іншими словами, "химерний ген" означає ген, який зазвичай не виявлено у виду рослин, і стосується будь-якого гена, в якому промотор або одна чи більше інших регуляторних ділянок гена не пов'язані у природі з частиною чи всією нуклеїновою кислотою, яка транскрибується, тобто є гетерологічним стосовно транскрибованої нуклеїнової кислоти. Термін "гетерологічний" стосується
45 взаємозв'язку між двома або більше нуклеотидними або білковими послідовностями, які походять з різних джерел. Наприклад, промотор є гетерологічним стосовно функціонально зв'язаної нуклеотидної послідовності, такої як кодуєча послідовність, якщо така комбінація у нормальному стані не виявлена у природі. Крім того, конкретна послідовність може бути "гетерологічною" по відношенню до клітини чи організму, в який вона вставляється (тобто у
50 природному стані не трапляється у цієї конкретної клітини чи організму). Наприклад, химерний ген, який тут розкривається, є гетерологічною нуклеїновою кислотою.

Химерний ген може також включати послідовності термінації транскрипції або поліаденілування, функціональні у рослинній клітині, зокрема, в одностільній рослині, більш переважно, у злаковій культурі чи рослинній клітині пшениці. Як послідовність термінації
55 транскрипції або поліаденілування може бути використана будь-яка відповідна послідовність бактеріального походження, як, наприклад, pos термінатор *Agrobacterium tumefaciens*, вірусного походження, такий як, наприклад CaMV 35S термінатор, або рослинного походження, як, наприклад, гістоновий термінатор, як описано в опублікованій заявці на патент EP 0 633 317 A1.

Молекула РНК, яка призводить до зниження експресії та/або активності FLC гена та/або
60 білка, може бути молекулою РНК, що кодує білок, який інгібує експресію та/або активність

вказаного FLC білка. Далі, вказана молекула РНК, яка призводить до зниження експресії та/або активності FLC гена та/або білка, може також бути молекулою РНК, яка інгібує експресію гена, який є активатором експресії та/або активності вказаного FLC білка. Наприклад, FRIGIDA із *Arabidopsis* сприяє тому, що FLC та FCA у *Arabidopsis* та інші члени автономного шляху активації комплементу впливають на зниження рівнів FLC у *Arabidopsis* (Michaels and Amasino 2001, Science 290: 344-347). Вказана молекула РНК, що інгібує експресію та/або активність FLC гена та/або білка, може також бути молекулою РНК, яка безпосередньо інгібує експресію та/або активність FLC гена та/або білка, як, наприклад, РН, яка опосередковує сайленсинг вказаного FLC гена.

Зниження експресії та/або активності FLC гена та/або білка може бути зниженням кількості функціонального FLC білка, який утворюється. Вказане зниження може бути зниженням щонайменше на 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 100 % (тобто функціональний FLC білок не утворюється в клітині) у порівнянні з кількістю функціонального FLC білка, який продукується клітиною з рівнями FLC експресії та активності "дикого типу". Вказане зниження експресії та/або активності може бути конститутивним зниженням кількості функціонального FLC білка, який утворюється. Вказане зниження може також бути тимчасовим/індуцибельним зниженням кількості функціонального FLC білка, який утворюється. Кількість функціонального FLC білка (FLC активність), а також з'ясування факту, чи є FLC білок функціональним, може, напр., бути визначена шляхом оцінювання експресії/активації "даунстрім" цільових ділянок FLC будь-якої з "мішеней", згаданим, напр., у Deng et al., 2001 PNAS 108:6680-6685), або шляхом оцінювання зв'язування FLC з партнером по взаємодії, таким як SVP (Lee et al., 2007, Genes Dev 21:397-402).

Експресія та/або активність FLC гена та/або білка може легко бути знижена або елімінована шляхом транскрипційного або посттранскрипційного сайленсингу експресії ендегенних FLC генів. З цією метою і в межах химерного гена, описаного вище, "мовчазна" молекула РНК вводиться в рослинні клітини, в яких "мішенню" є ендегенні FLC кодуєчі гени. Як тут використовується, "сайленсинг РНК" або "сайленсинг молекули РНК" стосується будь-якої молекули РНК, яка після введення в рослинну клітину знижує експресію цільового гена. Такі "мовчазні" молекули РНК можуть, напр., бути так званіми "антисмисловими РНК", в результаті чого молекула РНК включає послідовність із щонайменше 20 послідовних нуклеотидів, які виявляють 95 % ідентичності послідовності до комплементу послідовності цільової нуклеїнової кислоти, переважно кодуєчої послідовності цільового гена. Однак антисмислова РНК може також бути спрямована на регуляторні послідовності цільових генів, включаючи промоторні послідовності та сигнали термінації транскрипції та поліаденілування. "Мовчазні" молекули РНК також включають так звані "сміслові РНК", в результаті чого молекула РНК включає послідовність із щонайменше 20 послідовних нуклеотидів, яка має 95 % ідентичності послідовності до послідовності цільової нуклеїнової кислоти. Іншою "мовчазною" РНК може бути "неполіаденільована РНК", яка включає щонайменше 20 послідовних нуклеотидів, які мають 95 % ідентичності послідовності до комплементу послідовності цільової нуклеїнової кислоти, як описано в WO01/12824 або US6423885 (обидва документи включені тут шляхом посилання). Ще інший тип "мовчазної" молекули РНК, як описано в WO03/076619 (включений тут шляхом посилання), який включає щонайменше 20 послідовних нуклеотидів, які мають щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % або 100 % ідентичності послідовності до послідовності цільової нуклеїнової кислоти або її комплементу, а також включає

переважно двохланцюгову ділянку, як описано в WO03/076619 (включаючи переважно двохланцюгові ділянки, що несуть клітинний сигнал внутрішньоядерної локалізації з віроїду веретеноподібності бульб картоплі, або несуть CUG тринуклеотидні повтори). "Мовчазна" РНК може також бути двохланцюговою РНК, яка включає смисловий та антисмисловий ланцюги, як тут визначено, де смисловий та антисмисловий ланцюги здатні до спарювання основ одна з однією, утворюючи ділянку двохланцюгової РНК (переважно вказані щонайменше 20 послідовних нуклеотидів смислової та антисмислової РНК є комплементарними один до одного). Сміслова та антисмислова ділянки можуть також бути представлені в одній молекулі РНК, так що шпилькова РНК (шпРНК) може бути утворена смисловою та антисмисловою ділянками, утворюючи ділянку двохланцюгової РНК. ШпРНК добре відомі з рівня техніки (див., напр., WO99/53050, включений тут шляхом посилання). ШпРНК може бути класифікована як довга шпРНК, що має довгі смислові та антисмислові ділянки, які можуть бути головним чином комплементарними, але не повинні бути повністю комплементарними (як правило, більше ніж приблизно 200 бп, варіюючи в інтервалі між 200-1000 ʒр (мільярд пар)). шпРНК може також бути досить короткою, завдовжки від приблизно 30 приблизно до 42 ʒр, але не довшою, ніж 94

бр (див. W004/073390, включений тут шляхом посилання). ІшпРНК - це шпилькова РНК, що містить інтрон, яка має ту ж саму загальну структуру, що й шпРНК, але молекула РНК додатково включає інтрон у петлі шпильки, що здатний бути сплайсований у клітині, в якій ІшпРНК експресується. Використання інтрона мінімізує розмір петлі у шпильковій молекулі РНК після сплайсингу, і це збільшує ефективність інтерференції. Див., наприклад, Smith et al (2000) Nature 407:319-320. В дійсності, Smith et al, виявили 100 % супресію експресії ендегенного гена, використовуючи ішпРНК-опосередковану інтерференцію. У деяких втіленнях, інтрон - це ADHI інтрон 1. Способи для використання ішпРНК-інтерференції для інгібування експресії ендегенних генів рослин описуються, наприклад, у Smith et al, (2000) Nature 407:319-320; Waterhouse and Helliwell, (2003) Nat. Rev. Genet. 4:29-38; Helliwell and Waterhouse, (2003) Methods 30:289-295 та US2003180945, кожен з яких включений тут шляхом посилання. Аналіз тимчасової експресії репліконів для визначення ефективності шпРНК конструкцій стосовно сайленсингу генної експресії *in vivo* був описаний Panstruga, et al. (2003). Химерний ген для шпРНК інтерференції може також бути сконструйований таким чином, що смислова послідовність та антисмислова послідовність не відповідають ендегенній РНК. У цьому втіленні, смислова та антисмислова послідовності фланкують послідовність петлі, що включає нуклеотидну послідовність, яка відповідає всій або частині ендегенної матричної (інформаційної) РНК цільового гена, присутнього в рослині. Таким чином, це ділянка петлі детермінує специфічність РНК інтерференції. Див., наприклад, WO0200904, включений тут шляхом посилання.

"Мовчазна" молекула РНК може також бути штучною мікромолекулою РНК, як описано, напр., у W02005/052170, WO2005/047505 або US 2005/0144667, чи транс-активуючою малою інтерферующею РНК (та-міРНК), як описано в WO2006/074400 (всі документи включені тут шляхом посилання).

У межах химерних генів винаходу, може бути використаний *als* амплікон химерних генів. Амплікон химерних генів згідно з винаходом включає послідовність, яка походить із рослинного вірусу, що містить весь або частину цільового гена, але, як правило, не всі гени нативного вірусу. Вірусні послідовності, присутні у продукті транскрипції химерного гена, забезпечують ініціацію власної реплікації продуктів транскрипції. Транскрипти, які продукуються ампліконом, можуть бути смисловими або антисмисловими по відношенню до цільової послідовності. Способи використання ампліконів для інгібування експресії ендегенних генів рослин описані, наприклад, в US6635805, який включений тут шляхом посилання.

У деяких втіленнях, нуклеїнова кислота, яка експресується химерним геном винаходу, є каталітичною РНК або має рибозимну активність, специфічну щодо цільової послідовності. Таким чином, полінуклеотид викликає деградацію матричної РНК, транскрибованої з цільового гена /послідовності, що призводить до зниження експресії білка, який міститься в рослині. Цей спосіб описується, наприклад, в US4987071, включеному тут шляхом посилання.

В одному втіленні, нуклеїнова кислота, яка експресується химерним геном винаходу, кодує білок "цинкові пальці", який зв'язується з геном, закованим вказаним білком, що призводить до зниження експресії цільового гена. У конкретних втіленнях, білок "цинкові пальці" зв'язується з регуляторною ділянкою вказаного гена. В інших втіленнях, білок "цинкові пальці" зв'язується з матричною РНК, яка кодує вказаний білок, попереджаючи, такими чином, його трансляцію. Способи відбору сайтів для таргетингу білками "цинкові пальці" були описані, наприклад, у US6453242, а способи використання білків "цинкові пальці" для інгібування експресії генів у рослин описуються, наприклад, в US2003/0037355, кожен з яких включений тут шляхом посилання.

В іншому втіленні, нуклеїнова кислота, яка експресується химерним геном винаходу, кодує TALE білок, який зв'язується з геном, який кодує білок, що виявляє активність FLC білка, присутнього в рослині, обумовлюючи зниження експресії гена. У конкретних втіленнях, TALE білок зв'язується з регуляторною ділянкою вказаного гена. У інших втіленнях, TALE білок зв'язується з інформаційною РНК, яка кодує вказаний білок та попереджає її трансляцію. Способи для відбору сайтів для таргетингу за допомогою TALE білків були описані, напр., у Moscou MJ, Bogdanove AJ (2009) (A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science 326:1501) and Morbitzer R, Romer P, Boch J, Lahaye T (2010) (Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. Proc Natl Acad Sci USA 107:21617-21622).

У деяких втіленнях, для того щоб понизити чи зменшити експресію та/або активність FLC гена та/або білка, поліпептид або нуклеїнова кислота, що кодує молекулу РНК, яка транслюється в поліпептид, може бути введена в рослину з химерним геном згідно з винаходом, де поліпептид здатний до безпосереднього зниження експресії та/або активності вказаного FLC білка, тобто химерний ген кодує інгібуючі білки або поліпептиди.

В одному втіленні, таким FLC інгібуючим білком або поліпептидом може бути антитіло (включаючи нанотіло тощо), яке зв'язується з FLC білком, присутнім у рослині, та зменшує його активність. В іншому втіленні, зв'язування антитіла призводить до підвищення оновлення комплексу антитіла клітинними механізмами контролю якості. Експресія антитіл в рослинних клітинах та інгібування молекулярного шляху експресії та зв'язування антитіл з білками в рослинних клітинах добре відомі з рівня техніки. Див., наприклад, Conrad and Sonnewald, (2003) Nature Biotech. 21:35-36, включений тут шляхом посилання.

В іншому втіленні, такий інгібуючий білок або поліпептид може також бути домінантним негативним FLC білком чи фрагментом білка.

В альтернативному втіленні, зменшення кількості функціонального FLC білка можна досягти за допомогою контакту рослини або рослинної клітини з молекулами, які втручаються (інтерферують) у функцію FLC білка, представленого в рослині, напр., запускаючи агрегацію цільового білка (інтерферуючі пептиди), як, напр., описано в WO2007/071789 та WO2008/148751.

У навіть наступному втіленні, зниження експресії та/або активності FLC гена та/або білка можна досягти шляхом контакту рослини чи рослинної клітини з так званими альфатілами, специфічними стосовно FLC білка, присутнього в рослині, тобто неприродними білковими молекулами, які можуть бути антагоністами білкових функцій, як, напр., описується в WO2009/030780, WO2010/066740 та WO2012/092970.

В альтернативних втіленнях, зниження експресії та/або активності FLC гена та/або білка можна досягти шляхом інгібування експресії вказаного FLC білка, присутнього у рослині. Інгібування експресії вказаного FLC гена та/або білка можна індукувати в бажаний момент, використовуючи спрей (системне застосування) з інгібуючими нуклеїновими кислотами, як, наприклад, молекули РНК або ДНК, які функціонують у РНК-опосередкованому генному сайленсингу (подібно до описаних вище молекул), як, напр., описано в WO2011/112570 (включені тут шляхом посилання).

Таким чином, у наступному втіленні, химерний ген кодує молекулу РНК, яка включає:

а. щонайменше 19 з 20 послідовних нуклеотидів нуклеотидної послідовності FLC гена, присутнього у вказаній однодольній рослині;

б. щонайменше 19 з 20 послідовних нуклеотидів комплементу нуклеотидної послідовності FLC гена, присутнього у вказаній однодольній рослині; або

с. смислову ділянку, яка включає нуклеотидну послідовність із щонайменше 19 з 20 послідовних нуклеотидів нуклеотидної послідовності FLC гена, присутнього у вказаній рослині, та антисмислову ділянку, яка включає нуклеотидну послідовність із щонайменше

19 з 20 послідовних нуклеотидів комплементу нуклеотидної послідовності вказаного FLC гена, присутнього у вказаній рослині, де вказана смислова та антисмислова ділянки здатні до утворення ділянки двохланцюгової РНК, яка включає вказані щонайменше 19 з 20 послідовних нуклеотидів.

Таким чином, молекула РНК може включати щонайменше 19 із 20 послідовних нуклеотидів (комплементу) нуклеотидної послідовності, яка має щонайменше 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 та 17, або молекула РНК може включати щонайменше 19 із 20 послідовних нуклеотидів (комплементу) нуклеїнової кислоти, яка кодує білок, що виявляє щонайменше 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичності послідовності до до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 та 18.

В ще іншому варіанті втілення, забезпечуються способи згідно з винаходом, які включають етап введення нокаутного алеля ендегенного FLC гена.

"Нокаутний алель ендегенного FLC гена" або "нокаутний FLC алель", як тут використовується, являє собою FLC алель, який кодує нефункціональний FLC білок (тобто, білок, який не має FLC активності), чи призводить до істотно зниженої кількості FLC білка (шляхом, наприклад, мутації в регуляторній ділянці, такий як промотор), чи який кодує FLC білок із суттєво зниженою активністю. Вказаний "нокаутний FLC алель" може бути мутантний FLC алель, який може не кодувати FLC білок чи може кодувати нефункціональний FLC білок. Алель може також бути названий як неактивний алель.

Вказана "суттєво знижена кількість FLC білка" може бути зниженням кількості (чи рівнів) FLC білка, що продукується клітиною, яка включає нокаутний FLC алель, щонайменше на 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 100 % (тобто FLC білок не продукується алелем) у порівнянні з кількістю FLC білка, який продукується FLC алелем дикого типу. Кількості чи рівні FLC, напр., кількість транскрипта (напр. мРНК) чи білка може бути виміряна відповідно до різних способів, відомих із рівня техніки, таких як, (кількісні) РЧ-ПЛР, Нозерн-блоттинг, аналіз експресії генів за допомогою ДНК-мікрочіпів, Вестерн-блоттинг, EI_ІЗА тощо.

"Суттєво знижена активність" - може бути зниження активності FLC білка, що продукується клітиною, яка включає нокаутний FLC алель, щонайменше на 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 100 % (тобто активність FLC відсутня) у порівнянні з FLC активністю FLC алеля "дикого типу". Кількісний аналіз FLC активності описується в іншому місці у цій заявці.

5 "FLC алель дикого типу", як тут використовується, стосується типової форми алеля, у якій він найчастіше трапляється у природі, як, наприклад, FLC алелі, описані у цій заявці, напр. SEQ ID №№ 1-18 чи будь-яка послідовність, наведена у таблиці 1.

В основному, будь-яка мутація у нуклеотидних послідовностях FLC дикого типу, що призводить до утворення FLC білка, який включає щонайменше одну амінокислотну інсерцію, делецію та/або заміщення порівняно з FLC білком дикого типу, може привести до істотно зниженої біологічної активності або до повної її відсутності. Однак, зрозуміло, що певні мутації в FLC білку найбільш ймовірно приводять до повної відміни біологічної активності FLC білка, як, наприклад, мутації, в результаті яких істотні частини функціональних доменів, таких як, наприклад, MADS домени втрачаються. MADS-домени відповідальні за зв'язування ДНК шляхом гомо- або гетеродимеризації, а її відсутність таким чином пошкоджує у напрямку "даунстрім" регуляторні функції FLC фактора транскрипції.

"Мутантний FLC ген" або "мутантний FLC алель" стосується FLC генів чи алелів, які включають одну або більше мутацій, такий як "місєнс-мутація", "нонсенс-мутація" чи "мутація СТОП-кодону" (включаючи мутацію, яка не призводить до утворення функціонального FLC білка ("нокаутний алель FLC гена"), "інсерційна мутація", "делеційна мутація" або "мутація зі зміщення рамки зчитування" (останні дві, включаючи одну або більше мутацій, призводять до утворення "нокаутного алеля FLC гена") стосовно FLC гена чи алеля дикого типу, як, наприклад, FLC гени та алелі, що описані у цій заявці, напр., як представлено послідовностями SEQ ID №№ 1-18 або в інших послідовностях, наведених у таблиці 1.

25 Нонсенс-мутація в FLC алелі, як тут використовується, - це мутація в FLC алелі, в результаті якої один або більше стоп-кодонів вводяться у кодуючу ДНК та відповідну послідовність мРНК відповідного FLC алеля дикого типу. Стоп-кодони трансляції - це TGA (UGA у мРНК), TAA (UAA) і TAG (UAG). Таким чином, будь-яка мутація (делеція, інсерція чи заміщення), які приводять до утворення стоп-кодону у рамці зчитування кодуючої послідовності, призводять до термінації трансляції та усичення амінокислотного ланцюга. Таким чином, повністю нокаутний мутантний FLC алель може включати нонсенс-мутацію, де стоп-кодон в рамці зчитування вводиться в послідовність кодонів FLC в результаті одонуклеотидного заміщення, як, наприклад, мутація CAG на TAG, TGG на TAG, TGG -на TGA, або CAA на TAA. Альтернативно, повністю нокаутний мутантний FLC алель може включати нонсенс-мутацію, де стоп-кодон в рамці зчитування вводиться в послідовність стоп-кодону в FLC внаслідок двонуклеотидного заміщення, як, наприклад, мутація CAG на TAA, TGG на TAA, або CGG на TAG чи TGA. Повністю нокаутний мутантний FLC алель може також включати нонсенс-мутацію, де стоп-кодон в рамці зчитування вводиться в послідовність стоп-кодону в FLC внаслідок трьонуклеотидного заміщення, такого як мутація CGG на TAA. Усичений білок втрачає амінокислоти, закодовані кодуючою ДНК, у напрямку "даунстрім" від мутації (тобто, у С-термінальній частині FLC білка) і підтримує амінокислоти, закодовані кодуючою ДНК, у напрямку "апстрім" від мутації (тобто, N-термінальною частиною FLC білка).

45 Місєнс-мутація в FLC алелі, як тут використовується, являє собою будь-яку мутацію (делецію, інсерцію чи заміщення) в FLC алелі, в результаті якої один або більше кодонів змінюються в кодуючій ДНК і у відповідній мРНК послідовності відповідного FLC алеля дикого типу, що призводить до заміщення однієї або більше амінокислот у FLC білку дикого типу для однієї або більше амінокислот у мутантному FLC білку.

50 Мутація зі зміщенням рамки зчитування в FLC алелі, як тут використовується, являє собою мутацію (делецію, інсерцію, дуплікацію одного або більше нуклеотидів тощо) в FLC алелі, що призводить до того, що нуклеотидна послідовність транслюватиметься в іншій рамці, розташованій нижче від мутації.

"Інсерційна мутація" присутня, якщо один або більше кодонів додаються до кодуючої послідовності нуклеїнової кислоти, що призводить до присутності однієї або більше амінокислот у трансльованому білку, в той час як "делеційна мутація" має місце, якщо один або більше кодонів видаляються із кодуючої послідовності нуклеїнової кислоти, що призводить до делеції однієї або більше амінокислот у білка, що транслюється.

60 Вказаний мутантний алель може бути введений у вказану рослину, напр, за допомогою мутагенезу. "Мутагенез", як тут використовується, стосується процесу, у процесі якого щодо рослинних клітин застосовують методику, яка індукє мутації в ДНК клітин, таку як контакт із мутагенним агентом, таким як хімічна речовина (така як етилметилсульфонат (EMS)),

етилнітрозосечовина (ENU), тощо) або іонізуюче опромінення нейтронами (такими як мутагенез за допомогою швидких нейтронів, тощо), альфа-променями, гама-променями (такими як ті, що забезпечуються джерелом Cobalt 60), рентгенівське опромінення, УФ-опромінення тощо), Т-ДНК інсерційний мутагенез (Azpiroz-Leehan et al. (1997) Trends Genet 13:152-156), транспозонний мутагенез (McKenzie et al. (2002) Theor Appl Genet 105:23-33), або мутагенез в культурі тканин (індукція соматоклональних варіацій), або комбінація двох чи більше з них. Таким чином, бажаний мутагенез одного або більше FLC генів чи алелів може бути здійснений з використанням одного з вищенаведених способів. В той час як мутації, що викликані опроміненням, часто являють собою великі делеції чи інші великі uszkodження, такі як транслокації або складні перебудови, мутації, обумовлені дією хімічних мутагенів, часто становлять більш дискретні uszkodження, такі як точкові мутації. Наприклад, EMS алкілує гуанінові основи, що призводить до неправильного спаровування основ: алкілований гуанін буде спаровуватись з тиміновою основою, що призводить, передусім, до переходів G/C у A/T. Після мутагенезу рослини отримують із оброблених клітин за допомогою загальновідомих методик. Наприклад, отримане насіння може бути висаджене відповідно до традиційних агрономічних методик; після подальшого запилення на рослинах утворюється насіння.

Додаткове насіння, яке утворюється в результаті такого запилення у цьому та наступному поколіннях, може бути зібране та піддане скринінгу на присутність мутантних FLC алелів. Відомі декілька методик скринінгу специфічних мутантних алелів, напр., DeleteageneTM (Delete-a-gene; Li et al., 2001, Plant J 27: 235-242) використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для скринінгу делеційних мутантів, отриманих за допомогою мутагенезу з використанням швидких нейтронів, програмного забезпечення TILLING (для цілеспрямованого пошуку локальних uszkodжень в геномах; McCallum et al., 2000, Nat Biotechnol 18:455-457) ідентифікування EMS-індукованих точкових мутацій, тощо. Додаткові методики для скринінгу наявності специфічних мутантних DA1 алелів описуються у розділі Приклади нижче.

Вказаний мутантний алель може також бути введений за допомогою методик генного таргетингу. Термін "таргетинг гена" стосується тут спрямованої модифікації гена, для чого використовуються такі механізми, як гомологічна рекомбінація, репарація помилково спарених нуклеотидів або сайт-спрямований мутагенез. Спосіб може бути використаний для заміщення, інсерції та делеції ендегенних послідовностей або послідовностей, раніше введених у рослинні клітини. Методи для таргетингу гена можна знайти, наприклад, в, WO 2006/105946 або WO2009/002150.

Вказаний мутантний алель також може бути введений шляхом інтрогресії мутантного алеля у вказаній рослині.

У наступному аспекті цього винаходу забезпечується спосіб для уповільнення (температурозалежного) часу цвітіння та/або розвитку насіння та/або прискорення проростання насіння, у однодольних рослин, який включає етап зміни експресії та/або активності FLC гена та/або білка у вказаній рослині чи частини рослини, органу рослини або рослинної клітини вказаної рослини. У наступному аспекті цього винаходу, забезпечується спосіб для отримання однодольної рослини, у якій час настання часу цвітіння або розвитку насіння уповільнюється та/або проростання насіння прискорюється, вказаний спосіб включає зміну експресії та/або активності FLC гена та/або білка у вказаній рослині. У наступному аспекті цього винаходу вказана зміна експресії та/або активності FLC гена та/або білка включає підвищення експресії та/або активності FLC гена та/або білка у вказаній рослині, частині рослини, органі рослини або рослинній клітині. У ще наступному втіленні, вказана підвищена експресія та/або активність FLC гена та/або білка включає експресію у вказаній рослині, частині рослини, рослинному органі або рослинній клітині химерного гена, який включає наступні функціонально зв'язані елементи:

а. рослинний промотор,

б. нуклеїнову кислоту, яка в результаті транскрипції забезпечує підвищену активність та/або експресію FLC гена та/або білка у вказаній однодольній рослині, частині рослини, рослинному органі або рослинній клітині, і

с. необов'язково, 3'-кінцеву ділянку, функціональну у рослин.

Уповільнення (температурозалежного) часу цвітіння або розвитку насіння (включаючи дозрівання насіння) може становити будь-яке з трьох до 20 днів у порівнянні з часом цвітіння рослини з експресією та активністю FLC дикого типу, таке як уповільнення приблизно від 1 до 60 днів, приблизно від 10 до 50 днів, приблизно від 1 до 20 днів, приблизно 20-40 днів, приблизно 40-60 днів, напр., уповільнення приблизно від 5 днів, приблизно 10 днів, приблизно 20 днів, приблизно 30 днів, приблизно 40 днів, приблизно 50 днів або приблизно 60 днів. Прискорення проростання насіння може бути прискоренням проростання насіння приблизно до 4 тижнів у порівнянні з проростанням рослини з експресією та активністю FLC дикого типу, таке

як прискорення приблизно від 1 до 4 тижнів, приблизно від 2 до 3 тижнів, приблизно від 1 до 2 тижнів, приблизно від 3 до 4 тижнів, напр., прискорення приблизно від 1 тижня, або приблизно 2 тижнів, приблизно 3 тижнів або приблизно 4 тижнів. Рослини з експресією та активністю FLC дикого типу - це рослини, які мають експресію та/або активність щонайменше одного FLC гена, оскільки він найчастіше трапляється в природі. Вказані рослини не містять гетерологічну ДНК для підвищення чи зниження FLC експресії та/або активності і вказані рослини не містять нокаутні FLC алелі.

Уповільнення температурозалежного часу цвітіння у цьому відношенні також стосується збільшення тривалості холодного періоду, потрібного для індукції цвітіння. Тривалість холодного періоду, потрібного для індукції цвітіння, може бути збільшена приблизно до 8 тижнів у порівнянні з проростанням рослин з експресією та активністю FLC дикого типу, як, наприклад, уповільнене приблизно від 1 до 8 тижнів, приблизно від 1 до 4 тижнів, приблизно від 4 до 8 тижнів, приблизно від 2 до 6 тижнів, приблизно від 3 до 4 тижнів, напр., уповільнена приблизно від 1 тижня, приблизно 2 тижнів, приблизно 3 тижнів, приблизно 4 тижнів, приблизно 5 тижнів, приблизно 6 тижнів, приблизно 7 тижнів або приблизно 8 тижнів. Уповільнення настання часу цвітіння у цьому відношенні також стосується зменшення найнижчої температури холодного періоду, потрібного для індукції цвітіння. Найнижча температура холодного періоду, потрібного для індукції цвітіння, може бути знижена до 10 °C у порівнянні з проростанням рослин із експресією та активністю FLC дикого типу, як, наприклад, знижена приблизно від 1-10 °C, приблизно від 1-5 °C, приблизно від 5-10 °C, приблизно від 2 до 8 °C, приблизно від 4 до 6 °C, як, наприклад, зниження приблизно на 2 °C, приблизно на 4 °C, приблизно на 5 °C, приблизно на 6 °C, приблизно на 8 °C, приблизно на 10 °C. Рослини з експресією та активністю FLC дикого типу - це рослини, які виявляють експресію та/або активність щонайменше одного FLC гена, оскільки він найчастіше трапляється в природі. Вказані рослини не включають гетерологічну ДНК для підвищення чи зниження FLC експресії та/або активності, і вказані рослини не несуть нокаутних FLC алелів.

Підвищенням експресії та/або активності FLC білка може бути підвищення кількості (функціонального) FLC білка чи білка, який утворюється, або підвищення експресії та/або активності FLC. Вказане підвищення кількості (функціонального) FLC білка, що утворюється, може бути підвищенням щонайменше 2-кратним, 4-кратним, 10-кратним, 25-кратним, 50-кратним, 75-кратним, 100-кратним або навіть більшим у порівнянні з кількістю (функціонального) FLC білка, який продукується клітиною, з рівнями FLC експресії дикого типу. Вказане підвищення експресії та/або активності може бути конститутивним підвищенням кількості (функціонального) FLC білка, який утворюється. Вказане підвищення може також бути тимчасовим зниженням кількості (функціонального) FLC білка, який продукується. Підвищення кількості чи активності FLC може бути визначене у спосіб, описаний в іншому місці цієї заявки. Підвищення експресії та/або активності FLC може бути досягнуто, наприклад, за допомогою функціонального зв'язування FLC кодуючої ділянки з промотором, таким як будь-який з промоторів, описаних тут нижче, у такий спосіб ініціюючи FLC експресію у, напр., конститутивний, індукцйбельний, тимчасовий або тканиноспецифічний спосіб, залежно від вибору промотора.

Вказана нуклеїнова кислота, яка в результаті транскрипції приводить до підвищеної активності та/або експресії FLC гена та/або білка, може бути нуклеїнова кислота, яка кодує білок, що активує експресію та/або активність вказаного FLC білка. Приклади включають FRIGIDA, FRIGIDA LIKE1, FRIGIDA LIKE 2, FRIGIDA ESSENTIAL 1, SUF4 та FLC EXPRESSOR (Choi et al (2011) Plant Cell 23: 289-303).

В одному втіленні, нуклеїнова кислота кодує білок "цинкові пальці", який зв'язується з геном, який кодує FLC білок, присутній у рослині, що призводить до підвищеної експресії цільового гена. У конкретних втіленнях, білок "цинкові пальці" зв'язується з регуляторною ділянкою вказаного гена, інактивуючи у такий спосіб його експресію. Способи відбору сайтів для таргетингу білків "цинкові пальці" були описані, наприклад, у US6453242, і способи використання білків "цинкові пальці" для інгібування експресії генів у рослин описуються, наприклад, в US2003/0037355, кожен з яких включений тут шляхом посилання.

В іншому втіленні нуклеїнова кислота кодує TALE білок, який зв'язується з геном, що кодує FLC білок, присутній у рослині, що призводить до підвищеної експресії цього гена. У конкретних втіленнях, TALE білок зв'язується з регуляторною ділянкою вказаного гена, активуючи таким чином його експресію. В інших втіленнях, TALE білок зв'язується з інформаційною РНК, яка кодує вказаний білок та запобігає його трансляції. Способи відбору сайтів для таргетингу TALE білками були описані, напр., в Moscou MJ, Bogdanove AJ (2009) (A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science 326:1501) та Morbitzer R, Romer P, Boch J, Lahaye T (2010)

(Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:21617-21622).

У ще одному наступному втіленні, вказана нуклеїнова кислота кодує FLC білок, такий як FLC білок, що описаний будь-де у цій заявці.

Як тут використовується, термін "промотор, який експресується в рослині" означає послідовність ДНК, що здатна контролювати (ініціювати) транскрипцію у рослинній клітині. Це включає будь-який промотор рослинного походження, однак також будь-який промотор нерослинного походження, який здатний ініціювати транскрипцію в рослинній клітині, тобто, певні промотори вірусного або бактеріального походження, такі як CaMV35S (Harpster et al. (1988) *Mol Gen Genet.* 212(1):182-90, промотор вірусу конюшини підземної № 4 або № 7 (W09606932), або промотори гена Т-ДНК або також тканиноспецифічні або органноспецифічні промотори, які включають, але не обмежені ними, насіннєспецифічні промотори (напр., W089/03887), примордіальні специфічні промотори (An et al. (1996) *Plant Cell* 8(1):15-30), стеблоспецифічні промотори (Keller et al., (1988) *EMBO J.* 7(12): 3625-3633), листкоспецифічні промотори (Hudspeth et al. (1989) *Plant Mol Biol.* 12: 579-589), специфічні промотори, активні в мезофілі (такі як світлочутливі промотори Рубіско), коренеспецифічні промотори (Keller et al. (1989) *Genes Dev.* 3: 1639-1646), бульбоспецифічні промотори (Keil et al. (1989) *EMBO J.* 8(5): 1323-1330), специфічні промотори, активні в судинній тканині (Peleman et al. (1989) *Gene* 84: 359-369), промотори, активні в пиляках (WO 89/10396, WO 92/13956), специфічні промотори, активні в зоні розтріскування плода (WO 97/13865) тощо.

Прийнятні промотори для цього винаходу являють собою конститутивні рослинні промотори, які забезпечують конститутивну експресію химерного гена винаходу і, таким чином, призводять до конститутивного підвищення чи пониження експресії та/або активності FLC гена та/або білка. Конститутивні рослинні промотори добре відомі з рівня техніки, та включають CaMV35S промотор (Harpster et al. (1988) *Mol Gen Genet.* 212(1):182-90), актинові промотори, такі як, наприклад, промотор із гена актину рису (McElroy et al., 1990, *Plant Cell* 2:163), промотор вірусу мозаїки жилок кассави (Verdaguer et al., 1996 *Plant Mol. Biol.* 31: 1129), GOS промотор (de Pater et al., 1992, *Plant J.* 2:837), рістоновий H3 промотор (Chaubet et al., 1986, *Plant Mol Biol* 6:253), промотор нопалінсинтази (Nos) *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., 1982, *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 561), або промотори убіквітину, такі як, наприклад, промотор убіквітину-1 гену кукурудзи (Christensen et al., 1992, *Plant Mol. Biol.* 18:675).

Інші прийнятні для винаходу промотори - це індукцйбельні промотори, такі як, індукцйбельні промотори (напр., стрес-індукцйбельні промотори, посухо-індукцйбельні промотори, гормонііндукцйбельні промотори, промотори, які індукуються хімічними речовинами, тощо), тканиноспецифічні промотори, промотори, які регулюються стадіями розвитку тощо. Низка промоторів рослинних генів, які регулюють генну експресію у відповідь на сигнали зовнішнього середовища, гормональні, хімічні сигнали, сигнали, пов'язані із стадіями розвитку, і у тканиноспецифічний спосіб, може бути використана для експресії послідовності у рослин. Вибір промотора базується головним чином на фенотипі, який становить інтерес, і визначається такими чинниками, як тканина (напр., насіння, плід, корінь, пилік, васкулярна тканина, квітка, плодолистик тощо), індукцйбельність (напр., у відповідь на ушкодження, тепло, холод, посуху, світло, патогени тощо), час, стадію розвитку тощо.

Прикладами промоторів, які можуть бути використані на практиці цього винаходу, є ті промотори, які викликають експресію у відповідь на стреси, як, наприклад, RD29 промотори, які активуються у відповідь на посуху, низьку температуру, сольовий стрес чи обробку АБК (Yamaguchi-Shinozaki et al., 2004, *Plant Cell*, Vol. 6, 251-264; W012/101118), однак також промотори, які індукуються у відповідь на тепло (напр., див., Ainley et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22: 13-23), світло (напр., rbcS-3A промотор гороху, Kuhlemeier et al. (1989) *Plant Cell* 1: 471-478, та rbcS промотор кукурудзи, Schaffner and Sheen (1991) *Plant Cell* 3: 997-1012); ушкодження (напр., wun1, Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1: 961-968); патогени (як, наприклад, PR-I промотор, описаний у Buchel et al. (1999) *Plant Mol. Biol.* 40: 387-396, та PDF 1.2 промотор, описаний у Manners et al. (1998) *Plant Mol. Biol.* 38: 1071-1080), та хімічні речовини, такі як метилжасмонат або саліцилова кислота (напр., див., Gatz (1997) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 89-108). Крім того, узгодженість в часі експресії може контролюватись за допомогою промоторів, таких як, наприклад, ті, що діють під час старіння (напр., див., Gan and Amasino (1995) *Plant Cell* 13(4): 935-942); чи під час пізнього розвитку насіння (напр., див., Odell et al. (1994) *Plant Physiol.* 106: 447-458).

Можуть також бути використані промотори, активність яких індукуються сольовим стресом, такі як солеіндукцйбельний NHX1 промотор рису культивару Pokkali (PKN) (Jahan et al., 6-ий Міжнародний конгрес генетики рису, 2009, реферат постера P4-37), солеіндукцйбельний

промотор вакуолярної H⁺-пірофосфатази з *Thellungiella halophila* (TsVP1) (Sun et al., BMC Plant Biology 2010, 10:90), солеіндуцибельний промотор гена *Citrus sinensis*, який кодує ізоформу *gpxl* фосфоліпідної гідропероксидази (Avsian-Kretchmer et al., Plant Physiology July 2004 vol. 135, p1685-1696).

В альтернативних втіленнях, використовуються тканиноспецифічні та/або стадієспецифічні промотори, напр., промотор, який може забезпечувати транскрипцію лише в межах певних часових рамок стадії розвитку в межах цієї тканини. Див., напр., Blazquez (1998) Plant Cell 10:791-800, де характеризується промотор LEAFY гена *Arabidopsis*. Див., також Cardon (1997) Plant J 12:367-77, в якому описується фактор транскрипції SPL3, який розпізнає консервативний мотив послідовності в ділянці промотора гена ідентичності API флоральної меристеми *A. thaliana*; та Mandel (1995) Plant Molecular Biology, Vol. 29, pp 995-1004, в якому описується меристемний промотор *elf4*. Можуть бути використані тканиноспецифічні промотори, які є активними упродовж всього життєвого циклу тканини конкретного типу. В одному аспекті, нуклеїнові кислоти винаходу функціонально зв'язуються з промотором, активним насамперед лише в клітинах волокон бавовника, в одному аспекті, нуклеїнові кислоти винаходу функціонально зв'язуються з промотором, активним переважно протягом стадій розтягнення клітин волокон бавовника, напр., як описано Rinehart (1996) supra. Нуклеїнові кислоти можуть бути функціонально зв'язані з промотором *Py2A* гена, для експресії переважно в клітинах волокон бавовника (*ibid*). Див., також, John (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5769-5773; John, et al., Патент США №№ 5,608,148 та 5,602,321, в якому описуються промотори, активні у волокнах бавовника, та способи для створення трансгенних рослин бавовника. Можуть також бути використані коренеспецифічні промотори для експресії нуклеїнових кислот винаходу. Приклади коренеспецифічних промоторів включають промотор гена алкогольдегідрогенази (DeLisle (1990) Int. Rev. Cytol. 123:39-60) та промотори, які були розкриті в Патентах США №№ 5,618,988, 5,837,848 та 5,905,186. Інші промотори, які можуть бути використані для експресії нуклеїнових кислот винаходу, включають, напр., промотори, активні в насінних зачатках, зародку, ендоспермі, інтегументі та насінній оболонці або їх комбінації; листкоспецифічний промотор (див., напр., Busk (1997) Plant J. 11:1285 1295, який описує листкоспецифічний промотор у кукурудзи); ORF 13 промотор із *Agrobacterium rhizogenes* (який виявляє високу активність у коренях, див., Hansen (1997) supra); пилкоспецифічний промотор кукурудзи (див., напр., Guerrero (1990) Mol. Gen. Genet. 224:161 168); промотор томатів, активний під час дозрівання плодів, старіння та опадання листків, промотор, активний у замикаючих клітинах, напр., як описано в PCT/EP12/065608, і, до меншої міри, у квітках, може бути використаний (див., напр., Blume (1997) Plant J. 12:731 746); промотор з SK2 гена томатів, специфічний для маточки (див., напр., Picker (1997) Plant Mol. Biol. 35:425 431); Blec4 гена гороху, який активний в епідермальній тканині апексів вегетативних та генеративних пагонів трансгенної люцерни, що робить їх корисним засобом для "прицільної" експресії чужорідних генів у епідермальному шарі пагонів чи волокон, які активно ростуть; BEL1 гена, специфічного стосовно насінного зачатка (див., напр., Reiser (1995) Cell 83:735-742, GenBank No. U39944); та/або, промотор у Klee, Патент США № 5,589,583, в якому описаний промотор, здатний забезпечувати високі рівні транскрипції у меристематичній тканині та/або клітинах, які швидко діляться. Далі тканиноспецифічні промотори, які можуть бути використані згідно з винаходом, включають: промотори, специфічні щодо насіння (як, наприклад, напін, фасеолін чи DC3 промотор, описаний в Патенті США № 5,773,697), промотори, активні у плодах у процесі досягання (як, наприклад, *dru 1* промотор (Патент США № 5,783,393), чи 2A1 1 промотор (напр., Патент США № 4,943,674) і промотор полігалактуронази томатів (напр., див. Bird et al. (1988) Plant Mol. Biol. 11: 651-662), промотори, активні у квітках (напр., див., Kaiser et al. (1995) Plant Mol. Biol. 28: 231-243), промотори, активні у пилку, такі як PTA29, PTA26 та PTA1 3 (напр., див., Патент США № 5,792,929) і, як описано, напр., у Baerson et al. (1994 Plant Mol. Biol. 26: 1947-1959), промотори, активні у васкулярній тканині (напр., див., Ringli and Keller (1998) Plant Mol. Biol. 37: 977-988), плодолистиках (напр., див., Ohl et al. (1990) Plant Cell 2:), пилку та насінних зачатках (напр., див., Baerson et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22: 255-267). В альтернативних втіленнях використовуються рослинні промотори, які індукують експресію під впливом рослинних гормонів, таких як ауксини, для експресії нуклеїнових кислот, що використовуються при реалізації винаходу. Наприклад, винахід може використовувати чутливі до ауксину елементи фрагментів EI промотора (*AuxREs*) у сої (*Glycine max* L.) (Liu (1997) Plant Physiol. 115:397-407); чутливий до ауксину GST6 промотор *Arabidopsis* (також чутливий до саліцилової кислоти та пероксиду водню) (Chen (1996) Plant J. 10: 955-966); *pacC* промотор з тютюну, який індукується ауксином (Sakai (1996) 37:906-913); рослинний елемент, чутливий до біотину (Streit (1997) Mol. Plant Microbe Interact. 10:933-937); і промотор, чутливий до стресу, викликаного гормоном

абсцизова кислота (АБК) (Sheen (1996) *Science* 274:1900-1902). Можуть також бути використані гормоніндуцибельні промотори, які включають промотори, які індукуються ауксином (такі як ті, що описані Кор et al. (1999) *Plant Mol. Biol.* 39: 979-990 or Baumann et al., (1999) *Plant Cell* 11: 323-334), промотор, який індукується цитокініном (напр., див., Guevara-Garcia (1998) *Plant Mol. Biol.* 38: 743-753), промотори, чутливі до гібереліну (напр., див. Shi et al. (1998) *Plant Mol. Biol.* 38: 1053-1060, Willmott et al. (1998) *Plant Molec. Biol.* 38: 817-825) тощо.

В альтернативних втіленнях нуклеїнові кислоти, які використовуються у практиці винаходу, можуть також бути функціонально зв'язані з рослинними промоторами, які індукуються експозицією до хімічних речовин, які можуть бути застосовані щодо рослини, таких як, гербіциди чи антибіотики. Наприклад, може бути використаний промотор Іп2-2 кукурудзи, активований за допомогою бензолсульфонамідними гербіцидними антидотами (De Veylder (1997) *Plant Cell Physiol.* 38:568-577); застосування різних гербіцидних антидотів індукує різні паттерни генної експресії, включаючи експресію у коренях, гідатодах та апікальній меристемі пагона. Кодуюча послідовність може бути під контролем, напр., промотору, який індукується тетрацикліном, напр., як описується за допомогою трансгенних рослин тютюну, які містять ген аргініндекарбоксілази *Avena sativa* L. (овесу) (Masgrau (1997) *Plant J.* 11:465-473); або, елемент, чутливий до саліцилової кислоти (Stange (1997) *Plant J.* 11:1315-1324). Використовуючи промотори, які індукуються хімічно {напр., гормонами чи пестицидами), тобто промоторами, чутливими до хімічної речовини, яка може бути застосована до трансгенної рослини у польових умовах, експресія поліпептиду винаходу може бути індукована на певній стадії розвитку рослини. Може також бути використана система експресії, яка індукується естрогеном, як описано в Патенті США 6,784,340 та Zuo et al. (2000, *Plant J.* 24: 265-273) для ініціації експресії нуклеїнових кислот, що застосовуються на практиці винаходу.

В альтернативних втіленнях, може бути використаний промотор, для якого розмах господарів обмежений видами цільових рослин, таких як кукурудза, рис, ячмінь, пшениця, картопля чи інші сільськогосподарські культури, який індукується на будь-якій стадії розвитку сільськогосподарської культури.

В альтернативних втіленнях, тканиноспецифічний рослинний промотор може ініціювати експресію функціонально зв'язаних послідовностей у тканинах, відмінних від тих, що є цільовими тканинами. В альтернативних втіленнях використовується тканиноспецифічний промотор, який ініціює експресію переважно в цільовій тканині чи типі клітин, однак може також призводити до часткової експресії в інших тканинах.

Згідно з винаходом можуть також бути застосовані, у комбінації з промотором, інші регуляторні послідовності, які розташовані між промотором та кодуючою послідовністю, такі як активатори транскрипції ("енхансери"), наприклад, активатор трансляції вірусу мозаїки тютюну (TMV), описаний у Заявці WO 87/07644, чи вірусу "гравірування" тютюну (TEV), описаного Carrington & Freed 1990, *J. Virol.* 64: 1590-1597, наприклад.

Інші регуляторні послідовності, які посилюють експресію нуклеїнової кислоти винаходу, можуть також бути локалізовані в химерному гені. Одним прикладом таких регуляторних послідовностей є інтрони. Інтрони - це інтрогенні послідовності, присутні в пре-мРНК, але відсутні в зрілій РНК після експіції за допомогою точного механізму сплайсингу. Здатність природних інтронів посилювати генну експресію, процес, що називається як опосередковане інтроном посилення експресії гена (IME), відоме у різних організмів, включаючи ссавців, комах, нематод та рослини (WO 07/098042, р11-12). IME зазвичай описується як посттранскрипційний механізм, що призводить до підвищеної експресії гена через стабілізацію транскрипта. Потрібно, щоб інтрон був розташований між промотором і кодуючою послідовністю у нормальній орієнтації. Однак, було також описано, що деякі інтрони виявляють вплив на трансляцію, функціонуючи як промотори або як енхансери транскрипції, які не залежать від положення та орієнтації (Chaubet-Gigot et al., 2001, *Plant Mol Biol.* 45(1):17-30, р27-28).

У зв'язку з цим винаходом прийнятні приклади генів, які містять такі інтрони, включають 5' інтрони з гена актину 1 рису (див. US5641876), гена актину 2 рису, ген сахарозосинтази кукурудзи (Clancy and Hannah, 2002, *Plant Physiol.* 130(2):918-29), гени алкогольдегідрогенази-1 кукурудзи (Adh-1) та Bronze-1 (Callis et al. 1987 *Genes Dev.* 1(10):1183-200; Mascarenhas et al. 1990, *Plant Mol Biol.* 15(6):913-20), ген білка теплового шоку 70 кукурудзи (див. US5593874), та shrunken 1 ген кукурудзи, світлочутливий ген 1 *Solanum tuberosum*, та ген білка теплового шоку 70 *Petunia hybrida* (див. US 5659122), ген заміщення гістону H3 з люцерни (Keleman et al. 2002 *Transgenic Res.* 11(1):69-72) та ген заміщення гістону H3 (гістон H3.3-подібний) з *Arabidopsis thaliana* (Chaubet-Gigot et al., 2001, *Plant Mol Biol.* 45(1):17-30).

Інші прийнятні регуляторні послідовності включають 5'-нетрансльовані ділянки (DTR). Як тут використовується, 5' UTR, також називається як лідерна послідовність, і являє собою конкретну

ділянку матричної РНК (мРНК), локалізовану між сайтом ініціації транскрипції і старт-кодоном кодуючої ділянки. Вона бере участь у забезпеченні стабільності мРНК та ефективності трансляції. Наприклад, 5' нетрансльована лідерна послідовність гена білка, зв'язуючого хлорофіл а/б₆ петунії, в положенні "даунстрім" 35S сайту ініціації транскрипції може бути використаний для підсилення стабільних рівнів експресії репортерного гена (Harpster et al., 1988, Mol Gen Genet. 212(1):182-90). W095/006742 описує використання 5' нетрансльованої лідерної послідовності, що походить від генів, які кодують білки теплового шоку, для того щоб підвищити експресію трансгена. "3'-кінцева ділянка бере участь у термінації транскрипції та поліаденілуванні, функціональна у рослин", як тут використовується, є послідовністю, що ініціює розщеплення незавершеної молекули РНК, яка перебуває у процесі синтезу (транскрипції), після чого додається poly(A) "хвіст" до 3'-кінця РНК, яка в результаті утворюється, функціонального в рослинних клітинах. Сигнали термінації транскрипції та поліаденілування, функціональні у рослинних клітинах, включають, але не обмежені ними, 3'nos, 3'35S, 3'his та 3'g7.

"Введення" у цьому відношенні, стосується розміщення генетичної інформації в рослинній клітині або рослині із використанням штучних засобів, таких як трансформація. Це може бути здійснене за допомогою методів, відомих з рівня техніки, для введення РНК або ДНК в рослинні клітини, тканини, протопласти чи цілі рослини. На доповнення до штучного введення, як описано вище, "введення" також включає інтрогресію генів, як визначено далі нижче.

Трансформація означає введення нуклеотидної послідовності в рослину у спосіб, який забезпечує стійку або транзйентну експресію послідовності. Трансформація і регенерація рослинних клітин як однодольних, так і дводольних наразі є рутинним процесом, і вибір найбільш прийнятної методики трансформації буде визначений на практиці. Вибір способу буде варіювати залежно від типу рослини, яка має бути трансформована; особи з досвідом роботи в галузі розпізнають прийнятність конкретних способів для даного типу рослин. Прийнятні способи можуть включати, але не обмежені ними: електропорацію рослинних протопластів; ліпосомо-опосередковану трансформацію; поліетиленгліколь (PEG) опосередковану трансформацію; трансформацію з використанням вірусів; мікроін'єкції в рослинні клітини; бомбардування мікрочастинками рослинних клітин; вакуумну інфільтрацію; та *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію.

В альтернативних втіленнях, винахід використовує трансформацію за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*. Можуть також бути використані інші бактерії, здатні до перенесення молекул нуклеїнової кислоти в рослинні клітини, як, наприклад, деякі ґрунтові мікроорганізми з порядку Rhizobiales, напр. Rhizobiaceae (напр., *Rhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp., *Agrobacterium* spp.); Phyllobacteriaceae (напр., *Mesorhizobium* spp., *Phyllobacterium* spp.); Brucellaceae (напр., *Ochrobactrum* spp.); Bradyrhizobiaceae (напр., *Bradyrhizobium* spp.), і Xanthobacteraceae (напр., *Azorhizobium* spp.), *Agrobacterium* spp., *Rhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Phyllobacterium* spp. *Ochrobactrum* spp. and *Bradyrhizobium* spp., приклади яких включають *Ochrobactrum* sp., *Rhizobium* sp., *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*. Приклади видів *Rhizobium* включають *R. leguminosarum* bv. trifolii, *R. leguminosarum* bv. phaseoli та *Rhizobium leguminosarum*, bv. viciae (Патент США 7,888,552). Інші бактерії, які можуть бути використані для виконання винаходу, які здатні трансформувати рослинні клітини та індукувати включення чужорідної ДНК в рослинний геном, є бактерії роду *Azotobacter* (аеробні), *Clostridium* (строго анаеробні), *Klebsiella* (облігатно аеробні), та *Rhodospirillum* (анаеробні, фотосинтетично активні). Було також встановлено, що перенесення Ti плазміди надає здатності до індукції пухлин у декількох представників родини Rhizobiaceae, таким як *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium leguminosarum* і *Phyllobacterium myrsinacearum*, в той час як *Rhizobium* sp. NGR234, *Sinorhizobium meliloti* та *Mesorhizobium loti* можуть в дійсності бути модифіковані для опосередкування перенесення гена до цілої низки різноманітних рослин (Broothaerts et al., 2005, Nature, 433:629-633).

В альтернативних втіленнях, отримання трансгенних рослин або насіння включає введення послідовностей, які використовуються на практиці винаходу і, в одному аспекті (необов'язково), маркерних генів у цільових конструкціях експресії (напр., плазмідах, разом з розташуванням промотора та послідовностей термінації транскрипції. Це може включати перенесення модифікованого гена в рослину за допомогою прийнятного метода. Наприклад, конструкція може бути введена безпосередньо в геномну ДНК рослинної клітини за допомогою методик, таких як електропорація та мікроін'єкція протопластів рослинних клітин, чи конструкції можуть бути введені безпосередньо в рослинну тканину за допомогою балістичних методів, таких як, бомбардування частинками ДНК. Наприклад, див., Christou (1997) Plant Mol. Biol. 35:197-203; Pawlowski (1996) Mol. Biotechnol. 6:17-30; Klein (1987) Nature 327:70-73; Takumi (1997) Genes

Genet. Syst. 72:63-69, де обговорюється використання бомбардування частинками для введення трангенів у пшениці; та Adam (1997) *supra*, для використання бомбардування частинками для того щоб ввести YACs в рослинні клітини. Наприклад, Rinehart (1997) *supra*, використав бомбардування частинками, для того щоб отримати трансгенні рослини бавовника.

5 Пристрій для прискорення частинок описується в Патенті США № 5,015,580; і, комерційне доступний BioRad (Biolistics) PDS-2000 прискорювач мікрочастинок; див., також, John, Патент США № 5,608,148; та Ellis, U.S. Patent No. 5, 681,730, в якому описується часточками-опосередкована трансформація голонасінних.

В альтернативних втіленнях, протопласти можуть бути іміобілізовані та введені з нуклеїновими кислотами, напр., в конструкцію експресії. Хоча регенерація рослини з протопластів не проста для зернових, регенерація рослин можлива у бобових з використанням соматичного ембріогенезу з калусу, який походить від протопласту. Організовані тканини можуть бути трансформовані за допомогою "голої", трансформованої ДНК з використанням методики "генної рушниці", де ДНК наноситься на вольфрамові мікрочастинки, дальність "вистрілу" становить 1/100-ту розміру клітин, який переносить ДНК глибоко в клітини та органели. Після цього, індукується регенерація трансформованої клітини, здебільшого шляхом соматичного ембріогенезу. Методика була успішною у декількох видів зернових культур, включаючи кукурудзу та рис.

В альтернативних втіленнях, третій етап може включати відбір та регенерацію всієї рослини, здатної до перенесення та включення цільового гена у наступних поколіннях. Такі методики регенерації ґрунтовані на застосуванні певних фітогормонів у культуральному середовищі для культури тканин, як правило, покладаючись на біоцидний та/або гербіцидний маркер, який був введений разом із бажаними нуклеотидними послідовностями. Регенерація рослин з культивованих протопластів описується в Evans et al., *Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture*, pp. 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; та Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. Регенерація може також бути отримана з рослинного калусу, експлантів, органів чи їх частин. Методики такої регенерації описуються в загальному вигляді в (1987) *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38:467-486. Для того щоб отримати цілі рослини із трансгенних тканин, таких як недозрілі зародки, вони можуть бути вирощені за контрольованих умов зовнішнього середовища на серії середовищ, які містять поживні речовини та гормони, процес, відомий як культура тканин. Після того як рослини регенерують та продукують насіння, розпочинається оцінювання потомства.

Вірусна трансформація (трансдукція) може також бути використана для транз'єнтної або стабільної експресії гена, залежно від природи вірусного геному. Бажаний генетичний матеріал упаковується в прийнятний рослинний вірус, після чого модифікованим вірусом інфікують рослину. Потомство інфікованих рослин вільне від віруса, а також від вставленого гена. Прийнятні способи для вірусної трансформації описуються або далі детально описані в WO 90/12107, WO 03/052108 або WO 2005/098004.

В альтернативних втіленнях, після того як химерний ген стійко вбудовується в трансгенні рослини, він може бути введений в інші рослини шляхом статевого схрещування чи інтрогресії. Будь-яка кількість стандартних селекційних методик може бути використана, залежно від виду, який повинен схрещуватись. Оскільки трансгенна експресія нуклеїнових кислот винаходу приводить до фенотипових змін, рослини, які включають рекомбінантні нуклеїнові кислоти винаходу, можуть схрещуватись статевим шляхом з другою рослиною для отримання кінцевого продукту. Таким чином, насіння винаходу може походити від схрещування між двома трансгенними рослинами винаходу, або схрещування між рослиною винаходу та іншою рослиною. Бажані ефекти (напр., експресія полінуклеотидів винаходу для отримання рослини, у якій змінюється фенологія цвітіння) можуть бути посилені, якщо обидві батьківські рослини експресують поліпептиди, напр., HDC1 ген винаходу. Бажані ефекти можуть бути передані наступним поколінням рослин за допомогою стандартних засобів розмноження.

Успішні приклади модифікації характерних особливостей рослин шляхом трансформації за допомогою клонуваних послідовностей, які слугують, для того щоб проілюструвати сучасний стан знань у цій галузі технології, включають, наприклад: Патенти США №№ 5,571,706; 5,677,175; 5,510,471; 5,750,386; 5,597,945; 5,589,615; 5,750,871; 5,268,526; 5,780,708; 5,538,880; 5,773,269; 5,736,369 і 5,619,042.

У деяких втіленнях, після трансформації рослини відбираються за допомогою домінантного селективного маркера, вставленого в трансформуючий вектор. Такий маркер може надавати стійкості до антибіотиків чи гербіцидів трансформованим рослинам, і відбір трансформантів може бути здійснений шляхом експозиції рослин до дії відповідних концентрацій антибіотика чи гербіцида.

У деяких втіленнях, після відбору трансформованих рослин і вирощування їх до дорослого стану, ці рослини, які виявляють модифіковані властивості, ідентифікуються. Модифікованою ознакою може бути будь-яка з-поміж тих ознак, що були описані вище. В альтернативних втіленнях, підтвердження того, що модифікація ознаки відбулась завдяки змінам експресії рівнів або активності трансгенного пептида чи нуклеїнової кислоти, може бути визначене шляхом аналізу експресії мРНК за допомогою Вестерн-блоттингу або аналізу затримки електрофоретичного зсуву в гелі.

"Інтрогресуючий" означає інтеграцію гена в рослинний геном за допомогою природних засобів, тобто схрещуванням рослини, яка включає химерний ген чи мутантний алель, описаний тут, з рослиною, яка не несе химерний ген чи мутантний алель. Серед нащадків можуть бути відібрані ті, що несуть химерний ген чи мутантний алель.

У наступному втіленні забезпечуються способи згідно з винаходом, де вказана однодольна рослина - це сільськогосподарська злакова рослина, така як злакова рослина помірного клімату (напр., її озимий різновид), така як, наприклад, рослина пшениці (напр., її озимий різновид).

Злакові рослини, які також називаються рослини зернових культур, включають, але не обмежені ними, рис (*Oryza sativa*), пшеницю (*Triticum aestivum*), тверду пшеницю, пшеницю для виробництва макаронного борошна (*Triticum durum*), кукурудзу або маїс (*Zea mays*), зозуліні слізки, салай (*salay*), тігбе (*tigbe*), павас (*pawas*) (*Co/x lachryma-jobi*), ячмінь (*Hordeum vulgäre*), просо (*Panicum miliaceum*, *Eleusine coracana*, *Setaria italica*, *Pennisetum glaucum*), сорго (*Sorghum bicolor*), овес (*Avena sativa*), жито (*Secale cereale*), тритікале (*xTriticosecale*), теф, таф або *khak shir* (*Eragrostis tef*), фоніо (*Digitaria exilis*), дикий рис, канадський рис, індіанський рис, водяний рис (*Zizania spp.*), спельту (*Triticum spelta*), канарник канарський - канарську траву (*Phalaris sp.*).

Злакові культури помірних широт - це злакові рослини, які ростуть у регіонах з помірним кліматом і добре адаптовані до помірного або холодного клімату, і включають, напр., кукурудзу, ячмінь і пшеницю (включаючи спельту), жито та овес. Більшість різновидів конкретного виду є або озимими, або яровими типами. Озимі різновиди висівають восени, вони проростають та ростуть вегетативно, після цього взимку вони перебувають у стані спокою. У весняний час вони поновлюють ріст і досягають пізньою весною або на початку літа. Озимі різновиди не цвітуть до настання весняного часу, тому що вони потребують яровизації: експозиції до низьких температур для генетично детермінованої тривалості цвітіння. В тих місцях, де зими є надто теплими для яровизації чи перевищують морозостійкість сільськогосподарської культури (яка варіює залежно від виду та різновиду), фермери сіють ярові різновиди. Ярові зернові культури висіваються ранньою весною і досягають пізніше, цього ж самого літа, без яровизації. Ярові зернові культури, як правило, потребують більше поливу і мають нижчу врожайність, ніж озимі зернові культури. Теплолюбні зернові культури вирощуються в тропічних низинах круглорічно, а за умов помірного клімату протягом безморозного сезону, і включають рис та сорго.

Рослини пшениці, як тут використовується, - це рослини *Triticum ssp.*, такі як *Triticum aestivum* та *Triticum durum* або *Triticum spelta*.

У ще наступному втіленні, FLC ген включає нуклеотидну послідовність, яка має щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 та 17 або де вказаний FLC білок включає амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 та 18.

Як тут використовується, щонайменше 80 % ідентичності послідовності може бути щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % або 100 % ідентичності послідовності.

Також забезпечується химерний ген, як описано в способах винаходу, і рослина, частина рослини, орган рослини, рослинна клітина або насіння, які включають вказаний химерний ген.

Винахід, крім того, забезпечує однодольну рослину, частину рослини, орган рослини, рослинну клітину чи насіння, які отримують згідно зі способами винаходу, де експресія та/або активність FLC гена та/або білка змінена у порівнянні з контрольною рослиною. Також забезпечується однодольна рослина, яка включає мутантний алель FLC гена, вказаний мутантний алель призводить до зміни експресії та/або активності FLC білка, закодованого вказаним геном, у порівнянні з рослиною, яка не включає вказану мутацію (тобто, яка включає FLC алель дикого типу), у якій, необов'язково, (температуро-залежний) час цвітіння чи проростання насіння було змінено у порівнянні з рослиною, яка не включає вказану мутацію. Вказана однодольна рослина, рослинна частина, рослинний орган, рослинна клітина чи насіння може бути, напр., рослина, рослинна частина, рослинний орган, рослинна клітина чи насіння хлібного злака, такого як рослина (напр., озима різновидність), рослинна частина, рослинний орган, рослинна клітина чи насіння хлібного злака помірних широт, такого як

рослина пшениці (озима різновидність), рослинна частина, рослинний орган, рослинна клітина чи насінина.

Згідно з наступним втіленням, FLC білок, який міститься у рослині, частині рослини, рослинному органі або рослинній клітині згідно з винаходом, має щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ Ю №№: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 та 18, або де вказаний FLC білок кодується нуклеотидною послідовністю, яка має щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 та 17. У навіть ще одному додатковому втіленні, рослина згідно з винаходом є злаковою рослиною, такою як злакова рослина помірних широт, така як рослина пшениці.

Крім того, забезпечується спосіб для ідентифікації однодольної рослини, такої як злакова рослина, злакова рослина помірних широт, або рослина пшениці зі зміненим (температурозалежним) цвітінням, розвитком насіння та/або зі зміненим проростанням насіння, який включає етапи:

a. Забезпечення популяції однодольних рослин (того ж виду), наприклад, популяції, щодо якої було застосовано мутагенез,

b. ідентифікації однієї або більше рослин із мутантним алелем FLC гена, як, наприклад, FLC ген, який має щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 та 17, або FLC ген, який кодує білок, що виявляє щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 і 16; та

c. ідентифікації серед вказаних рослин рослин з мутантним алелем FLC гена, як, наприклад, FLC ген, який має щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 і 17, або FLC ген, який кодує білок, що виявляє щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 та 18, однієї або більше рослин, які мають змінений час цвітіння або проростання насіння у порівнянні з рослиною того ж виду, яка не включає вказану мутацію.

Мутантним алелем FLC гена, як тут використовується, може бути мутантний алель, де FLC активність підвищується. Альтернативно, вказаний мутантний алель FLC гена може бути нокаутний FLC алель або може призводити до утворення FLC білка зі зниженою активністю, що може бути визначена, як описано будь-де у цій заявці.

У наступному втіленні, забезпечуються FLC білок або його функціональний фрагмент, які можуть бути отримані з однодольної рослини, такої як, злакова рослина, така як злакова рослина помірних широт, така як рослина пшениці, напр., FLC білок, який має амінокислотну послідовність, яка має щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 та 18. Переважно, у FLC

білків, які мають щонайменше 80 % ідентичності послідовності, змінюється лише третій нуклеотид кодону.

У наступному втіленні забезпечується нуклеотидна послідовність, яка кодує FLC білок згідно з винаходом, як, наприклад, молекула нуклеїнової кислоти, що має щонайменше 80 % ідентичності послідовності до будь-якої з послідовностей SEQ ID №№: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 та 17.

Наступний аспект винаходу забезпечує використання химерного гена згідно з винаходом, білка згідно з винаходом, або нуклеотидної послідовності згідно з винаходом, для зміни (температурозалежного) часу цвітіння, розвитку насіння, досягання насіння чи проростання насіння у однодольних рослин, як, наприклад, сільськогосподарських зернових рослин, таких як сільськогосподарська зернова рослина помірних широт, така як рослина пшениці.

Нуклеїнова кислота або полінуклеотид, як тут використовується, може бути ДНК або РНК, одно- або двохланцюгова. Нуклеїнові кислоти можуть бути синтезовані хімічно або бути отримані в результаті біологічної експресії in vitro або навіть in vivo. Нуклеїнові кислоти можуть бути хімічно синтезовані з використанням відповідно захищених рибонуклеозидних фосфорамідитів і традиційного ДНК/РНК синтезатора. Постачальниками реагентів для синтезу РНК є, наприклад, фірми Proligo (Гамбург, Німеччина), Dharmacon Research (Лафайет, Колорадо, США), Pierce Chemical (частина Perbio Science, Рокфорд, Іллінойс, США), Glen Research (Стерлінг, Вайомінг, США), ChemGenes (Ашленд, Массачусетс, США), і Cruachem (Глазго, Велика Британія). У зв'язку з химерним геном даного розкриття, ДНК включає кДНК і геномну ДНК.

Терміни "білок" або "поліпептид", як тут використовуються, описують групу молекул, які складаються більше ніж з 30 амінокислот, в той час як термін "пептид" описує молекули, які складаються з амінокислот, кількість яких не перевищує 30. Білки та пептиди можуть також утворювати димери, тримери та вищі олігомери, тобто складатись більше ніж з однієї (полі)пептидної молекули. Білкові та пептидні молекули, які утворюють такі димери, тримери

тощо, можуть бути ідентичними або неідентичними. Відповідні структури вищого порядку, відповідно, називаються гомо- або гетеродимери, гомо- або гетеротримери тощо. Терміни "білок" та "пептид" також називаються природно модифікованими білками або пептидами, де модифікація відбувається в результаті, напр., глікозилування, ацетилювання, фосфорилювання і тому подібне. Такі модифікації добре відомі з рівня техніки.

Термін "який включає" має інтерпретуватись як визначення присутності стверджуваних частин, етапів або компонентів, але не виключає присутності однієї або більше додаткових частин, етапів чи компонентів. Рослина, яка включає певну характерну особливість, може, таким чином, включати додаткові характерні особливості.

Зрозуміло, що при посиланні на слово в однині (напр., рослина чи корінь), множина також включена тут (напр., сукупність рослин, сукупність коренів). Таким чином, посилання на елемент із використанням невизначеного артикля "а" або "an" не виключає можливості, що присутні більше елементів, якщо контекстом чітко не передбачено, що присутній один і лише один елемент. Невизначений артикль "а" або "an" таким чином, як правило, означає "щонайменше один".

Згідно з метою винаходу, термін "ідентичність послідовності" двох споріднених нуклеотидних або амінокислотних послідовностей, що виражається у відсотках, стосується числа положень у двох оптимально вирівняних послідовностях, які мають ідентичні залишки (х₁ОО), розділеного на число положень, які порівнюються. Розрив, тобто положення у вирівнюванні, де в одній послідовності залишок наявний, а в іншій - відсутній, вважається положенням із неідентичними залишками. "Оптимальне вирівнювання" двох послідовностей виявляється шляхом вирівнювання двох послідовностей по всій довжині відповідно до алгоритму глобального вирівнювання Нідельмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J Mol Biol 48(3):443-53) у Європейському відкритому наборі програмного забезпечення для молекулярної біології (EMBOSS, Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16(6): 276—277; див., напр., <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>), використовуючи налаштування по "умовчання" (штраф за відкриття гепу (пробілу) = 10 (для нуклеотидів) / 10 (для білків) та штраф на розширення гепу (пробілу) = 0,5 (для нуклеотидів) / 0,5 (для білків)). Для нуклеотидів використовується по умовчання матриця скорингу EDNAFULL, а для білків - по умовчання матриця скорингу EBLOSUM62.

"По суті ідентичні" або "найвищою мірою подібні", як тут використовується, стосується послідовностей, які, при оптимальному вирівнюванні, як визначено вище, розділяють щонайменше певний мінімальний відсоток ідентичності послідовності (як визначено далі нижче).

Щоразу, коли робиться посилання на "рослину" або "рослини" згідно з винаходом, слід розуміти, що також частини рослини, клітини, тканини або органи, насінні коробочки, відокремлені органи, такі як корені, квітки, листки, пилок тощо також включаються. Щоразу, коли робиться посилання на "рослину" або "рослини" згідно з винаходом, слід розуміти, що також потомство рослин, які зберігають відмінні особливості батьківських форм (передусім змінений час цвітіння, розвитку насіння, досягання насіння чи змінене проростання насіння), таке як, насіння, отримане в результаті самозапилення або перехресного схрещування, напр., гібридне насіння (отримане від схрещування двох інбредних батьківських ліній), гібридні рослини та частини рослин, які походять від них, охоплені тут, як, наприклад, потомство, яке включає химерний ген або мутантний/нокаутний FLC алеель згідно з винаходом, якщо не визначено щось інше.

У деяких втіленнях, рослинні клітини винаходу, тобто рослинна клітина, у якої експресія FLC гена та/або білка змінюється (модулюється), а також рослинні клітини, отримані згідно зі способами винаходу, можуть бути рослинними клітинами, які не розмножуються, або рослинна клітина, яка не може бути регенерована у рослину, або рослинна клітина, яка не може підтримувати свою життєдіяльність, синтезуючи вуглеводи та білки з неорганічних сполук, таких як вода, диоксид вуглецю та неорганічних солей, шляхом фотосинтезу.

"Створення посадкового матеріалу", як тут використовується, стосується будь-яких засобів, відомих у галузі, для того щоб отримати більше рослин, частин рослин або насіння і включає inter alia способи вегетативного розмноження (напр., повітряними або надземними відводками, поділом, щепленням, мікророзмноженням, столонами чи "вусами", запасуючими органами, такими як цибулини, бульби, бульбоцибулини і кореневища, в результаті травматичної реітерації або живцями, утворенням дочірніх особин на лусках), статевої репродукції (схрещування з іншою рослиною) і нестатевої репродукції (напр., апоміксис, соматична гібридизація).

Якщо не стверджується щось інше у Прикладах, всі методики рекомбінантних ДНК

виконуються згідно зі стандартними протоколами, як описано в Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY та в Т. 1 і Т. 2 Ausubet et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, США. Стандартні матеріали та методи для молекулярних досліджень рослин описані в Plant Molecular Biology Labfax (1993) by R.D.D. Croy, сумісно опубліковані BIOS Scientific Publications Ltd (Велика Британія) та Blackwell Scientific Publications (Велика Британія). Інші посилання на стандартні молекулярно-біологічні методики включають Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Том I і II Brown (1998) *Molecular Biology LabFax*, Second Edition, Academic Press (Велика Британія). Стандартні матеріали та методики для проведення полімеразно-ланцюгових реакцій можна знайти у Dieffenbach and Dveksler (1995) *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, and in McPherson et al. (2000) *PCR-Basics: From Background to Bench*, First Edition, Springer Verlag, Німеччина.

Всі патенти, заявки на патенти та публікації або розкриття публікацій (включаючи публікації в інтернеті), які реферуються або цитуються тут, включені шляхом посилання у повному обсязі.

Перелік послідовностей міститься у файлі, що називається „BCS13-2008_ST25.txt”, обсяг якого становить 52 кілобайти (обсяг визначено в Microsoft Windows®), містить 27 послідовностей від SEQ ID №: 1 до SEQ ID №: 27, зареєстрований при цьому шляхом представлення у електронному вигляді і включений тут шляхом посилання.

ПОСЛІДОВНОСТІ

SEQ ID №: 1: MADS2 кодуюча послідовність *Triticum aestivum*

SEQ ID №: 2: MADS2 білок *Triticum aestivum*

SEQ ID №: 3: TaAGL42 кодуюча послідовність *Triticum aestivum*

SEQ ID №: 4: TaAGL42 білок *Triticum aestivum*

SEQ ID №: 5: TaAGL41 кодуюча послідовність *Triticum aestivum*

SEQ ID №: 6: TaAGL41 білок *Triticum aestivum*

SEQ ID №: 7: TaAGL33 кодуюча послідовність *Triticum aestivum*

SEQ ID №: 8: TaAGL33 білок *Triticum aestivum*

SEQ ID №: 9: TaALG12 кодуюча послідовність *Triticum aestivum*

SEQ ID №: 10: TaALG12 білок *Triticum aestivum*

SEQ ID №: 11: TaAGL22 кодуюча послідовність *Triticum aestivum*

SEQ ID №: 12: TaAGL22 білок *Triticum aestivum*

SEQ ID №: 13: MADS37 кодуюча послідовність *Brachypodium distachyon*

SEQ ID №: 14: MADS37 білок *Brachypodium distachyon*

SEQ ID №: 15: ODDSOC1 кодуюча послідовність *Brachypodium distachyon*

SEQ ID №: 16: ODDSOC1 білок *Brachypodium distachyon*

SEQ ID №: 17: ODDSOC2 кодуюча послідовність *Brachypodium distachyon*

SEQ ID №: 18: ODDSOC2 білок *Brachypodium distachyon*

SEQ ID №: 19: Прямий (forward) ПЛР праймер Bradi2g59187

SEQ ID №: 20: Зворотний (reverse) ПЛР праймер Bradi2g59187

SEQ ID №: 21: Прямий (forward) ПЛР праймер Bradi2g59120

SEQ ID №: 22: Зворотний (reverse) ПЛР праймер Bradi2g59120

SEQ ID №: 23: Прямий (forward) ПЛР праймер Bradi3g41297

SEQ ID №: 24: Зворотний (reverse) ПЛР праймер Bradi3g41297

SEQ ID №: 25: Прямий (forward) ПЛР праймер UBC18

SEQ ID №: 26: Зворотний (reverse) ПЛР праймер UBC18

SEQ ID №: 27: Експресуючий вектор pIPKb002-BdMADS37

ПРИКЛАДИ

Раніше було висловлено припущення, що відповідь на яровизацію у зернових культур помірних широт та справжніх дводольних еволюціонувала незалежно (Alexandre & Hennig (2008) *supra*; Kim et al (2009) *supra*; Hemming & Trevaskis (2011) *supra*) і не включала FLC. Вважали, що FLC гени не існують у таких рослин (Alexandre & Hennig (2008) *supra*; Colasanti & Coneva (2009) *supra*; Jarillo & Pineiro (2011) *Plant Sei.* 181: 364-378; Van et al (2003) *supra*; Van et al (2004) *supra*; Yan et al (2006) *supra*; Cockram et al (2007) *supra*), і виходячи з подібності послідовності жоден гомолог FLC не міг бути ідентифікований у зернових культур (Greenup et al. 2010, *supra*). Тут інший, новий підхід був застосований для ідентифікації FLC генів у зернових культур, що базується на дослідженні розташувань тандемних повторів у геномі справжніх дводольних між SEP3-, SEP1-, SQUA- та FLC-подібними генами.

Приклад 1 - Способи

Локальна синтенія

Локальна синтенія була якісно оцінена за допомогою геномних браузерів, імплементованих у Phytozome (Goodstein et al (2012) *Nucleic acids Res.* 40, D1178), PLAZA 2.5 (Van Bel et al (2012) *Plant Phys.* 158, 590), проект SOL genomics (Bombarely et al (2010) *Nucleic acids Res.* 39, D1149) та Amborella Genome Project (<http://www.amborella.org>; фінансований фондом National Science Foundation, грант #0922742). Тандемні повтори та спільні синтенічні маркери навколо SEPALLATA- та SQUAMOSA-подібних генів були ідентифіковані за допомогою BLAST (Basic Local Alignment Searches Tool) пошуку в базах даних GenBank database.

Виявлення синтенії за допомогою i-ADHoRe

Для того щоб простежити древні синтенічні зв'язки, було застосований новий підхід. Кластеризація "всі-проти-всіх" з використанням ослаблених налаштувань генерувала приблизні родини генів. Використовуючи i-ADHoRe 3.0 у гібридний спосіб (Proost et al (2012) *Nucleic acids Res.* 40, e11), геном винограду було скановано на істотні колінеарні та синтенічні ділянки. У цей спосіб спочатку визначаються колінеарні ділянки та вилучаються з набору даних, а на наступному етапі фракція геному, що залишилась, сканується щодо виявлення синтенічних ділянок.

Спочатку, набір даних був скомпонований таким чином, що включав білки всіх покритонасінних з PLAZA 2.5 (Van Bel et al (2012) (supra)), об'єднані з білками зовсім нещодавно секвенованих видів, *Brassica rapa* (Wang et al (2011) *Nat. Genet.* 43, 1035), томатів (The Tomato Genome Consortium (2012) *Nature* 485, 635) та картоплі (The Potato Genome Sequencing Consortium (2011) *Nature* 475, 189). Крім того, анотація *Vitis vinifera* була завантажена з PLAZA 2.5 і конвертована для введення інформації для i-ADHoRe 3.0 (Proost et al (2012) *Nucleic acids Res.* 40, e11). Було проведено повільне порівняння з метою пошуку всіх подібних послідовностей (blastp) за принципом "всі-проти-всіх" (версія 2.2.27+ з використанням налаштувань за умовчужанням) (Altschul et al (1997) *Nucleic acids Res.* 25, 3389) для визначення попарної подібності між всіма білками в наборі даних. За допомогою tribe-MCL (Enright et al (2002) *Nucleic acids Res.* 30, 1575) результати порівняння були кластеризовані в гомологічних родині генів (налаштування: blast-пл9, blast-ecut=1e-03, blast-score=e, mcl-l=1.2 and mcl-scheme=4).

Для виявлення істотної синтенії i-ADHoRe 3.0 була використана у гібридний спосіб, де перші колінеарні ділянки визначаються та видаляються, після чого визначається решта синтенічних ділянок матриці генної гомологічності.

(cluster_type=hybrid, cloud_gap_size=10, cloud_cluster_gap=15, cloud_filter_method=binomial_corr, gap_size=30, cluster_gap=35, q_value=0.75, alignment_method=gg2, level_2_only=false, prob_cutoff=0.001, anchor_points=3

and multiple_hypothesis_correction=FDR). Менш жорсткий аналіз був здійснений з використанням prob_cutoff of 0.05, cloud_gap_size=20 and cloud_cluster_gap=25.

Детекція маркерів (без синтенії)

MADS-box гени *Vitis* були екстраговані разом з 40 білок-кодуєчими генами в положеннях "апстрім" та "даунстрім" і зберігались як перелік на ген. Надлишковість завдяки тандемним повторам була видалена, а в переліку, що залишився, був здійснений скринінг маркерних генів, які могли б бути використані для надання додаткового уявлення про походження SEP3-FLC, SEP1-SQUA та AGL6-SOC1 тандемних розташувань. У даному випадку прийнятними маркерами є набір щонайменше трьох гомологічних генів, які знаходяться у безпосередній близькості до всіх трьох класів MADS-box генів.

Відбір таксону, множинне вирівнювання послідовностей та філогенетичний аналіз.

Ми здійснили BLAST пошук з використанням FLC послідовностей справжніх дводольних в опублікованій FLC філогенії (Reeves et al (2007) *Genetics* 176, 295) проти GenBank, TIGR (Інститут геномних досліджень) та AAGP (Ancestral Angiosperm Genome Project) баз даних, для того щоб виявити додаткові FLC-подібні гени справжніх дводольних. Виходячи з дослідження розташувань консервативних тандемних повторів у геномах справжніх дводольних між SEP3-, SEP1-, SQUA- та FLC-подібними генами, ми виявили OsMADS37 як кандидата FLC-подібної послідовності у рису. Ця послідовність була використана в BLASTN пошуку для ідентифікації подібних послідовностей, представлених в базі даних Genbank, і всі виявлені послідовності були включені в матрицю даних для філогенетичного аналізу. Крім того, ми уявно ідентифікували ODDSOC2 кладу у ячменю (*Hordeum*) EST колекції через слабку подібність до OsMADS37. За допомогою BLAST пошуку подібні послідовності були включені в подальший аналіз. Ми намагались всебічно охопити зразки всіх основних підродин MIKCC-типу MADS-box генів (Becker & Theissen (2003) *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 464), для того щоб дослідити еволюційну приналежність виявлених послідовностей. Ці підродини були однаковою чином представлені послідовностями одного представника астерид, розид, покритонасінних

(магноліофітів), однодольних та голонасінних, якщо такий вид був наявний. Врешті-решт, були включені відомі MADS-box гени харових водоростей, мохів та папоротей. Використовуючи логічне пояснення відбору зразків, ми отримали нуклеотидну матрицю даних, яка складається із 254 послідовностей, які були вирівняні за допомогою MAFFT v6 (Katoh & Toh (2008) BMC Bioinformatics 9,212) і відредагована вручну з використанням MacClade4 (Maddison & Maddison (2003) MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. (Sinauer Associates, Массачусетс, США) 4.06).

С-термінальні послідовності не могли б бути однозначно вирівняні, тому, відповідно, вони були виключені із вирівнювання. Крім того, декілька специфічних генних інсерцій також були видалені, що призвело до кінцевого вирівнювання 528 бп. Програма {Modeltest (Posada (2008) Mol. Biol. Evol. 25, 1253) була використана для визначення оптимальної моделі нуклеотидного заміщення відповідно до інформаційного критерію Акаїке, який обрав GTR+I+G еволюційну модель.

Філогенетичний аналіз методом максимальної правдоподібності був виконаний за допомогою програмного забезпечення PhyML 3.0 (Guindon et al (2010) Syst. Biol. 59, 307). Значення бустреп-аналізу ґрунтовані на узагальненні 100 бутстрепповторностей (виборок). Байєсівський аналіз був здійснений за допомогою MrBayes 3.2 (Ronquist & Huelsenbeck (2003) Bioinformatics 19, 1572). Дві незалежні серії досліджень (в кожному - по 4) з використанням методу Монте-Карло з ланцюгами Маркова були проведені для 15,000,000 генерацій з відбором зразків кожних 1,000 генерацій. Після конвергенції, показаної за допомогою стандартного відхилення розщеплених частот < 0.02, ми видалили перших 25 % відібраних дерев як "burn-in". Апостеріорний розподіл над деревами представлений як консенсусне дерево більшості, а апостеріорні ймовірності відображені у їх відповідних вузлах. Обидва дерева були "укорінені" за допомогою MIKCS-типу MADS-box генів харових водоростей.

Кількісна оцінка експресії FLC-подібних генів у *Brachypodium* за допомогою полімерно-ланцюгової реакції в режимі реального часу (ПЛР-РЧ)

Рослини *Brachypodium distachyon* були вирощені у горщиках, наповнених сумішшю 50:50 ґрунт:вермікуліт. Рослинки попередньо вирощували за умов довгого дня (16 год. світло-8 год. темрява; 54 фотонів мкмоль м⁻² с⁻¹) при 28 °С до повної появи третього листка. Ці "трилистові" рослини були після цього перенесені в іншу камеру для вирощування при 4 °С (яровизація) чи 28 °С (контроль) (16год світло-8год темрява; 20 фотонів мкмоль м⁻² с⁻¹) упродовж 6 тижнів, рослини були зібрані перед яровизацією та на 2, 4 і 6 тижнів. Негайно після збору зразки були миттєво заморожені у рідкому азоті. РНК екстрагували із цілих рослин з видаленими коренями за допомогою тризолу (Invitrogen, Карлсбад, США). Після цього всі зразки РНК були оброблені ДНКазою за допомогою набору реактивів TURBO DNA-free (Ambion, Остін, США). кДНК отримували методом зворотної транскрипції за допомогою AMV зворотної транскриптази (Promega, Медісон, США). ПЛР-РЧ проводили на апараті StepOne Plus (Applied Biosystems, Фостер Сіті, США), використовуючи суміш Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Фостер Сіті, США), Ген убіквітин-кон'югуючого фермента 18 (UBC18; Bradi4g00660) був використаний як референсний ген для нормалізації зразків (Hong et al (2008) BMC plant biology, 8, 112). Відносну зміну генної експресії підраховували за допомогою методу delta-delta Ct. Планки похибок представляють стандартні похибки трьох біологічних повторностей, які становлять середнє значення з трьох технічних повторностей. Наступні праймери були використані

для ПЛР-РЧ: Bradi2g59187 (F: 5'-AAATCCAAGATATTGGCAAAACG-3' (SEQ ID №: 19), R: 5'-CCTTAGGCTCACTGGAGTTCTCA-3' (SEQ ID №: 20), Bradi2g59120 (F: 5'-CCGGCAAGCTCTACGAGTACTC-3' (SEQ ID №: 21), R: 5'-GCTCCCGCAAATTGCTGAT-3' (SEQ ID №: 22), Bradi3g41297 (F: 5'-CAATCTGAGGATGAAGGTGTCACA-S' (SEQ ID №: 23), R: 5'-GCTTGACAAGTTGTTTCGCTTTCT-3' (SEQ ID №: 24)) та UBC18 (F: 5'-GTCTGACTTCCCGAGCATTA-3' (SEQ ID №: 25), R: 5'-ATAGGCGCCGGGTTGAG-3' (SEQ ID №: 26)).

Приклад 2 - Ортологи FLOWERING LOCUS C присутні у однодольних

Збереження порядку генів між видами та між подвоєними геномними сегментами може забезпечити розуміння суті історії еволюції генів. Така інформація може доповнити дані стосовно філогенії як незалежне джерело доказів щодо еволюційного зв'язку між паралогічними (подвоєними) генними філогенетичними лініями (Tang et al (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 472), включаючи MADS-box гени (Causier et al (2010) Mol. Biol. Evol. 27, 2651). Відповідно, ми дослідили геномне розташування MADS-box генів MIKCS-типу у філогенетичне інформативних геномах квіткових рослин. З цією метою, ми ідентифікували еволюційно консервативні тандемні розташування для членів різних підродів MADS-box гена. Ми виявили, що члени SEP1 та

SQUA, а також SEP3 і FLC підродин розташовані в тандемі у геномах декількох справжніх дводольних (Фігура 1). Якщо члени SQUA підродини є повністю близькими до членів SEP1 субклади, FLC гени є настільки ж близькими до членів SEP3 субклади.

Розташування SQUA та SEP1 тандемів можуть також бути визначені в геномах однодольних рослин (Фіг. 1.). Цікаво, що у однодольних ми ідентифікували тандеми SEP3 з MADS-box генами, що в даний час аннотуються як 'специфічні для однодольних' і пов'язані з типом I або MIKC*-типом MADS-box генів (Kim et al (2007) Plant Physiol. 145, 1484; Arora et al. (2007) BMC Genomics 8, 242), які в еволюційному відношенні є більш древніми, а у структурному - належать до інших філогенетичних ліній MADS-box генів. Положення цих генів у геномі, однак, дає підставу припустити, що вони представляють члени FLC підродини у однодольних. Дійсно, у філогенетичному відношенні ці енігматичні гени однодольних утворюють групу з FLC генами справжніх дводольних рослин з високою бутстрепною підтримкою (99 BS, 1.00 BPP, Фіг. 2). Це свідчить, що ці гени раніше були помилково класифікованими FLC ортологами однодольних. Власне FLC клади однодольних сильно підтримується (100 BS, 1.00 BPP) і складається лише із генів Poaceae, за винятком MrFLC (*Musa paradisiaca*, Musaceae). В порядку Poales, ми ідентифікували дві основні FLC клади, які ми назовемо як OzMA0837-подібні гени та OsMADS51-подібні гени. Той факт, що як рис, так і сорго мають дуплікатні FLC копії, міг би бути пояснений уявною дуплікацією всього геному 56-72 мільйонів років тому (туа), названою "rho", яка відбулась перед дивергенцією основних великих філогенетичних ліній злаків (Tang et al (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 472; Initiative IBG (2010) Nature 463, 763). Пізніше одна з цих філогенетичних ліній зазнала тандемної дуплікації, очевидно до походження підродини Poaceae. Ці специфічні для однодольних дуплікації призвели до виникнення трьох FLC клад у злаків помірних широт та двох великих ліній в порядку Poales (Greenup et al. (2010) Plant Physiol. 153, 1062). FLC гени однодольних характеризуються дивергентними, короткими білковими послідовностями, що, можливо, ускладнює ідентифікацію їх за допомогою традиційних методів пошуку подібності, як, наприклад, BLAST (Reeves et al (2007) Genetics 176, 295).

Кодуюча послідовність FLC гена MADS2 *Triticum aestivum* наведена в SEQ ID №: 1, а закодованого білка в SEQ ID №: 2. Кодуюча послідовність FLC гена TaAGL42 *Triticum aestivum* наведена в SEQ ID №: 3, а закодованого білка - в SEQ ID №: 4. Кодуюча послідовність FLC гена *Triticum aestivum* TaAGL41 наведена в SEQ ID №: 5, а закодованого білка - в SEQ ID №: 6. Кодуюча послідовність FLC гена TaAGL33 *Triticum aestivum* наведена в SEQ ID №: 7, а закодованого білка - в SEQ ID №: 8. Кодуюча послідовність FLC гена TaAGL12 *Triticum aestivum* наведена в SEQ ID №: 9, а закодованого білка - в SEQ ID №: 10. Кодуюча послідовність FLC гена TaAGL22 *Triticum aestivum* наведена в SEQ ID №: 11, а закодованого білка - в SEQ ID №: 12. Кодуюча послідовність FLC гена MADS37 *Brachypodium distachyon* наведена в SEQ ID №: 134. Кодуюча послідовність FLC гена ODDSOC1 *Brachypodium distachyon* наведена в SEQ ID №: 15, а закодованого білка - в SEQ ID №: 16. Кодуюча послідовність FLC гена ODDSOC2 *Brachypodium distachyon* наведена в SEQ ID №: 17, а закодованого білка - в SEQ ID №: 18. FLC гени з інших видів однодольних рослин з тієї ж клади та їх інвентарні номери представлені в Таблиці 1.

Таблиця 1:

FLC гени видів однодольних рослин та їх інвентарні номери.

Вид	Назва гена	Ідентифікатор
<i>Triticum aestivum</i>	MADS2	JN248615
<i>Triticum aestivum</i>	TaAGL33	DQ51 2366.1
<i>Triticum aestivum</i>	TaAGL41	DQ512357
<i>Triticum aestivum</i>	TaAGL42	DQ51 2358.1
<i>Triticum aestivum</i>	TaAGL12	AB007505.1
<i>Triticum aestivum</i>	TaAGL22	DQ51 2365.1
<i>Avena barbata</i>	AbFLC	GR360557
<i>Hordeum vulgäre</i>	HvODDSOC2	HM130526.1
<i>Dactylis glomerata</i>	DgFLC	H01 64248
<i>Hordeum vulgäre</i>	HvODDSOCI	HM1 30525
<i>Brachypodium distachyon</i>	Bradi2g59120	Bradi2g59120
<i>Brachypodium distachyon</i>	Bradi3g41300	Bradi3g41300
<i>Brachypodium distachyon</i>	Bradi2g59190	Bradi2g59190
<i>Oryza sativa</i>	OsMADS512	HC084629
<i>Oryza sativa</i>	OSsMADS37	Os08g41960
<i>Sorghum bicolor</i>	SbFLC2	Sb03g044170
<i>Sorghum bicolor</i>	SbFLCI	Sb07g026180
<i>Panicum virgatum</i>	PvFLC2	FL926484.1
<i>Panicum virgatum</i>	PvFLCI	FL799640
<i>Cynodon dactylon</i>	CdFLC	ES295415.1
<i>Setaria italica</i>	Si01 4540m	Si01 4540m
<i>Saccharum hybrid</i>	ShFLC	CA295053
<i>Zea mays</i>	ZmMADS77	GRMZM2G098986
<i>Zea mays</i>	ZmMADS54	GRMZM2G320549
<i>Zea mays</i>	ZMM22	GRMZM2G052045
<i>Musa paradisiaca</i>	MpFLC	FL658504

У попередніх дослідженнях було показано, що декілька членів OsMADS51 клади функціонують у контрольованому верналізацією цвітінні у злаків помірних широт подібно до FLC-подібних генів у справжніх дводольних (Фігура 4) (Greenup et al. (2010) Plant Physiol. 153, 1062; Winfield et al (2009) BMC Plant Biol. 9, 55; WO2006/068432). Як відомо, жоден член OsMADS37 клади не був раніше досліджений. Для того щоб з'ясувати особливості холодової регуляції різних FLC паралогів більш детально, ми здійснювали моніторинг рівня їх експресії у модельного злаку помірних широт *Brachypodium distachyon* через 2, 4 та 6 тижнів тривалого холоду (4 °C) за допомогою ПЛР-ПЧ. Експресія BdMADS37 (Bradi3g41297, названого раніше як Bradi3g41300) поступово знижувалась у процесі яровизації (Фіг. 3а). Експресія OsMADS51-подібного гена BdODDSOC2 (Bradi2g59187, названого раніше як Bradi2g59190) швидше даунрегулювалась яровизацією і мінімальний рівень експресії досягався вже через 2 тижні холоду, або можливо швидше, і залишався стабільним протягом наступних тижнів (Фіг. 3с). Експресія BdODDSOCI (Bradi2g59120) виявилась нечутливою до яровизації (Фіг. 3б та 3д). Як висновок, *Brachypodium* FLC-подібні паралоги є чутливими до тривалої експозиції до холоду, однак природа відповіді між паралогами відрізняється як у якісному, так і у кількісному відношеннях.

Вважають, що походження та функціональна диверсифікація генів, які контролюють розвиток, є основною передумовою для еволюції складної мофології у еукаріотів. Ми з'ясували походження підродини FLC MADS-бокс генів. Ця підродина відіграє суттєву роль у переході до флоральної стадії розвитку та розвитку квітки: де було головним чином показано, що FLC гени діють у справжніх дводольних як чутливий до яровизації репресор переходу до флоральної стадії розвитку.

Концепція яровизації походить від ранніх спостережень, що озимі різновидності зернових культур потребують тривалого холодного періоду для переходу до цвітіння,

натомість ярові різновидності цвітуть швидко після висіву (Chouard (1960) Annu. Rev. Plant Physiol. 11, 191). Застосовуючи комбінований підхід на основі синтениї та філогенетичної

реконструкції, ми були здатні однозначно ідентифікувати FLC-подібні гени у однодольних. Це відкриває можливість застосовувати результати, отримані для FLC у *Arabidopsis*, стосовно зернових культур. Відсутність FLC генів у однодольних раніше використовувалась як основний аргумент для ствердження про незалежне походження відповіді яровизації у цих таксонів (Chouard (1960) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 11, 191; Alexandre & Hennig (2008) *J. Exp. Bot.* 59, 1127; Kim et al (2009) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 277).

Результати функціонального аналізу деяких членів OsMADS51 клади (Фігура 4), а також наші дані щодо експресії свідчать, що члени FLC підродини контролюються яровизацією у злаків помірних широт, подібно до FLC у *Arabidopsis*. Деякі аспекти FLC регуляції та функцій можуть бути консервативні серед покритонасінних. Навіть ще більш інтригуюче, деякі члени SQUA підродини, які є сестринськими до FLC, також регулюються яровизацією, хоча у позитивний спосіб. Приклади включають VERNALIZATION1 (VRN1) у чутливого до яровизації виду злаку *Triticum aestivum* (Kim et al (2009) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 277; Yan et al (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 6263) або APETALA1 і FRUITFULL у *Arabidopsis thaliana*, у яких рівні транскрипта змінюються у відповідь на холод (Hannah et al (2005) *PLoS Genet* 1, e26). Разом з тим, оскільки члени інших підродин MADS-box гена, такі як, наприклад, STMADS11-подібні гени у злаків (Капе et al. (2005) *Plant Physiology*, 138, 2354), також контролюються яровизацією, цей тип температурозалежної регуляції очевидно еволюціонував незалежно велику кількість разів.

Приклад 3 - модуляція експресії FLOWERING LOCUS C модулює час цвітіння та проростання насіння у *Brachypodium distachion* та у пшениці

BdMADS37, BdODDSOC1 та BdODDSOC2 (повні та фрагменти) клонували у векторі для надекспресії, та клонували у векторі для даунрегуляції (смыслову та/або антисмыслову) ендегенних BdMADS37, BdODDSOC1 та BdODDSOC2 генів. *Brachypodium distachion* або пшениця трансформуються за допомогою векторів, час цвітіння та проростання насіння оцінюється за різних умов та проміжків часу.

Якщо BdMADS37 (SEQ ID №: 27), BdODDSOC1 або BdODDSOC2 надекспресуються у *Brachypodium* або пшениці, час цвітіння уповільнюється, а проростання насіння прискорюється. Якщо BdMADS37, BdODDSOC1 або BdODDSOC2 даун регулюються, час цвітіння прискорюється, а проростання насіння уповільнюється.

TaAGL12, TaAGL42, TaAGL41, TaAGL33, TaAGL22 та MADS2 (повні або фрагменти) клонуються у вектор для надекспресії, і клонуються у вектор для даунрегуляції (смысловой та/або антисмысловой) ендегенних TaAGL12, TaAGL42, TaAGL41, TaAGL33, TaAGL22 та MADS2 генів. Пшениця або *Brachypodium* трансформуються за допомогою векторів, а час цвітіння та проростання насіння оцінюється за різних температурних умов та різних проміжків часу.

Якщо TaAGL42, TaAGL41, TaAGL33, TaAGL22 або MADS2 надекспресуються в *Brachypodium* чи пшениці, час цвітіння відкладається, а проростання насіння прискорюється. Якщо TaAGL42, TaAGL41, TaAGL33, TaAGL22, або MADS2 даунрегулюються, час цвітіння прискорюється, а проростання насіння уповільнюється.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> БАЙЕР КРОПСАЄНС НВ
БАЙЕР КРОПСАЄНС ЛП
ГОЙТЕН, Коен
РУЕЛЕНС, Філіп
КАУФМАНН, Керстін

<120> СПОСОБИ ТА ЗАСОБИ ДЛЯ МОДУЛЯЦІЇ ЧАСУ ЦВІТІННЯ У ОДНОДОЛЬНИХ РОСЛИН

<130> BCS13-2008

<160> 27

<170> Патент, версія 3.5

<210> 1
<211> 471
<212> ДНК
<213> *Triticum aestivum*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(471)

<400> 1

cgg cgc ggg cgt gtg gag ctg cgg cgg atc gag gac cgg acg agc cgg	48
Arg Arg Gly Arg Val Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr Ser Arg	
1 5 10 15	
cag gtg cgc ttc tcc aag cgc cgc gcg ggg ctc ttc aag aag gcc ttc	96
Gln Val Arg Phe Ser Lys Arg Arg Ala Gly Leu Phe Lys Lys Ala Phe	
20 25 30	
gag ctc gcg gtc ctc tgc gac gcc gag gtc tcg ctg ctc gtc ttc tcc	144
Glu Leu Ala Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ser Leu Leu Val Phe Ser	
35 40 45	
ccc gcc ggc agg ctc tac gag tac gcc tcc tcc agc ata gaa ggt aca	192
Pro Ala Gly Arg Leu Tyr Glu Tyr Ala Ser Ser Ile Glu Gly Thr	
50 55 60	
tat gac cgc tat cag gca ttt gca gga gcc gga aag gac gtg aat gaa	240
Tyr Asp Arg Tyr Gln Ala Phe Ala Gly Ala Gly Lys Asp Val Asn Glu	
65 70 75 80	
ccc ggt gca agt aac aac aat gat gga gat cct tca aat ata cag tca	288
Pro Gly Ala Ser Asn Asn Asn Asp Gly Asp Pro Ser Asn Ile Gln Ser	
85 90 95	
agg ctt gaa gag att act tcc tgg tct ctt caa aac aat gct gat aac	336
Arg Leu Glu Glu Ile Thr Ser Trp Ser Leu Gln Asn Asn Ala Asp Asn	
100 105 110	
tca gat gct aat gag cta gag aaa ctg gag aaa cta ctg aca gat gct	384
Ser Asp Ala Asn Glu Leu Glu Lys Leu Glu Lys Leu Leu Thr Asp Ala	
115 120 125	
ttg aag aat aca aaa tcc aag aag atg ttg gcg caa caa aat agc gat	432
Leu Lys Asn Thr Lys Ser Lys Lys Met Leu Ala Gln Gln Asn Ser Asp	


```

130              135              140
gcc ggc act agt gcg agc ggc ggg aac tcc aga agg act
Ala Gly Thr Ser Ala Ser Gly Gly Asn Ser Arg Arg Thr
145              150              155

<210>  2
<211> 157
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

<400>  2
Arg Arg Gly Arg Val Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr Ser Arg
 1              5              10              15

Gln Val Arg Phe Ser Lys Arg Arg Ala Gly Leu Phe Lys Lys Ala Phe
 20              25              30

Glu Leu Ala Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ser Leu Leu Val Phe Ser
 35              40              45

Pro Ala Gly Arg Leu Tyr Glu Tyr Ala Ser Ser Ser Ile Glu Gly Thr
 50              55              60

Tyr Asp Arg Tyr Gln Ala Phe Ala Gly Ala Gly Lys Asp Val Asn Glu
 65              70              75              80

Pro Gly Ala Ser Asn Asn Asn Asp Gly Asp Pro Ser Asn Ile Gln Ser
 85              90              95

Arg Leu Glu Glu Ile Thr Ser Trp Ser Leu Gln Asn Asn Ala Asp Asn
100              105              110

Ser Asp Ala Asn Glu Leu Glu Lys Leu Glu Lys Leu Leu Thr Asp Ala
115              120              125

Leu Lys Asn Thr Lys Ser Lys Lys Met Leu Ala Gln Gln Asn Ser Asp
130              135              140

Ala Gly Thr Ser Ala Ser Gly Gly Asn Ser Arg Arg Thr
145              150              155

```

471

```

<210>  3
<211> 492
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

```

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(492)

<400> 3

```

cgg cgc ggg cgg gtt gag ctg cgg cgg atc gag gac cgg acg agc cgg      48
Arg Arg Gly Arg Val Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr Ser Arg
1      5      10      15

cag gtg cgc tcc tcc aag cgc cga gcg ggg ctc ttc aag aag gcc ttc      96
Gln Val Arg Ser Ser Lys Arg Arg Ala Gly Leu Phe Lys Lys Ala Phe
20      25      30

gag ctc tcg ctc ctc tgc gac gcc gag gtc gcg ctg ctc gtc ttc tcc     144
Glu Leu Ser Leu Leu Cys Asp Ala Glu Val Ala Leu Leu Val Phe Ser
35      40      45

ccc gcc ggc aag ctc tac gag tac gcc tcc tcc agc att gaa ggt aca     192
Pro Ala Gly Lys Leu Tyr Glu Tyr Ala Ser Ser Ser Ile Glu Gly Thr
50      55      60

tat gac cgg tat cag caa ttt gcg gtg ccc gga agg aat ctg att caa     240
Tyr Asp Arg Tyr Gln Gln Phe Ala Val Pro Gly Arg Asn Leu Ile Gln
65      70      75

gaa gat gca act gtc tgc aat gat gaa gat cct tca aat atg cag tca     288
Glu Asp Ala Thr Val Cys Asn Asp Glu Asp Pro Ser Asn Met Gln Ser
85      90      95

agg ctt ggc ggg att gct gcc tgg tct ctc gat aat aat gct gac aac     336
Arg Leu Gly Gly Ile Ala Ala Trp Ser Leu Asp Asn Asn Ala Asp Asn
100     105     110

tca gat gcc agt agt ttg gag aaa ctg gag aaa cta cta aag gat gct     384
Ser Asp Ala Ser Ser Leu Glu Lys Leu Glu Lys Leu Lys Asp Ala
115     120     125

ctg aga att aca gaa tct aag aag gct ttg gcg aaa caa aat agt ggc     432
Leu Arg Ile Thr Glu Ser Lys Lys Ala Leu Ala Lys Gln Asn Ser Gly
130     135     140

ggg agc acg agc gga gag agc ccc aac gga cct acg ggg cag gag aat     480
Gly Ser Thr Ser Gly Glu Ser Pro Asn Gly Pro Thr Gly Gln Glu Asn
145     150     155     160

ggg agg aat gct
Gly Arg Asn Ala      492

```

<210> 4

<211> 164

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 4

```

Arg Arg Gly Arg Val Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr Ser Arg
1      5      10      15

```

```

Gln Val Arg Ser Ser Lys Arg Arg Ala Gly Leu Phe Lys Lys Ala Phe

```

UA 122386 C2

```

                20                25                30
Glu Leu Ser Leu Leu Cys Asp Ala Glu Val Ala Leu Leu Val Phe Ser
 35                40                45

Pro Ala Gly Lys Leu Tyr Glu Tyr Ala Ser Ser Ser Ile Glu Gly Thr
 50                55                60

Tyr Asp Arg Tyr Gln Gln Phe Ala Val Pro Gly Arg Asn Leu Ile Gln
 65                70                75                80

Glu Asp Ala Thr Val Cys Asn Asp Glu Asp Pro Ser Asn Met Gln Ser
 85                90                95

Arg Leu Gly Gly Ile Ala Ala Trp Ser Leu Asp Asn Asn Ala Asp Asn
100                105                110

Ser Asp Ala Ser Ser Leu Glu Lys Leu Glu Lys Leu Leu Lys Asp Ala
115                120                125

Leu Arg Ile Thr Glu Ser Lys Lys Ala Leu Ala Lys Gln Asn Ser Gly
130                135                140

Gly Ser Thr Ser Gly Glu Ser Pro Asn Gly Pro Thr Gly Gln Glu Asn
145                150                155                160

Gly Arg Asn Ala

```

```

<210> 5
<211> 456
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(456)

```

```

<400> 5
atg gcg cgg cgc ggg cgt gtg gag ctg cgg cgg atc gag gac cgg acg      48
Met Ala Arg Arg Gly Arg Val Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr
1                5                10                15

agc cgg cag gtg cga ttc tcc aag cgc cgc gcg ggg ctc ttc aag aag      96
Ser Arg Gln Val Arg Phe Ser Lys Arg Arg Ala Gly Leu Phe Lys Lys
20                25                30

gcg ttc gag ctc gtg gtc ctc tgc gac gcc gag gtc gcg ctg ctc gtc      144
Ala Phe Glu Leu Val Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ala Leu Leu Val
35                40                45

```

```

ttc tcc ccc gcc ggg aag ctc tac gag tac gcc tcc tcc agc atc gaa      192
Phe Ser Pro Ala Gly Lys Leu Tyr Glu Tyr Ala Ser Ser Ser Ile Glu
   50                               55                               60

ggt aca tat gat cgc tat cag aga ttt gca ggg gct gga acg aac gtg      240
Gly Thr Tyr Asp Arg Tyr Gln Arg Phe Ala Gly Ala Gly Thr Asn Val
   65                               70                               75                               80

aat gga ggc gat gca agt agc aac aat gat ggt gat cct tca aac ata      288
Asn Gly Gly Asp Ala Ser Ser Asn Asn Asp Gly Asp Pro Ser Asn Ile
                        85                               90                               95

cag tca acg ctt aaa gag atc gct tcc tgg tct att caa aac aat gct      336
Gln Ser Thr Leu Lys Glu Ile Ala Ser Trp Ser Ile Gln Asn Asn Ala
                        100                               105                               110

gat gtc tca gat gct aat aag cta gag aaa ctg gag aaa ctc ctg aca      384
Asp Val Ser Asp Ala Asn Lys Leu Glu Lys Leu Glu Lys Leu Leu Thr
                        115                               120                               125

gat gct ttg agg aat aca aaa tcc aag aag atg ttg gtg caa caa aat      432
Asp Ala Leu Arg Asn Thr Lys Ser Lys Lys Met Leu Val Gln Gln Asn
                        130                               135                               140

agc ggc gca agc acg agg ggg tgg      456
Ser Gly Ala Ser Thr Arg Gly Trp
145                               150

<210> 6
<211> 152
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

<400> 6

Met Ala Arg Arg Gly Arg Val Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr
1                               5                               10                               15

Ser Arg Gln Val Arg Phe Ser Lys Arg Arg Ala Gly Leu Phe Lys Lys
20                               25                               30

Ala Phe Glu Leu Val Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ala Leu Leu Val
35                               40                               45

Phe Ser Pro Ala Gly Lys Leu Tyr Glu Tyr Ala Ser Ser Ser Ile Glu
50                               55                               60

Gly Thr Tyr Asp Arg Tyr Gln Arg Phe Ala Gly Ala Gly Thr Asn Val
65                               70                               75                               80

Asn Gly Gly Asp Ala Ser Ser Asn Asn Asp Gly Asp Pro Ser Asn Ile
85                               90                               95

```

Gln Ser Thr Leu Lys Glu Ile Ala Ser Trp Ser Ile Gln Asn Asn Ala
100 105 110

Asp Val Ser Asp Ala Asn Lys Leu Glu Lys Leu Glu Lys Leu Leu Thr
115 120 125

Asp Ala Leu Arg Asn Thr Lys Ser Lys Lys Met Leu Val Gln Gln Asn
130 135 140

Ser Gly Ala Ser Thr Arg Gly Trp
145 150

<210> 7
<211> 495
<212> ДНК
<213> Triticum aestivum

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(495)

<400> 7
cgg cgc ggg cgt gtg gag ctg cgg cgg atc gag gac cgg acg agc cgg 48
Arg Arg Gly Arg Val Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr Ser Arg
1 5 10 15
cag gtg cgc ttc tcc aag cgc cgc tcg ggg ctc ttc aag aag gcc ttc 96
Gln Val Arg Phe Ser Lys Arg Arg Ser Gly Leu Phe Lys Lys Ala Phe
20 25 30
gag ctc gcg gtc ctc tgc gac gcc gag gtc tcg ctg ctc gtc ttc tcc 144
Glu Leu Ala Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ser Leu Leu Val Phe Ser
35 40 45
ccc gcc ggc agg ctc tac gag tac gcc tcc tcc agc ata gaa ggt aca 192
Pro Ala Gly Arg Leu Tyr Glu Tyr Ala Ser Ser Ser Ile Glu Gly Thr
50 55 60
tat gac cgc tat cag gca ttt gca gga gcc gga aag gac gtg aat gaa 240
Tyr Asp Arg Tyr Gln Ala Phe Ala Gly Ala Gly Lys Asp Val Asn Glu
65 70 75 80
ccc ggt gca agt aac aac aat gat gga gat cct tca aat ata cag tca 288
Pro Gly Ala Ser Asn Asn Asn Asp Gly Asp Pro Ser Asn Ile Gln Ser
85 90 95
agg ctt gaa gag att act acc tgg tct ctt caa aac aat gct gat gac 336
Arg Leu Glu Glu Ile Thr Thr Trp Ser Leu Gln Asn Asn Ala Asp Asp
100 105 110
tca gat gct aat gag cta gag aaa ctg gag aaa cta ctg aca gat gct 384
Ser Asp Ala Asn Glu Leu Glu Lys Leu Glu Lys Leu Leu Thr Asp Ala
115 120 125
ttg aag aat aca aaa tcg aag aag atg ttg gcg caa cga aat agt ggt 432
Leu Lys Asn Thr Lys Ser Lys Lys Met Leu Ala Gln Arg Asn Ser Gly

UA 122386 C2

130	135	140	
gca gga acg agt gca agc ggc gag aac tcc agt cgt cct agg gga cag			480
Ala Gly Thr Ser Ala Ser Gly Glu Asn Ser Ser Arg Pro Arg Gly Gln			
145	150	155	160
aag gga gga agg act			495
Lys Gly Gly Arg Thr			
	165		
<210> 8			
<211> 165			
<212> PRT			
<213> Triticum aestivum			
<400> 8			
Arg Arg Gly Arg Val Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr Ser Arg			
1	5	10	15
Gln Val Arg Phe Ser Lys Arg Arg Ser Gly Leu Phe Lys Lys Ala Phe			
	20	25	30
Glu Leu Ala Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ser Leu Leu Val Phe Ser			
	35	40	45
Pro Ala Gly Arg Leu Tyr Glu Tyr Ala Ser Ser Ser Ile Glu Gly Thr			
	50	55	60
Tyr Asp Arg Tyr Gln Ala Phe Ala Gly Ala Gly Lys Asp Val Asn Glu			
	65	70	75
Pro Gly Ala Ser Asn Asn Asn Asp Gly Asp Pro Ser Asn Ile Gln Ser			
	85	90	95
Arg Leu Glu Glu Ile Thr Thr Trp Ser Leu Gln Asn Asn Ala Asp Asp			
	100	105	110
Ser Asp Ala Asn Glu Leu Glu Lys Leu Glu Lys Leu Leu Thr Asp Ala			
	115	120	125
Leu Lys Asn Thr Lys Ser Lys Lys Met Leu Ala Gln Arg Asn Ser Gly			
	130	135	140
Ala Gly Thr Ser Ala Ser Gly Glu Asn Ser Ser Arg Pro Arg Gly Gln			
	145	150	155
Lys Gly Gly Arg Thr			
	165		

<210> 9
 <211> 528
 <212> ДНК
 <213> Triticum aestivum

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(528)

<400> 9
 agg aag agg ggg aag ctg gag ctg cgg cgg ata gag gac cgg acg agc 48
 Arg Lys Arg Gly Lys Leu Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr Ser
 1 5 10 15
 cgg cag gtg cga ttc tcg aag cgg cgg agc ggg ctg ttc aag aag gcg 96
 Arg Gln Val Arg Phe Ser Lys Arg Arg Ser Gly Leu Phe Lys Lys Ala
 20 25 30
 tac gag ctg tcc gtg ctc tgc gac gcc cag gtc gcc ctc cta gtc ttc 144
 Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Ala Gln Val Ala Leu Leu Val Phe
 35 40 45
 tcc ccc gcc ggc cgc ctc tac gag ttc gcc tct tcc acc tcc agc att 192
 Ser Pro Ala Gly Arg Leu Tyr Glu Phe Ala Ser Ser Thr Ser Ser Ile
 50 55 60
 gat aca att ttt ggt cgg tat tgg gac ctt ctg gac aca aca att gat 240
 Asp Thr Ile Phe Gly Arg Tyr Trp Asp Leu Leu Asp Thr Thr Ile Asp
 65 70 75 80
 ctc aat att gaa gca agg gaa tct cgg gtt gat tgc aat ata cag ctt 288
 Leu Asn Ile Glu Ala Arg Glu Ser Arg Val Asp Cys Asn Ile Gln Leu
 85 90 95
 cgt cag aaa gag cgt tca gat gac ccg gtg cct aag ata aac cac att 336
 Arg Gln Lys Glu Arg Ser Asp Asp Pro Val Pro Lys Ile Asn His Ile
 100 105 110
 act caa tgt gtg ttg gaa tca aat gtc aac gag ctg aac atc gct gag 384
 Thr Gln Cys Val Leu Glu Ser Asn Val Asn Glu Leu Asn Ile Ala Glu
 115 120 125
 cta aga ggt ttg gag gaa gcg atg act aat gct ttg aca gtt gtt aag 432
 Leu Arg Gly Leu Glu Glu Ala Met Thr Asn Ala Leu Thr Val Val Lys
 130 135 140
 aac aaa ctg atg atg aag gtg gct agt gtg ctc ccc caa agc gag aag 480
 Asn Lys Leu Met Met Lys Val Ala Ser Val Leu Pro Gln Ser Glu Lys
 145 150 155 160
 aag agg aag agt tgc tcg att tca gag cca aga tca gga gtg agc tct 528
 Lys Arg Lys Ser Cys Ser Ile Ser Glu Pro Arg Ser Gly Val Ser Ser
 165 170 175

<210> 10
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 10

Arg Lys Arg Gly Lys Leu Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr Ser
1 5 10 15

Arg Gln Val Arg Phe Ser Lys Arg Arg Ser Gly Leu Phe Lys Lys Ala
20 25 30

Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Ala Gln Val Ala Leu Leu Val Phe
35 40 45

Ser Pro Ala Gly Arg Leu Tyr Glu Phe Ala Ser Ser Thr Ser Ser Ile
50 55 60

Asp Thr Ile Phe Gly Arg Tyr Trp Asp Leu Leu Asp Thr Thr Ile Asp
65 70 75 80

Leu Asn Ile Glu Ala Arg Glu Ser Arg Val Asp Cys Asn Ile Gln Leu
85 90 95

Arg Gln Lys Glu Arg Ser Asp Asp Pro Val Pro Lys Ile Asn His Ile
100 105 110

Thr Gln Cys Val Leu Glu Ser Asn Val Asn Glu Leu Asn Ile Ala Glu
115 120 125

Leu Arg Gly Leu Glu Glu Ala Met Thr Asn Ala Leu Thr Val Val Lys
130 135 140

Asn Lys Leu Met Met Lys Val Ala Ser Val Leu Pro Gln Ser Glu Lys
145 150 155 160

Lys Arg Lys Ser Cys Ser Ile Ser Glu Pro Arg Ser Gly Val Ser Ser
165 170 175

<210> 11

<211> 312

<212> ДНК

<213> Triticum aestivum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(312)

<400> 11

atg gcg cgg cgc ggg cgt gtg gag ctg cgg cgg atc gag gac cgg acg
Met Ala Arg Arg Gly Arg Val Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr
1 5 10 15

48


```

agc cgg cag gtg cgc ttc tcc aag cgc cgc gcg ggg ctc ttc aag aag      96
Ser Arg Gln Val Arg Phe Ser Lys Arg Arg Ala Gly Leu Phe Lys Lys
                20                25                30

gcc ttc gag ctc gcg gtc ctc tgc gac gcc gag gtc tcg ctg ctc gtc      144
Ala Phe Glu Leu Ala Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ser Leu Leu Val
                35                40                45

ttc tcc ccc gcc ggc agg ctc tac gag tac gcc tcc tcc aga att oca      192
Phe Ser Pro Ala Gly Arg Leu Tyr Glu Tyr Ala Ser Ser Arg Ile Pro
                50                55                60

cta ttc gct ggt gct tct aca tgc ttt cat tgg ata ttc cag acc acc      240
Leu Phe Ala Gly Ala Ser Thr Cys Phe His Trp Ile Phe Gln Thr Thr
        65                70                75                80

tta gtc gga gtt caa caa gct tct ctt caa tca acg cca ccc cta cct      288
Leu Val Gly Val Gln Gln Ala Ser Leu Gln Ser Thr Pro Pro Leu Pro
                85                90                95

cat cat gta ttc act ctt cat aat      312
His His Val Phe Thr Leu His Asn
                100

<210> 12
<211> 104
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

<400> 12

Met Ala Arg Arg Gly Arg Val Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr
1                5                10                15

Ser Arg Gln Val Arg Phe Ser Lys Arg Arg Ala Gly Leu Phe Lys Lys
                20                25                30

Ala Phe Glu Leu Ala Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ser Leu Leu Val
        35                40                45

Phe Ser Pro Ala Gly Arg Leu Tyr Glu Tyr Ala Ser Ser Arg Ile Pro
        50                55                60

Leu Phe Ala Gly Ala Ser Thr Cys Phe His Trp Ile Phe Gln Thr Thr
65                70                75                80

Leu Val Gly Val Gln Gln Ala Ser Leu Gln Ser Thr Pro Pro Leu Pro
        85                90                95

His His Val Phe Thr Leu His Asn
                100

```

<210> 13
 <211> 609
 <212> ДНК
 <213> *Brachypodium distachyon*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(609)

```

<400> 13
atg gag gag agg agg atg ttg cag gag cag cag cag gag gag gct cat      48
Met Glu Glu Arg Arg Met Leu Gln Glu Gln Gln Glu Glu Ala His
1          5          10          15

ggc cat ggg gga aag gag gag gag ggg aag agg agg aag aag cgt ggg      96
Gly His Gly Gly Lys Glu Glu Glu Gly Lys Arg Arg Lys Lys Arg Gly
          20          25          30

aag gtg gag ctg agg agg ata gag gac cgg acg agc cgg cag gtg cgc      144
Lys Val Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr Ser Arg Gln Val Arg
          35          40          45

ttc tcg aag cgg cgg agc ggg ctg ttc aag aag gcg ttc gag ctg tcc      192
Phe Ser Lys Arg Arg Ser Gly Leu Phe Lys Lys Ala Phe Glu Leu Ser
          50          55          60

gtg ctg tgc gac gtc gag gtc gcg ctc atc gtc ttc tcc ccc gcc gga      240
Val Leu Cys Asp Val Glu Val Ala Leu Ile Val Phe Ser Pro Ala Gly
65          70          75          80

cga ctc tac ccg ttc gtc tcc tcc gaa agc agc gtt gag gag att ttt      288
Arg Leu Tyr Pro Phe Val Ser Ser Glu Ser Ser Val Glu Glu Ile Phe
          85          90          95

ggg cga tgc cgg cat ctt ccc aac aca ata gat ctc aat att gag gta      336
Gly Arg Cys Arg His Leu Pro Asn Thr Ile Asp Leu Asn Ile Glu Val
          100          105          110

cga gat cct cga gtt gat cac gat ata cag att gat ctg aat gag cag      384
Arg Asp Pro Arg Val Asp His Asp Ile Gln Ile Asp Leu Asn Glu Gln
          115          120          125

gca gca cca gac cca cta tct gat tta aac cac ttt gct gac tgg atc      432
Ala Ala Pro Asp Pro Leu Ser Asp Leu Asn His Phe Ala Asp Trp Ile
          130          135          140

ctg gaa att gat gtt aac tcg atg ggc atg gct gag cta aga cgt ttt      480
Leu Glu Ile Asp Val Asn Ser Met Gly Met Ala Glu Leu Arg Arg Phe
145          150          155          160

gag gaa att gtt tct gac gct ctg aca gtt atc aag aac aat ctg agg      528
Glu Glu Ile Val Ser Asp Ala Leu Thr Val Ile Lys Asn Asn Leu Arg
          165          170          175

atg aag gtg tca cag ctc acc cag acc gag aga aac cca cag gag aaa      576
Met Lys Val Ser Gln Leu Thr Gln Thr Glu Arg Asn Pro Gln Glu Lys
          180          185          190

gcg aac aac ttg tca agc caa gaa tcg gag gag      609
Ala Asn Asn Leu Ser Ser Gln Glu Ser Glu Glu

```

195

200

<210> 14

<211> 203

<212> PRT

<213> Brachypodium distachyon

<400> 14

Met Glu Glu Arg Arg Met Leu Gln Glu Gln Gln Gln Glu Glu Ala His
1 5 10 15

Gly His Gly Gly Lys Glu Glu Glu Gly Lys Arg Arg Lys Lys Arg Gly
20 25 30

Lys Val Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr Ser Arg Gln Val Arg
35 40 45

Phe Ser Lys Arg Arg Ser Gly Leu Phe Lys Lys Ala Phe Glu Leu Ser
50 55 60

Val Leu Cys Asp Val Glu Val Ala Leu Ile Val Phe Ser Pro Ala Gly
65 70 75 80

Arg Leu Tyr Pro Phe Val Ser Ser Glu Ser Ser Val Glu Glu Ile Phe
85 90 95

Gly Arg Cys Arg His Leu Pro Asn Thr Ile Asp Leu Asn Ile Glu Val
100 105 110

Arg Asp Pro Arg Val Asp His Asp Ile Gln Ile Asp Leu Asn Glu Gln
115 120 125

Ala Ala Pro Asp Pro Leu Ser Asp Leu Asn His Phe Ala Asp Trp Ile
130 135 140

Leu Glu Ile Asp Val Asn Ser Met Gly Met Ala Glu Leu Arg Arg Phe
145 150 155 160

Glu Glu Ile Val Ser Asp Ala Leu Thr Val Ile Lys Asn Asn Leu Arg
165 170 175

Met Lys Val Ser Gln Leu Thr Gln Thr Glu Arg Asn Pro Gln Glu Lys
180 185 190

Ala Asn Asn Leu Ser Ser Gln Glu Ser Glu Glu
195 200

<210> 15
 <211> 477
 <212> ДНК
 <213> *Brachypodium distachyon*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(477)

```

<400> 15
atg gtg cgg cgc ggg cgg gtg gag ctg cgg cgg atc gag gac cgg acg      48
Met Val Arg Arg Gly Arg Val Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr
1          5          10          15

agc cgg cag gtg cgc ttc tcc aag cgc cgg tcg ggg ctc ttc aag aag      96
Ser Arg Gln Val Arg Phe Ser Lys Arg Arg Ser Gly Leu Phe Lys Lys
          20          25          30

gcc ttc gag ctc gcg ctc ctc tgc gac gcc gag gtc gcg ctg ctc gtc     144
Ala Phe Glu Leu Ala Leu Leu Cys Asp Ala Glu Val Ala Leu Leu Val
          35          40          45

ttc tcc ccc gcc ggc aag ctc tac gag tac tcc tcc tcc tta agc att     192
Phe Ser Pro Ala Gly Lys Leu Tyr Glu Tyr Ser Ser Ser Leu Ser Ile
          50          55          60

gaa ggc aca tat gac cgc tat cag caa ttt gcg gga gcc gta agg aac     240
Glu Gly Thr Tyr Asp Arg Tyr Gln Gln Phe Ala Gly Ala Val Arg Asn
65          70          75          80

aca tat caa gga ggc gca agt acc agc aat gat gaa gat cct tca aat     288
Thr Tyr Gln Gly Gly Ala Ser Thr Ser Asn Asp Glu Asp Pro Ser Asn
          85          90          95

cta cag tca agg ctt agg gag att act gcc tgg tct gtt cac aat aat     336
Leu Gln Ser Arg Leu Arg Glu Ile Thr Ala Trp Ser Val His Asn Asn
          100          105          110

gct gat aat gca gat gcc agt aat cta gag aaa ctg gag aaa cta ctg     384
Ala Asp Asn Ala Asp Ala Ser Asn Leu Glu Lys Leu Glu Lys Leu Leu
          115          120          125

aca gat gct aag agg gct ttg gcg aaa caa aat agc aac agg agt gca     432
Thr Asp Ala Lys Arg Ala Leu Ala Lys Gln Asn Ser Asn Arg Ser Ala
          130          135          140

acc ggt gag aac tcc aat gga cct act gga gag gga gga aac gct       477
Thr Gly Glu Asn Ser Asn Gly Pro Thr Gly Glu Gly Gly Asn Ala
145          150          155
    
```

<210> 16
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> *Brachypodium distachyon*

<400> 16

Met Val Arg Arg Gly Arg Val Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr

UA 122386 C2

```

1             5             10             15

Ser Arg Gln Val Arg Phe Ser Lys Arg Arg Ser Gly Leu Phe Lys Lys
      20             25             30

Ala Phe Glu Leu Ala Leu Leu Cys Asp Ala Glu Val Ala Leu Leu Val
      35             40             45

Phe Ser Pro Ala Gly Lys Leu Tyr Glu Tyr Ser Ser Ser Leu Ser Ile
      50             55             60

Glu Gly Thr Tyr Asp Arg Tyr Gln Gln Phe Ala Gly Ala Val Arg Asn
      65             70             75             80

Thr Tyr Gln Gly Gly Ala Ser Thr Ser Asn Asp Glu Asp Pro Ser Asn
      85             90             95

Leu Gln Ser Arg Leu Arg Glu Ile Thr Ala Trp Ser Val His Asn Asn
      100            105            110

Ala Asp Asn Ala Asp Ala Ser Asn Leu Glu Lys Leu Glu Lys Leu Leu
      115            120            125

Thr Asp Ala Lys Arg Ala Leu Ala Lys Gln Asn Ser Asn Arg Ser Ala
      130            135            140

Thr Gly Glu Asn Ser Asn Gly Pro Thr Gly Glu Gly Gly Asn Ala
      145            150            155

```

```

<210> 17
<211> 321
<212> ДНК
<213> Brachypodium distachyon

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

```

```

<400> 17
atg gcg cgg cgc ggg cgg gtg gag ctg cgg cgg atc gag gac cgg acg      48
Met Ala Arg Arg Gly Arg Val Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr
1             5             10             15

agc cgg cag gtg cgc ttc tcc aag cgc cgg gcg ggg ctc ttc aag aag      96
Ser Arg Gln Val Arg Phe Ser Lys Arg Arg Ala Gly Leu Phe Lys Lys
      20             25             30

gcc ttc gag ctc gcc gtc ctc tgc gac gcc gag gtc gcg ctg ctc gtc      144
Ala Phe Glu Leu Ala Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ala Leu Leu Val
      35             40             45

```

ttc tcc ccc gcc ggc agg ctc tac gag tac gcc tcc tcc ata agc ata 192
Phe Ser Pro Ala Gly Arg Leu Tyr Glu Tyr Ala Ser Ser Ile Ser Ile
50 55 60

gaa ggt aca tat gac cgc tat cag aga ttt gcg gga ggc aga tgg aat 240
Glu Gly Thr Tyr Asp Arg Tyr Gln Arg Phe Ala Gly Gly Arg Trp Asn
65 70 75 80

ctg aat gat gga gat tca agt agc aac aat gat gaa gat cct tca aac 288
Leu Asn Asp Gly Asp Ser Ser Ser Asn Asn Asp Glu Asp Pro Ser Asn
85 90 95

ata caa tca aga ctt gga gag att gcc tcc tgg 321
Ile Gln Ser Arg Leu Gly Glu Ile Ala Ser Trp
100 105

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> Brachypodium distachyon

<400> 18

Met Ala Arg Arg Gly Arg Val Glu Leu Arg Arg Ile Glu Asp Arg Thr
1 5 10 15

Ser Arg Gln Val Arg Phe Ser Lys Arg Arg Ala Gly Leu Phe Lys Lys
20 25 30

Ala Phe Glu Leu Ala Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ala Leu Leu Val
35 40 45

Phe Ser Pro Ala Gly Arg Leu Tyr Glu Tyr Ala Ser Ser Ile Ser Ile
50 55 60

Glu Gly Thr Tyr Asp Arg Tyr Gln Arg Phe Ala Gly Gly Arg Trp Asn
65 70 75 80

Leu Asn Asp Gly Asp Ser Ser Ser Asn Asn Asp Glu Asp Pro Ser Asn
85 90 95

Ile Gln Ser Arg Leu Gly Glu Ile Ala Ser Trp
100 105

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

<220>
<223> праймер

<400> 19 aaatccaaga tattggcaaa acg	23
<210> 20 <211> 23 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> праймер	
<400> 20 ccttaggttc actggagttc tca	23
<210> 21 <211> 22 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> праймер	
<400> 21 ccggcaagct ctacgagtac tc	22
<210> 22 <211> 19 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> праймер	
<400> 22 gtccscgcaa attgctgat	19
<210> 23 <211> 23 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> праймер	
<400> 23 aatctgagga tgaaggtgtc aca	23
<210> 24 <211> 23 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> праймер	
<400> 24	

gcttgacaag ttgttcgctt tct	23
<210> 25	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> праймер	
<400> 25	
gtcgacttcc ccgagcatta	20
<210> 26	
<211> 17	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> праймер	
<400> 26	
ataggcgccg gggttag	17
<210> 27	
<211> 12952	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> вектор	
<400> 27	
gccgatcgtg aagtttctca tctaagcccc catttggacg tgaatgtaga cacgtcgaaa	60
taaagatttc cgaattagaa taatttgttt attgctttcg cctataaata cgacggatcg	120
taatttgctg ttttatcaaa atgtactttc attttataat aacgctgcgg acatctacat	180
ttttgaattg aaaaaaatt ggtaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatac	240
tcattgctga tccatgtaga tttcccgac atgaagccat ttacaattga atatatcctg	300
ccgcgcgtgc cgctttgcac ccggtggagc ttgcatgttg gtttctacgc agaactgagc	360
cggttaggca gataatttcc attgagaact gagccatgtg caccttcccc ccaacacggt	420
gagcgacggg gcaacggagt gatccacatg ggacttttaa acatcatccg tcggatggcg	480
ttgcgagaga agcagtcgat ccgtgagatc agccgacgca ccgggcaggc gcgcaacacg	540
atcgcaaatg atttgaacgc aggtacaatc gagccgacgt tcacgcggaa cgaccaagca	600
agctatgttg cgattacttc gccaaactatt gcgataacaa gaaaaagcca gcctttcatg	660
atatatctcc caatttgtgt agggcttatt atgcacgctt aaaaataata aaagcagact	720
tgacctgata gtttggtgtg gagcaattat gtgcttagtg catctaagc ttgagttaag	780

ccgcgccgcg aagcggcgtc ggcttgaacg aattgttaga cattatattgc cgactacett	840
ggtgatctcg cctttcacgt agtggacaaa ttcttccaac tgatctgcgc gcgaggccaa	900
gcgatcttct tcttgtccaa gataagcctg tctagcttca agtatgacgg gctgatactg	960
ggccggcagg cgctccattg cccagtcggc agcgacatcc ttccggcgga ttttgccggt	1020
tactgcgctg taccaaatgc gggacaacgt aagcactaca tttcgctcat cgccagccca	1080
gtcggggcgc gagttccata gcgttaaggt ttcatttagc gcctcaaata gatcctgttc	1140
aggaaccgga tcaaagagtt cctccgcgcg tggacctacc aaggcaacgc tatgttctct	1200
tgcttttgtc agcaagatag ccagatcaat gtcgatcgtg gctggctcga agatacctgc	1260
aagaatgtca ttgcgctgcc attctccaaa ttgcagttcg cgcttagctg gataacgcca	1320
cggaatgatg tcgtcgtgca caacaatggt gacttctaca gcgcggagaa tctcgtcttc	1380
tccaggggaa gccgaagttt ccaaaggtc gttgatcaaa gtcgcgcgcg ttgtttcatt	1440
aagccttacg gtcaccgtaa ccagcaaata aatatcactg tgtggcttca ggccgccatc	1500
cactgcggag ccgtacaaat gtacggccag caacgtcggg tcgagatggc gtcgatgac	1560
gccaaactacc tctgatagtt gagtcgatac ttccggcgatc accgcttccc tcatgatgtt	1620
taactttgtt ttagggcgac tgccctgctg cgtaacatcg ttgctgctcc ataacatcaa	1680
acatcgaccc acggcgtaac gcgcttgctg ctgggatgcc cgaggcatag actgtacccc	1740
aaaaaaacag tcataacaag ccataaaaac cgccactgcg ccgttaccac cgctgcgttc	1800
ggtcaagggt ctggaccagt tgcgtgagcg catacgctac ttgcattaca gcttacgaac	1860
cgaacaggct tatgtccact gggttcgtgc cttcatccgt tccacgggtg tgcgtcacc	1920
ggcaaccttg ggcagcagcg aagtcgagcg atttctgtcc tggctggcga acgagcgcaa	1980
ggtttcggtc tccacgcac gtcaggcata cccaccgggt ccttgatgtg ggccggggcg	2040
gtcagtgagg gacggcgcg cttgtccgcg cctgggtaga ttgcctggcc gtaggcacgc	2100
catttttgag cggccagcgg ccgcgatagg ccgacgcgaa gcggcggggc gtagggagcg	2160
cagcgaccga agggtaggcg ctttttgacg ctcttcgggt gtgcgctggc cagacagtta	2220
tgcacaggcc aggggggttt taagagtttt aataagtttt aaagagtttt aggcggaaaa	2280
atcgcccttt ttctctttta tatcagtcac ttacatgtgt gaccggttcc caatgtacgg	2340
ctttgggttc ccaatgtacg ggttcgggtt cccaatgtac ggctttgggt tcccaatgta	2400
cgtgctatcc acagaaaaga gaccttttcg acctttttcc cctgctaggg caatttgccc	2460
tagcatctgc tccgtacatt aggaaccggc ggatgcttcg ccctcgatca ggttgcggtg	2520
gcgcgatgact aggatcgggc cagcctgccc cgcctcctcc ttcaaatcgt actccggcag	2580
gtcatttgac ccgatcagct tgcgcacggt gaaacagaac ttcttgaact ctccggcgct	2640

gccactgcgt tcgtagatcg tcttgaacaa ccatctgget tctgccttgc ctgcggcgcg	2700
gcgtgccagg cggtagagaa aacggccgat gccgggatcg atcaaaaagt aatcggggtg	2760
aaccgtcagc acgtccgggt tcttgccttc tgtgatctcg cggtagatcc aatcagctag	2820
ctcgatctcg atgtactccg gccgcccggg ttctgtcttt acgatcttgt agcggctaata	2880
caaggcttca ccctcggata ccgtcaccag gcggccgttc ttggccttct tcgtacgctg	2940
catggcaacg tcgctgggtg ttaaccgaat gcaggtttct accaggtcgt ctttctgctt	3000
tccgccatcg gctcgcgggc agaacttgag tacgtccgca acgtgtggac ggaacacgcg	3060
gccgggcttg tctcccttcc cttcccggta tcggttcatg gattcgggta gatgggaaac	3120
cgccatcagt accaggtcgt aatcccacac actcgcctatg ccggccggcc ctgcggaaac	3180
ctctacgtgc ccgtctggaa gctcgtagcg gatcacctcg ccagctcgtc ggtcacgctt	3240
cgacagacgg aaaacggcca cgtccatgat gctgcgacta tcgggggtgc ccacgtcata	3300
gagcatcgga acgaaaaaat ctggttgctc gtcgcccttg ggcggcttcc taatcgacgg	3360
cgcaccggct gccggcggtt gccgggattc tttgcggatt cgatcagcgg ccgcttgcca	3420
cgattcacgg gggcgtgctt ctgcctcgat gcgttgccgc tgggcggcct gcgcgcctt	3480
caacttctcc accaggtcat caccacgcgc cgcgcgatt tgtagccggc cggatgggtt	3540
gcgaccgctc acgccgattc ctccggcttg ggggttccag tgccattgca gggccggcag	3600
acaaccacgc cgcttacgoc tggccaaccg cccgttcctc cacacatggg gcattccacg	3660
gcgtcgggtc ctggttggtc ttgattttcc atgcgcctc ctttagccgc taaaattcat	3720
ctactcattt attcatttgc tcattttact tggtagctgc gcgagtatt cagatagcag	3780
ctcggtaatg gtcttgccctt ggcgtagcgc gtacatcttc agcttggtgt gatectccgc	3840
cggcaactga aagttgacct gcttcatggc tggcgtgtct gccaggctgg ccaacgttgc	3900
agccttgctg ctgcgtgcgc tcggacggcc ggcacttagc gtgtttgtgc ttttgctcat	3960
tttctcttta cctcattaac tcaaatgagt tttgatttaa tttagcggc cagcgccctg	4020
acctcgggg cagcgtcgcc ctccgggtct gattcaagaa cgggttggtc ggcggcgga	4080
gtgcctgggt agctcacgcg ctgcgtgata cgggactcaa gaatggcag ctcgtagccg	4140
gccagcgctt cggcaacctc accgcgatg cgcgtgcctt tgatcgccc cgacacgaca	4200
aaggccgctt gtagccttcc atccgtgacc tcaatgcgct gcttaaccag ctccaccagg	4260
tcggcggtgg cccatatgtc gtaagggtt ggctgcacc gaatcagcac gaagtggct	4320
gccttgatcg cggacacagc caagtccgcc gcctggggcg ctccgtcgat cactacgaag	4380
tcggccggc cgatggcctt cactcgcgg tcaatcgtcg ggcggctgat gccgacaacg	4440

gttagcggtt gatcttccc caccgccc caatcgcg ggactgccctg gggatcgga	4500
tcgactaaca gaacatcgcc cccggcgagt tgcaggcgcc gggctagatg ggttgcgatg	4560
gtcgtcttgc ctgaccgcc tttctggta agtacagcga taaccttcat gcgttcccct	4620
tgcgtatttg tttatttact catcgcatca tatacgcagc gaccgcatga cgcaagctgt	4680
tttactcaaa tacacatcac ctttttagac ggcggcgctc ggtttcttca gcggccaagc	4740
tcgcgggcca ggcgcgagc ttggcatcag acaaaccggc caggatttca tgcagccgca	4800
cggttgagac gtgcgcgggc ggctcgaaca cgtaaccggc cgcgatcatc tcgcctcga	4860
tccttcctgt aatgaaaaac ggttcgtcct ggccgtcctg gtgcgggttc atgcttgttc	4920
ctcttgcggt tcattctcgg cggccgcccag ggcgtcggcc tcggtoaatg cgctctcacg	4980
gaaggcaccg cgcgcgctgg cctcgggtgg cgtaacttcc tcgctgcgct caagtgcgcg	5040
gtacagggtc gagcgatgca cgccaagcag tgcagccgcc tctttcacgg tgcggccttc	5100
ctggtcgatc agctcgcggg cgtgcgcgat ctgtgcgggg gtgagggtag ggcgggggcc	5160
aaacttcacg cctcgcgctc tggcgccctc gcgcccgcctc cgggtgcggt cgatgattag	5220
ggaacgctcg aactcggaac tgccggcgaa caccgtcaac accatgcggc cggccggcgt	5280
gggtggtgct gccacggct ctgccaggct acgcaggccc gcgcggcct cctggatgcg	5340
ctcggaatg tccagtaggt cgcgggtgct gcgggccagg cggctctagcc tggtaactgt	5400
cacaacgtcg ccaggcgcta ggtggtcaag catcctggcc agctccgggc ggtcgcgcct	5460
ggtgcgggtg atcttctcgg aaaacagctt ggtgcagccg gccgcgtgca gttcggcccg	5520
ttggttggtc aagtctcgtt cgtcgggtgt gacgcgggca tagccagca ggcagcggc	5580
ggcgctcttg ttcatggcgt aatgtctccg gttctagtgc caagtattct actttatgcg	5640
actaaaacac gcgacaagaa aacgccagga aaaggcgagg gcggcagcct gtcgcgtaac	5700
ttaggacttg tgcgacatgt cgttttcaga agacggctgc actgaacgtc agaagccgac	5760
tgcactatag cagcggaggg gttggatcga cctcgacgta cccctgcctc gcgcgtttcg	5820
gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt	5880
aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgctc agcgggtgtt ggcgggtgtc	5940
ggggcgcagc catgaccagc tcacgtagcg atagcggagt gtatactggc ttaactatgc	6000
ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg	6060
cgtaaggaga aaataaccga tcaggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgtgcg	6120
ctcggctcgt cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tcggttatcc	6180
acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg	6240
aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcggtt ttccataggc tcgcccccc tgacgagcat	6300

cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag	6360
gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gottaccgga	6420
tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg	6480
tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgtccc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt	6540
cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac	6600
gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc	6660
ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct aactagaag aacagtattt	6720
ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc	6780
ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc	6840
agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtg	6900
aacgaaaact cactgtaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag	6960
atccttttcg gcgtccacat caacggcgtc ggcggcgact gcccaggcaa gaccgagatg	7020
caccgcgata tcttgctgcg ttcggatatt ttcgtggagt tcccgccaca gaccgggatt	7080
gaaggcgaga tccagcaact cgcgccagat catcctgtga cggaactttg gcgcgtgatg	7140
actggccagg acgtcgcccg aaagagcgac aagcagatca cgcttttcga cagcgtcgga	7200
tttgcgatcg aggatttttc ggcgtgcgc tacgtccgcg accgcgttga gggatcaagc	7260
cacagcagcc cactcgacct tctagccgac ccagacgagc caagggatct ttttggaatg	7320
ctgctccgtc gtcaggcttt ccgacgtttg ggtggttgaa cagaagtcac tatcgcacgg	7380
aatgccaaag actcccagg ggaaccctgt ggttggcatg cacatacaaa tggacgaacg	7440
gataaacctt ttcacgcctt tttaaatatc cgattattct aataaacgct cttttctctt	7500
aggtttaccg gccaatatat cctgtcaaac actgatagtt taaaccgaag gcgggaaacg	7560
acaatctgat cgggtaccgg gcccaagatc tggcccttaa ggccttacta ggctgcagt	7620
cagcgtgacc cggtcgtgcc cctctctaga gataatgagc attgcatgtc taagttataa	7680
aaaattacca catatttttt ttgtcacact tgtttgaagt gcagtttatc tatctttata	7740
catatattta aactttactc tacgaataat ataactata gtactacaat aatatcagtg	7800
ttttagagaa tcatataaat gaacagttag acatggtcta aaggacaatt gagtattttg	7860
acaacaggac tctacagttt tatcttttta gtgtgcatgt gttctccttt ttttttgcaa	7920
atagcttcac ctatataata cttcatccat tttattagta catccattta gggtttaggg	7980
ttaatgggtt ttatagacta atttttttag tacatctatt ttattctatt ttagcctcta	8040
aattaagaaa actaaaactc tattttagtt tttttattta ataatttaga tataaaatag	8100

aataaaataa agtgactaaa aattaaacaa atacccttta agaaattaaa aaaactaagg	8160
aaacattttt cttgtttcga gtagataatg ccagcctgtt aaacgccgtc gatcgacgag	8220
tetaacggac accaaccagc gaaccagcag cgtcgcgtcg ggccaagcga agcagacggc	8280
acggcatctc tgtcgtgcc tctggacccc tctcgagagt tccgctccac cgttggaactt	8340
gctccgctgt cggcatccag aaattgcgtg gcggagcggc agacgtgagc cggcacggca	8400
ggcgccctcc tctcctctc acggcacccg cagctacggg ggattccttt cccaccgtc	8460
cttcgcttcc ccttcctcgc ccgccgtaat aaatagacac cccctccaca cctcttttcc	8520
ccaacctcgt gttgttcgga gcgcacacac acacaaccag atctccccc aatccaccgc	8580
tcggcacctc cgcttcaagg tacgccgtc gtctccccc cccccccctc tctaccttct	8640
ctagatcggc gttccgggtcc atggttaggg cccggtagtt ctacttctgt tcatgtttgt	8700
gttagatccg tgtttgtgtt agatccgtgc tgctagcgtt cgtacacgga tgcgacctgt	8760
acgtcagaca cgttctgatt gctaacttgc cagtgtttct ctttgggaa tcttgggatg	8820
gctctagccg ttccgcagac gggatcgatc taggataggt atacatgttg atgtgggttt	8880
tactgatgca tatacatgat ggcataatga gcactctatc atatgctcta accttgagta	8940
cctatctatt ataataaaca agtatgtttt ataattattt tgatcttgat atacttgat	9000
gatggcatat gcagcagcta tatgtggatt ttttttagccc tgccttcata cgctatttat	9060
ttgcttggtg ctgtttcttt tgctgatgct caccctgttg tttggtgtta cttctgcagg	9120
tactagtgga tccccgggc tgcaggaatt caagcttacg cgtgtcatca caagtttgta	9180
caaaaaagca ggcttaatgg aggagaggag gatgttgacg gagcagcagc aggaggaggc	9240
tcatggccat gggggaaaagg aggaggaggg gaaggaggag aagaagcgtg ggaagggtgga	9300
gctgaggagg atagaggacc ggacgagccg gcaggtgcgc ttctcgaagc ggcgagcgg	9360
gctgttcaag aaggcgttcg agctgtccgt gctgtgcgac gtcgaggtcg cgctcatcgt	9420
cttctccccc gccggacgac tctaccgtt cgtctcctcc gaaagcagcg ttgaggagat	9480
ttttggtcga tgccggcatc tcccaacac aatagatctc aatattgagg tacgagatcc	9540
tcgagttgat cacgatatac agattgatct gaatgagcag gcagcaccag acccactatc	9600
tgatttaaac cactttgctg actggatcct ggaaattgat gttaactcga tgggcatggc	9660
tgagctaaga cgttttgagg aaattgttcc tgacgctctg acagttatca agaacaatct	9720
gaggatgaag gtgtcacagc tccccagac cgagagaaac ccacaggaga aagcgaacaa	9780
cttgtcaagc caagaatcgg aggagtata cccagcttcc ttgtacaaag tgggtgatgac	9840
tcgaatttcc ccgatcgttc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt	9900
gccggtcttg cgatgattat catataattt ctgttgaatt acgttaagca tgtaataatt	9960

aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta	10020
tacatttaaat acgogataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc	10080
gcggtgtcat ctatgttact agatcgtctg acgcggccgc catggcctct agtggatcag	10140
cttgcattgcc tgcaggtcac tggattttgg ttttaggaat tagaaatttt attgatagaa	10200
gtatttttaca aatacaaata cataactaagg gtttcttata tgctcaacac atgagcgaaa	10260
ccctataaga accctaattc ccttatctgg gaactactca cacattattc tggagaaaaa	10320
tagagagaga tagatttgta gagagagact ggtgattttt gcggactccg gtcggcatct	10380
actctattcc tttgcctctg gacgagtgtc ggggcgtcgg tttccactat cggcgagtac	10440
ttctacacag ccatcgggtcc agacggccgc gcttctgcgg gcgattttgtg tacgcccgac	10500
agtcccggtc ccggatcgga cgattgcgtc gcatcgacct tgcgcccaag ctgcatcatc	10560
gaaattgccg tcaaccaagc tctgatagag ttggtcaaga ccaatgcgga gcatatacgc	10620
ccggagccgc ggcatcctg caagctccgg atgcctccgc togaagtagc gcgtctgctg	10680
ctccatacaa gcccaaccacg gcctccagaa gaagatgttg gcgacctcgt attgggaatc	10740
cccgaacatc gcctcgtctc agtcaatgac cgctgttatg cggccattgt ccgtcaggac	10800
attgttgtag ccgaaatccg cgtgcacgag gtgccggact tcggggcagt cctcggccca	10860
aagcatcagc tcacatgagag cctgcgcgac ggacgcactg acggtgtcgt ccatcacagt	10920
ttgccagtga tacacatggg gatcagcaat cgcgcatatg aaatcacgcc atgtagtgtg	10980
ttgaccgatt ccttgcggtc cgaatgggoc gaaccgcctc gtctggctaa gatcggccgc	11040
agcgatcgca tccatggcct ccgcgaccg ctgcagaaca gcgggcagtt cggtttcagg	11100
caggctcttgc aacgtgacac cctgtgcacg gcgggagatg caataggtea ggtctctgct	11160
gaattcccca atgtcaagca cttccggaat cgggagcgcg gccgatgcaa agtgccgata	11220
aacataacga tctttgtaga aaccatcggc gcagctattt acccgcagga catatccacg	11280
ccctcctaca tcgaagctga aagcacgaga ttcttcgccc tcgagagct gcatcaggtc	11340
ggagacgctg tcgaactttt cgatcagaaa cttctcgaca gacgtcgcgg tgagttcagg	11400
ctttttcata tcttattgcc ccccggggcc ctcgacctgc agaagtaaca ccaaacaaca	11460
gggtgagcat cgacaaaaga aacagtacca agcaaataaa tagcgtatga aggcagggct	11520
aaaaaaatcc acatatagct gctgcatatg ccatcatcca agtatatcaa gatcaaaata	11580
attataaaac atacttgttt attataatag ataggtaactc aaggtttagag catatgaata	11640
gatgctgcat atgccatcat gtatatgcat cagtaaaacc cacatcaaca tgtataccta	11700
tcctagatcg atcccgtctg cggaacggct agagccatcc caggattccc caaagagaaa	11760

```

cactggcaag ttagcaatca gaacgtgtct gacgtacagg tcgcatccgt gtacgaacgc 11820
tagcagcacg gatctaacac aaacacggat ctaacacaaa catgaacaga agtagaacta 11880
ccggggcccta accatggacc ggaacgccga tctagagaag gtagagaggg gggggggggg 11940
aggacgagcg gcgtaccttg aagcggaggt gccgacgggt ggatttgggg gagatctggt 12000
tgtgtgtgtg tgcgctccga acaacacgag gttggggaaa gaggggtgtg aggggggtgc 12060
tatttattac ggcgggcgag gaagggaaag cgaaggagcg gtgggaaagg aatccccctg 12120
agctgcgggt gccgtgagag gaggaggagg ccgcctgccg tgccggctca cgtctgcgc 12180
tccgccacgc aattttctga tgccgacagc ggagcaagtc caacggtgga gcggaactct 12240
cgagaggggt ccagaggcag cgacagagat gccgtgccgt ctgcttcgct tggcccgacg 12300
cgacgctgct ggttcgctgg ttggtgtccg ttagactcgt cgatcgacgg cgtttaacag 12360
gctggcatta tctactcgaa acaagaaaaa tgtttcctta gtttttttaa tttcttaaag 12420
ggtatattgt taatttttag tcaactttatt ttattctatt ttatatctaa attattaaat 12480
aaaaaaacta aaatagagtt ttagttttct taatttagag gctaaaatag aataaaatag 12540
atgtactaaa aaaattagtc tataaaaaacc attaacctta aaccctaaat ggatgtacta 12600
ataaaatgga tgaagtatta tataggtgaa gctatttgca aaaaaaagg agaacacatg 12660
cacactaaaa agataaaact gtagagtcct gttgtcaaaa tactcaattg tcctttagac 12720
catgtctaac tgttcattta tatgattctc taaaacactg atattattgt agtactatag 12780
attatattat tcgtagagta aagtttaa atattgtataa agatagataa actgcacttc 12840
aaacaagtgt gacaaaaaaa atatgtggtt attttttata acttagacat gcaatgctca 12900
ttatctctag agagggggcac gaccgggtca cgctgcactg cagactacta ga 12952

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб прискорення цвітіння, розвитку насіння або уповільнення проростання насіння у однодольних рослин, який включає наступні етапи:
 - а) функціональне зв'язування рослинного промотору з нуклеїновою кислотою, яка кодує мовчазну РНК, гетерологічну стосовно вказаного промотору, при цьому мовчазна РНК орієнтована на FLC ген та/або білок у вказаній рослині, частині рослини, органі рослини або
 - 10 рослинній клітині вказаної рослини, де FLC білок містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, 8 або 18 або FLC ген містить нуклеотидну послідовність, що кодує білок, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, 8 або 18, або де вказаний FLC ген містить нуклеотид послідовності SEQ ID NO: 1, 7 або 17, та
 - б) введення химерного гена, утвореного на етапі а) в однодольну рослину, тим самим
 - 15 забезпечуючи зниження експресії та/або активності вказаного FLC гена.
- 2 2. Спосіб одержання однодольної рослини, вибраної з кукурудзи, ячменю, пшениці, жита або вівса, у якій прискорюються цвітіння та розвиток насіння або уповільнюється проростання насіння, де вказаний спосіб включає наступні етапи:
 - а) функціональне зв'язування рослинного промотору з нуклеїновою кислотою, що кодує мовчазну РНК, гетерологічну стосовно вказаного промотору, при цьому мовчазна РНК орієнтована на FLC ген та/або білок у вказаній рослині, частині рослини, органі рослини або
 - 20 рослинній клітині вказаної рослини, де FLC білок містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, 8 або 18, або FLC ген містить нуклеотидну послідовність, що кодує білок, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, 8 або 18, або де вказаний FLC ген містить нуклеотид послідовності SEQ ID NO: 1, 7 або 17, та
 - 25 б) введення химерного гена, утвореного на етапі а) в рослину кукурудзи, ячменю, пшениці, жита або вівса.
- 3 3. Спосіб за п. 1 або 2, в якому вказана мовчазна РНК містить:
 - а) щонайменше 19 з 20 послідовних нуклеотидів нуклеотидної послідовності вказаного FLC
 - 30 гена;
 - б) щонайменше 19 з 20 послідовних нуклеотидів комплементу нуклеотидної послідовності вказаного FLC гена; або

с) смислову ділянку, яка містить нуклеотидну послідовність із щонайменше 19 з 20 послідовних нуклеотидів нуклеотидної послідовності вказаного FLC гена, та антисмислову ділянку, яка містить нуклеотидну послідовність із щонайменше 19 з 20 послідовних нуклеотидів комплемента нуклеотидної послідовності вказаного FLC гена, де вказані смислова та антисмислова ділянки є здатними до утворення дволанцюгової ділянки РНК, що містить вказані щонайменше 19 з 20 послідовних нуклеотидів.

4. Спосіб за будь-яким із пунктів 1-3, в якому вказана однодольна рослина є сільськогосподарською зерновою рослиною, такою як зернова рослина помірних широт, така як рослина або озимий різновид будь-якої із вказаних рослин.

5. Застосування

а) химерного гена, який містить рослинний промотор, функціонально зв'язаний з нуклеїновою кислотою, що кодує мовчазну РНК, гетерологічну стосовно вказаного промотору, при цьому мовчазна РНК орієнтована на FLC ген та/або білок у вказаній рослині, частині рослини, органі рослини або рослинній клітині вказаної рослини, де FLC білок містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, 8 або 18, або FLC ген містить нуклеотидну послідовність, що кодує білок, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, 8 або 18, або де вказаний FLC ген містить нуклеотид послідовності SEQ ID NO: 1, 7 або 17;

б) FLC білка, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, 8 або 18;

с) нуклеїнової кислоти, що кодує білок, зазначений в б)

для прискорення цвітіння, розвитку насіння або уповільнення проростання насіння або уповільнення цвітіння, розвитку насіння та прискорення проростання насіння у однодольній рослині, такої як сільськогосподарська зернова рослина, така як зернова рослина помірних широт, така як рослина пшениці.

6. Рослина, частина рослини, орган рослини, клітина рослини або насіння, вибрані з кукурудзи, ячменю, пшениці, жита або вівса, що містять химерний ген, який описаний в будь-якому із пунктів 1 або 3.

7. Рослина за п. 6, яка є рослиною пшениці або її озимому різновидністю.

8. Спосіб ідентифікації однодольної рослини з прискореним або уповільненим цвітінням, розвитком насіння та уповільненим або прискореним проростанням насіння, який включає етапи:

а) забезпечення популяції однодольних рослин;

б) ідентифікації однієї або більше рослин із мутантним алелем FLC гена, та

с) ідентифікації серед вказаних рослин з мутантним алелем FLC гена однієї або більше рослин, які мають прискорений час цвітіння, розвиток насіння або уповільнене проростання насіння у порівнянні з рослиною, яка не містить вказаної мутації або яка має уповільнений час цвітіння, розвиток насіння або прискорене проростання насіння у порівнянні з рослиною, яка не містить вказаної мутації,

де вказаний FLC ген містить нуклеотидну послідовність, що кодує білок, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, 8 або 18, або де вказаний FLC ген містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1, 7 або 17.

9. Спосіб уповільнення цвітіння, розвитку насіння або прискорення проростання насіння у однодольній рослині, який включає етап підвищення експресії та/або активності FLC гена та/або білка у вказаній рослині, або частині рослини, рослинному органі або рослинній клітині вказаної рослини, де FLC білок містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, 8 або 18, або FLC ген містить нуклеотидну послідовність, що кодує білок, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, 8 або 18, або де вказаний FLC ген містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1, 7 або 17, при цьому вказане підвищення експресії вказаного FLC гена та/або білка у вказаній рослині включає експресію у вказаній рослині, частині рослини, рослинному органі або рослинній клітині химерного гена, який містить наступні функціонально зв'язані елементи:

i) рослинний промотор,

ii) нуклеїнову кислоту, яка кодує FLC білок, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, 8 або 18, або нуклеїнову кислоту, що містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1, 7 або 17.

10. Спосіб одержання однодольної рослини, вибраної з кукурудзи, ячменю, пшениці, жита або вівса, у якій уповільнюється цвітіння, розвиток насіння або прискорюється проростання насіння, який включає наступні етапи:

а) функціональне зв'язування рослинного промотору з нуклеїновою кислотою, що кодує FLC ген, гетерологічний стосовно вказаного промотору, де FLC білок містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, 8 або 18, або FLC ген містить нуклеотидну послідовність, що кодує білок, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, 8 або 18, або де вказаний FLC

- ген містить нуклеотид послідовності SEQ ID NO: 1, 7 або 17, та
- b) введення химерного гена, утвореного на етапі а) в однодольну рослину, тим самим забезпечуючи підвищення експресії та/або активності вказаного FLC гена.
11. Спосіб за п. 10, в якому вказана рослина є сільськогосподарською зерною рослиною, такою як зернова рослина помірних широт, така як рослина або озимий різновид будь-якої із вказаних рослин.
12. Рослина, частина рослини, орган рослини, клітина рослини або насіння, вибрані з кукурудзи, ячменю, пшениці, жита або вівса, що містять химерний ген, описаний в п. 10.
13. Рослина за п. 12, яка є рослиною пшениці або її озимому різновидністю.

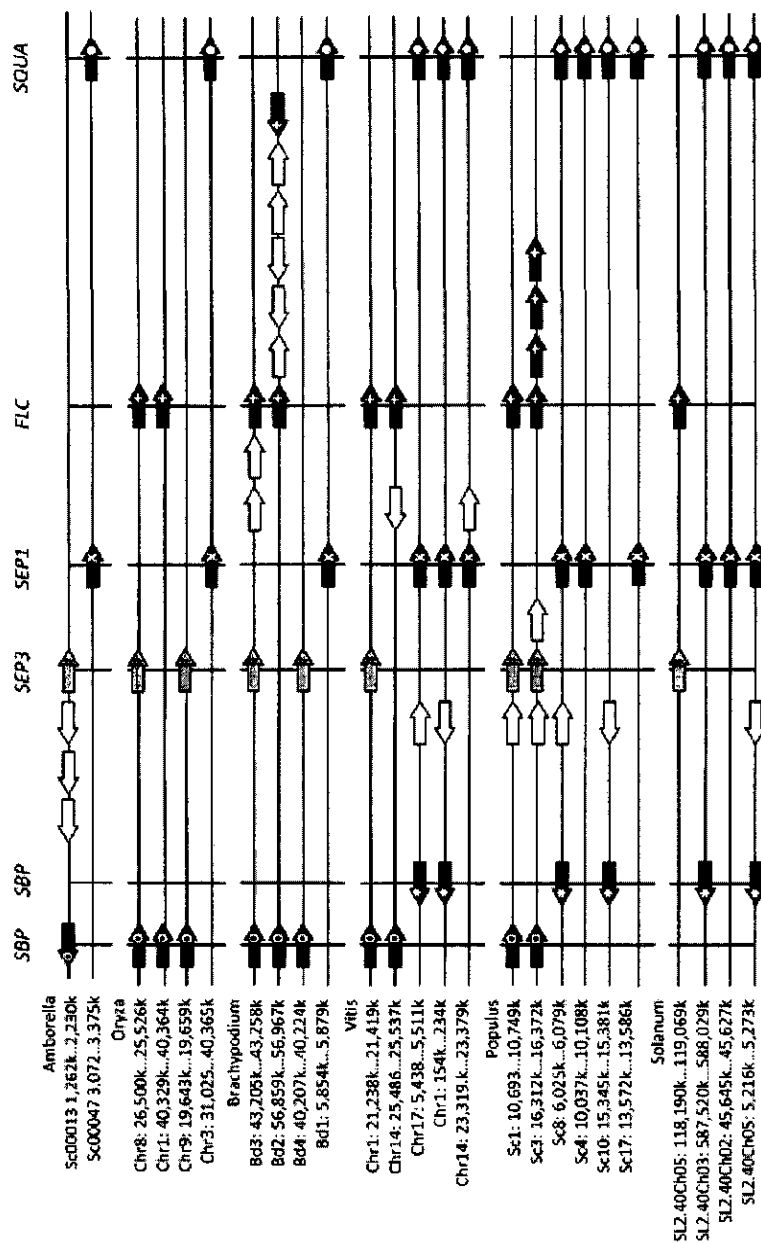
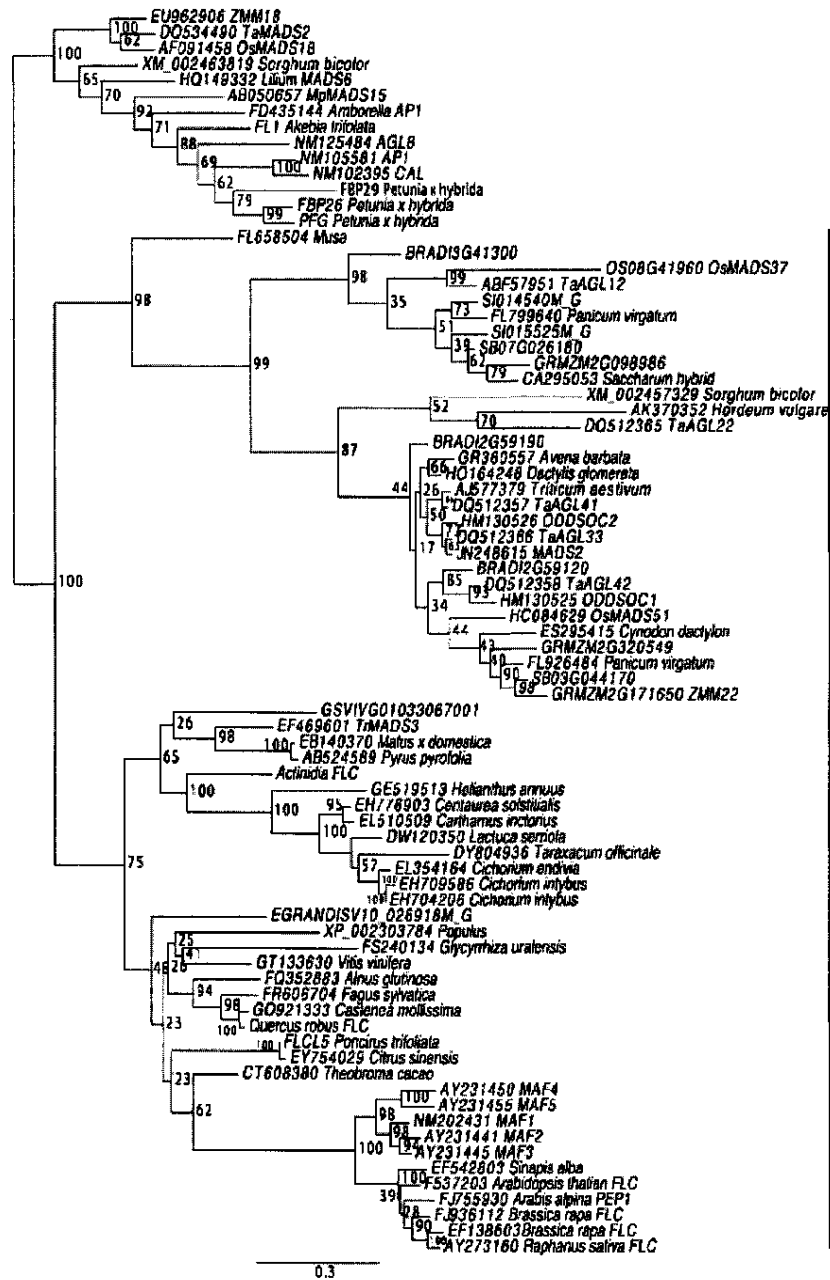
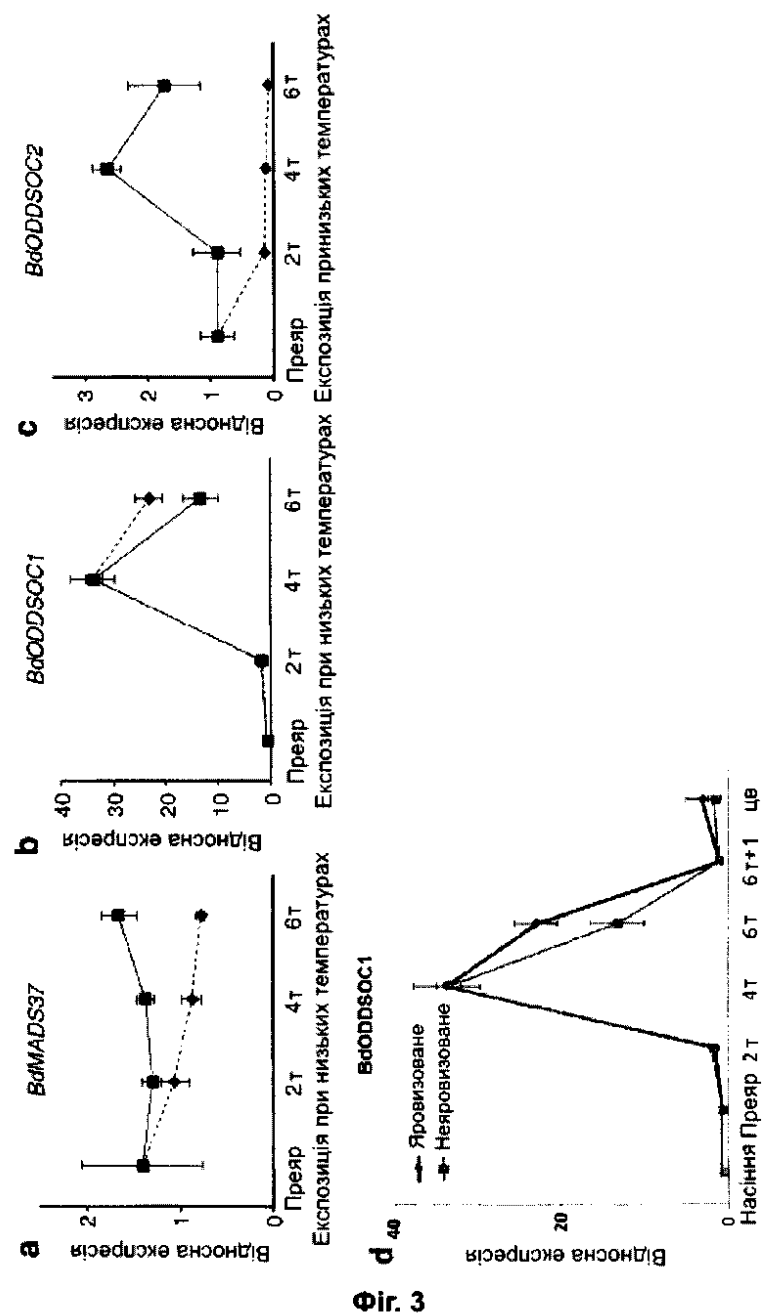


Fig. 1



FLOWERING LOCUS C

Fig. 2



Експресія у відповідь на холод	Функція	Цитування
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> VvMADS7	Даунрегуляція	Це дослідження
<i>Oryza sativa</i> OsMADS1	Даунрегуляція	Kim et al., 2007
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> VvOOSOC1	Невизначений	Це дослідження
<i>Nicotiana glauca</i> NgOOSOC1	Апрегуляція	Greenup et al., 2010
<i>Thalictrum thalictroides</i> TtMGL42	Апрегуляція	Winkler et al., 2009
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> VvOOSOC3	Даунрегуляція	Це дослідження
<i>Nicotiana glauca</i> NgOOSOC3	Даунрегуляція	Greenup et al., 2010
<i>Thalictrum thalictroides</i> TtMGL33	Даунрегуляція	Winkler et al., 2009
<i>Rubus idaeus</i> RiFLC	Апрегуляція	Zhang et al., 2009
<i>Eustoma eustoma</i> EeFLC	Апрегуляція	Nakano et al., 2011
<i>Beta vulgaris</i> BvFL1	Даунрегуляція	Reeves et al., 2007
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtMFL2	Даунрегуляція	Kelchke et al., 2003
<i>Shorea robusta</i> SrFLC	Даунрегуляція	O'Aluisi et al., 2008
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtMFL1	Даунрегуляція	Wang et al., 2009
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtFLC	Даунрегуляція	Michaelis & Amasino, 1999
<i>Thalictrum thalictroides</i> TtFLC	Даунрегуляція	Fang et al., 2006
<i>Brassica napus</i> BnFLC2	Даунрегуляція	Zhao et al., 2010
<i>Thalictrum thalictroides</i> TtMADS3	Апрегуляція	Xiao et al., 2008

Фіг. 4