



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **130796** (13) **C2**
(51) МПК (2026.01)

A01H 5/12 (2018.01)

A01H 6/82 (2018.01)

C12N 9/06 (2006.01)

A24B 15/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2021 01971**

(22) Дата подання
заявки: **16.12.2019**

(24) Дата, з якої є
чинними права
інтелектуальної
власності: **21.05.2026**

(31) Номер попередньої
заявки відповідно
до Паризької
конвенції: **18215913.7**

(32) Дата подання
попередньої заявки
відповідно до
Паризької конвенції: **30.12.2018**

(33) Код держави-
учасниці Паризької
конвенції, до якої
подано попередню
заявку: **EP**

(41) Публікація
відомостей про
заявку: **03.11.2021, Бюл.№ 44**

(46) Публікація
відомостей про
державну
реєстрацію: **20.05.2026, Бюл.№ 20**

(86) Номер та дата
подання
міжнародної заявки,
поданої відповідно
до Договору РСТ **PCT/EP2019/085321,
16.12.2019**

(72) Винахідник(и):

**Бове Люсьєн (CH),
Кампаноні Пріска (CH),
Гйопферт Сімон (CH)**

(73) Володілець (володільці):

**ФІЛІП МОРРІС ПРОДАКТС С.А.,
Quai Jeanrenaud 3, CH-2000 Neuchâtel,
Switzerland (CH)**

(74) Представник:

**Шляховецький Ілля Олександрович, реєстр.
№190**

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

WO 2016/046288 A1, 31.03.2016

XP_023536153. Nitrate reductase [NADH]-like
[Cucurbita pepo subsp. pepo], 22.01.2018 [online]
URL:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_023536153
[retrieved 08.04.2025]

UA 33961 U, 25.07.2008

(54) **ВИСУШЕНЕ ЛИСТЯ РОСЛИНИ NICOTIANA TABACUM, В ЯКОМУ РІВНІ НІТРАТІВ ЗМЕНШЕНІ ЗА ДОПОМОГОЮ МУТАЦІЇ НІТРАТРЕДУКТАЗИ, СПОСІБ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ ТА ТЮТЮНОВИЙ ПРОДУКТ**

(57) Реферат:

Висушене листя рослини *Nicotiana tabacum*, що не зустрічається в природі, що містить полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид - нітратредуктазу, що містить безперервну поліпептидну послідовність SEQ ID NO: 3, де метіонін замінений ізолейцином в положенні, відповідному до положення 527 послідовності, що характеризується послідовністю SEQ ID NO: 1, при цьому згадана заміна зменшує рівні нітратів у висушеному листі у порівнянні з контрольною рослиною.

UA 130796 C2

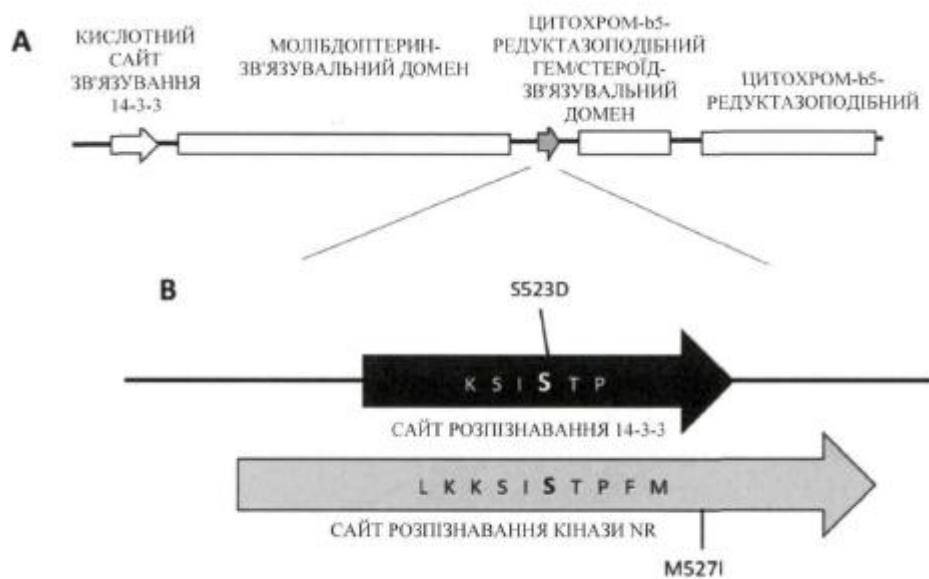


Fig. 1

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ЯКОЇ СТОСУЄТЬСЯ ВІНАХІД

Даний винахід стосується рослин, що характеризуються зменшеними рівнями нітратів, рослинних клітин, одержаних з рослин, продуктів, одержаних з рослин, і способів модулювання рівнів нітратів у рослинах за допомогою здійснення мутації ферменту нітратредуктази.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Деякі рослини, такі як рослини тютюну, накопичують у своїх листках високі рівні вільних нітратів, що є небажаним, оскільки було встановлено, що високі рівні нітратів пов'язані з утворенням канцерогенних сполук, що називають тютюноспецифічними нітрозамінами (TSNA) тютюну, хоча додаткове утворення може відбуватися під час наступної переробки й зберігання листків, а також, можливо, шляхом піросинтезу під час згоряння. Дві з TSNA, що виявляються у висушених листках - N-нітрозонорнікотин (NNN) і 4-(метилнітрозаміно)-1-(3-пиридил)-1-бутанон (NNK) - класифікуються Міжнародним агентством по вивченню раку як канцерогенні речовини групи I (позначення вищого рівня). Через значний обсяг свідчень причетності цих сполук до розвитку різних форм раку, асоційованих із вживанням тютюну, Всесвітньою організацією охорони здоров'я було рекомендовано реалізувати приписання, спрямовані на забезпечення того, щоб у майбутніх тютюнових продуктах рівні таких токсичних речовин були зменшені. TSNA являють собою продукти нітрузування алкалоїдів тютюну. Щодо різновидів тютюну повітряного сушіння існує загальна думка, що нітрит є засобом, безпосередньо відповідальним за утворення TSNA. Однак через свою клітинну токсичність рівні ендогенних нітритів у тканинах рослин, як правило, дуже низки. Вважають, що замість цього переважна більшість нітритів, що беруть участь в утворенні TSNA, утворюється в результаті активності нітратредуктаз мікробів, що перебувають на поверхні листків протягом 6-10 тижнів процесу сушіння, за допомогою якої частина пулу нітратів листку перетворюється в нітрити в міру розпаду клітинних мембран і органел протягом цього періоду.

TSNA утворюються головним чином під час процесу сушіння листків, що передбачає нітрузування алкалоїдів тютюну. Генетичні стратегії зниження вмісту й рівнів TSNA у висушених листках були зосереджені на цілеспрямованому впливі на: (1) алкалоїдний (алкалоїди і) попередник (попередники) або (2) нітрузуючий(нітрузуючі) засіб(засоби), що бере участь (що беруть участь). Більшість зусиль по зменшенню вмісту TSNA на рівні зміни генетичних характеристик тютюну були націлені на перетворення алкалоїдних попередників в TSNA. Такі стратегії забезпечують істотне зменшення рівнів NNN внаслідок зниження експресії сімейства генів, відповідальних за синтез його алкалоїдного попередника норнікотину.

Модифіковані рослини тютюну, що характеризуються зменшеними рівнями нітратів, описані заявником, що подає дану заявку, в WO 2016/046288. Згідно з описом у цьому документі експресія або активність ферменту нітратредуктази є дерегульованою. Дерегульований фермент нітратредуктази містить амінокислотну заміну в положенні, відповідному до положення 523 у поліпептиді, що кодує нітратредуктазу. Дану мутацію називають S523D. Надекспресія мутантного ферменту нітратредуктази забезпечувала істотне збільшення асиміляції нітратів, що приводило до низького вмісту нітратів/TSNA і більш високих рівнів амінокислот. Рослини демонстрували на 90 % менший вміст нітратів у порівнянні з контролем.

Бажаною може бути розробка підходів з використанням організмів, що не є генетично модифікованими (що не є GMO), для зменшення накопичення нітратів. Через труднощі, пов'язані з вирощуванням і комерційним використанням генетично модифікованих сільськогосподарських культур у деяких країнах, включаючи європейські, переважною може бути робота з мутантними формами, що мають одонуклеотидні поліморфізми, а не з мутантними формами, одержаними за допомогою застосування методик генної інженерії.

Відповідно, у даній галузі техніки залишається постійна потреба в зменшенні рівнів нітратів у рослинах, особливо за допомогою нетрансгенних підходів.

КОРОТКИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

Даний винахід щонайменше частково заснований на виявленні того факту, що здійснення мутації нітратредуктази (NIA2) *Nicotiana tabacum* за допомогою нетрансгенного підходу може приводити до одержання рослин або рослинного матеріалу, у яких їх висушені листки містить модульовані (наприклад, зменшені) рівні нітратів у порівнянні з висушеними листками, одержаними з контрольної рослини. Одна така мутація, описана в даному документі, локалізована в сайті розпізнавання кіназою нітратредуктази в межах шарнірного домену 1 нітратредуктази *Nicotiana tabacum*.

В Hardin et al. (2009) *Biochem. J.* 422:305-312 містяться відомості про те, що окиснення метіоніну в положенні 538 білка NIA2 *Arabidopsis thaliana* являє собою механізм інгібування фосфорилування білка NIA. Окиснення запобігає зв'язуванню 14-3-3 з нітратредуктазою і

запобігає інактивації нітратредуктази за умов впливу активних форм кисню (ROS), таких як пероксид водню, гідроксильні радикали. Оскільки нітратредуктаза перетворює нітрат у нітрит, що приводить до одержання аміаку й амінокислот, очікується, що підвищення активації нітратредуктази буде призводити до зниження рівня нітратів, як продемонстровано в WO 2016/046288. Отже, очікується, що окиснення M538 у білку NIA2 *Arabidopsis thaliana* до метіонінсульфоксиду буде призводити до зниження рівнів нітратів. M527 у білку NIA2 *Nicotiana tabacum* відповідає M538 в NIA2 *Arabidopsis thaliana*. Властивості мутантних рослин *Nicotiana tabacum*, описаних у даному документі, є несподіваними. NIA2 *Nicotiana tabacum* з мутацією M527I (як добре зрозуміло в даній галузі техніки, M527I означає, що метіонін (M) у положенні 527 замінений ізолейцином (I)) містить заміну метіоніну в положенні 537 ізолейцином, який не може бути окиснений. Відомо, що метіонін окислюється за залишком сірки до метіонінсульфоксиду, тоді як ізолейцин не містить будь-якого залишку сірки у своїй структурі. Виходячи із цієї відмінності, очікується, що NIA2 *Nicotiana tabacum* з мутацією M527I не буде стимулювати активацію нітратредуктази за умов впливу ROS, і в результаті цього механізм зменшення рівнів нітратів у рослині буде усуватися. Однак було несподівано виявлено, що, незважаючи на заміну метіоніну, мутантна рослина згідно з даним винаходом демонструє зменшення рівнів нітратів.

Одержання рослин згідно з даним винаходом забезпечує ряд інших переваг. Наприклад, рослини, описані в даному документі, можуть являти собою рослини, що не є генетично модифікованими, що дозволяє подолати труднощі, пов'язані з вирощуванням і комерційним використанням генетично модифікованих сільськогосподарських культур. У якості додаткового прикладу, зменшення рівнів нітратів може досягатися без впливу на загальну біомасу врожаю рослини, а також на вміст нікотину, загальний вміст алкалоїдів, вміст аміаку або відновлюючих цукрів у листку. Це може поліпшувати комерційну прийнятність рослин, рослинного матеріалу або рослинних продуктів.

В одному аспекті розкрита рослинна клітина, що містить: (a) полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид нітратредуктазу, що містить безперервну поліпептидну послідовність під SEQ ID NO: 5 або SEQ ID NO 7, де метіонін замінений амінокислотою, яка зменшує активність нітратредуктази в рослинній клітині в порівнянні з контрольною рослинною клітиною; (b) поліпептидну послідовність, кодовану полінуклеотидною послідовністю, представленою в (a); або (c) конструкцію, вектор або вектор експресії, що містять полінуклеотидну послідовність, представлену в (b).

Метіонін переважно замінений іншою амінокислотою, більш переважно замінюючи амінокислота являє собою ізолейцин, при цьому більш переважно поліпептид містить безперервну поліпептидну послідовність під SEQ ID NO: 6 або SEQ ID NO: 8

Поліпептид нітратредуктаза переважно містить амінокислотну заміну в положенні, відповідному до положення 527 у послідовності, що характеризується щонайменше 80 % ідентичністю послідовності з SEQ ID NO: 1.

Поліпептид нітратредуктаза переважно містить поліпептидну послідовність, представлену під SEQ ID NO: 3. Полінуклеотидна послідовність переважно містить полінуклеотидну послідовність, що характеризується щонайменше 80 % ідентичністю послідовності з SEQ ID NO: 4.

Полінуклеотидна послідовність переважно містить полінуклеотидну послідовність, представлену під SEQ ID NO: 4.

Рослинна клітина переважно являє собою клітину рослини *Nicotiana tabacum*. Рослинна клітина переважно являє собою клітину рослини *Nicotiana tabacum* культивару AA37.

В іншому аспекті розкриті рослина або його частина, що містять рослинну клітину згідно з кожним з попередніх пунктів; при цьому переважно висушені листки рослини або її частини містять більш низькі рівні нітратів у порівнянні з контрольною рослиною або його частиною, при цьому переважно рівень нітратів зменшений на приблизно 37 % або більше в порівнянні з контрольною рослиною або його частиною.

В іншому аспекті розкритий рослинний матеріал, висушений рослинний матеріал або гомогенізований рослинний матеріал, одержаний з рослини або її частини, описаних у даному документі, при цьому переважно висушений рослинний матеріал являє собою рослинний матеріал повітряного сушіння, або сонячного сушіння, або трубового сушіння; при цьому переважно рослинний матеріал, висушений рослинний матеріал або гомогенізований рослинний матеріал містить біомасу, насіння, стебло, квітки або листки рослини або її частини.

В іншому аспекті розкритий тютюновий продукт, що містить рослинну клітину, описану в даному документі, частину рослини, описану в даному документі, або рослинний матеріал, описаний у даному документі.

В іншому аспекті розкритий спосіб одержання рослини, описаної в даному документі, що включає стадії: (а) одержання рослинної клітини, описаної в даному документі; і (b) розмноження рослинної клітини з одержанням рослини.

В іншому аспекті розкритий спосіб одержання висушеного рослинного матеріалу зі зміненою кількістю нітратів у порівнянні з контрольним рослинним матеріалом, що включає стадії: (а) одержання рослини або її частини, описаних у даному документі, або рослинного матеріалу, описаного в даному документі; (b) необов'язково збору рослинного матеріалу з рослини або її частини й (c) сушіння рослинного матеріалу.

Рослинний матеріал переважно містить висушені листки.

Спосіб сушіння переважно вибраний із групи, що складається з повітряного сушіння, вогневого сушіння, димового сушіння й трубового сушіння.

КОРОТИСИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

На фігурі 1 проілюстровані домени й консенсусні послідовності в послідовності білка NtNIA2. (A) Основні домени білка нітратредуктази NIA2 *Nicotiana tabacum* (GenBank: X14059). (B) Сайт розпізнавання кіназою нітратредуктази (LKKSISTPFM) і сайт розпізнавання 14-3-3 у межах шарнірного домену 1 NtNIA2. Вказані положення мутації S523D з WO 2016/046288 і мутації M527I, описаної в даному документі.

Фігура 2 являє собою серію стовпчастих діаграм, що ілюструють складання хімічного профілю висушених листків, одержаних під час другого збору, і загальної біомаси свіжих листків. (A) Свіжа вага (FW) усіх зібраних листків, виражена у грамах на рослину; (B) вміст нікотину у висушених листках, виражений в мікрограмах на грам висушеного матеріалу; (C) загальний вміст алкалоїдів, виражений у відсотках від сухої ваги висушеного матеріалу; (D) вміст аміаку, виражений у відсотках від сухої ваги висушеного матеріалу; (E) вміст відновлюючих цукрів, виражений у відсотках від сухої ваги висушеного матеріалу; і (F) вміст нітратів, виражений у відсотках від сухої ваги висушеного матеріалу. Контроль AA37 указує на лінії, які не зазнали обробки за допомогою EMS (n=6 дослідних ділянок); NIA2_M527I_WT указує на несережуючі лінії AA37 дикого типу (n=15 дослідних ділянок); NIA2_M527I_НОМО указує на лінії, гомозиготні за NtNIA2 M527I (n=11 дослідних ділянок). Планками похибок вказаний довірчий інтервал на рівні 95 %, розрахований за допомогою t-критерію Стьюдента.

ВИЗНАЧЕННЯ

Якщо не визначене інше, то всі технічні й наукові терміни, використовувані в даному документі, мають таке ж значення, яке зазвичай розуміє фахівець середньої кваліфікації в даній галузі техніки. У випадку протиріч даний документ, включаючи визначення, буде мати переважну силу. Переважні способи й матеріали описані нижче, хоча способи й матеріали, аналогічні або еквівалентні описаним у даному документі, можуть бути застосовані за здійснення даного винаходу на практиці або його тестування. Матеріали, способи й приклади, розкриті в даному документі, є лише ілюстративними й не передбачаються як обмежуючі.

Мається на увазі, що терміни "включають(включає)", "включають(включає) у себе", "що має", "має", "може", "містять(містить)" та їх варіанти, використовувані в даному документі, є відкритими перехідними фразами, термінами або словами, які не виключають можливість наявності додаткових дій або структур.

Форми однини включають посилання на множину, якщо з контексту явно не випливає інше.

Термін "і/або" означає (а) або (b) або як (а), так і (b).

У даному винаході передбачені інші варіанти здійснення, "що містять" варіанти здійснення або елементи, представлені в даному документі, "що складаються із" них і "що по суті складаються із" них, незалежно від того, вказано це явно чи ні.

У випадку викладу в даному документі числових діапазонів кожне проміжне число в них передбачається в явній формі з тим самим ступенем точності. Наприклад, у випадку діапазону 6-9 на додаток до 6 і 9 передбачаються числа 7 і 8, а у випадку діапазону 6,0-7,0 у явній формі передбачаються числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, в, 9 і 7,0.

Наступні терміни, використовувані у всьому даному описі й формулі винаходу, мають наступні значення.

Терміни "кодуюча послідовність" або "кодуючий полінуклеотид, що кодує" означають нуклеотиди (молекули РНК або ДНК), які складають полінуклеотид, який кодує поліпептид. Кодуюча послідовність може додатково містити сигнали ініціації й термінації, функціонально пов'язані з регуляторними елементами, у тому числі с промотором і сигналом поліаденілювання, здатними керувати експресією в клітинах індивідуума або ссавця, якому вводять полінуклеотид. Кодуюча послідовність може бути кодон-оптимізованою.

Терміни "комплементарна послідовність" або "комплементарний" можуть означати утворення уотсон-криковських (наприклад, А-Т/У і С-Г) або хугстиновських пар основ між

нуклеотидами або аналогами нуклеотидів. "Комплементарність" стосується властивості, спільної для двох полінуклеотидів, що полягає в тому, що за їх антипаралельного вирівнювання один щодо одного нуклеотиди! основи в кожному положенні комплементарні один до одного.

Термін "конструкція" стосується двохниткового рекомбінантного полінуклеотидного фрагменту, що містить один або більше полінуклеотидів. Конструкція містить "матричну нитку", основи якої спарені з комплементарною "сенсовою або кодующею ниткою". Вказана конструкція може бути вставлена у вектор у двох можливих орієнтаціях: або в тій самій (або сенсовій) орієнтації, або в зворотній (або антисенсовій) орієнтації щодо орієнтації промотора, розташованого у векторі, такому як вектор експресії.

Термін "контроль" стосовно до контрольної рослини або контрольної рослинної клітини означає рослину або рослинну клітину, у яких експресія, функція або активність одного або більше генів або поліпептидів не була модифікована (наприклад, збільшена або зменшена), і тому вони можуть забезпечувати можливість порівняння з рослиною, у якій експресія, функція або активність тих же одного або більше генів або поліпептидів була модифікована. Використовуваний у даному документі термін "контрольна рослина" означає рослину, яка є по суті еквівалентною тестованій рослині або модифікованій рослині за всіма параметрами, за винятком тестованих параметрів. Наприклад, якщо мова йде про рослину, у яка була введена мутація, контрольна рослина являє собою еквівалентну рослину, у яку дана мутація не була введена. Контрольна рослина може являти собою несегрегуючу контрольну рослину.

Термін "експресія" стосується вироблення функціонального продукту. Наприклад, експресія полінуклеотидного фрагмента може стосуватися транскрипції полінуклеотидного фрагмента (наприклад, транскрипції, що приводить до одержання мРНК або функціональної РНК) і/або трансляції мРНК із одержанням поліпептиду-попередника або зрілого поліпептиду.

Терміни "функціональний" і "повністю функціональний" описують поліпептид, який має біологічну функцію або активність. Термін "функціональний ген" стосується гена, що транскрибується з утворенням мРНК, яка транслюється з утворенням функціонального або активного поліпептиду.

Термін "генна конструкція" стосується молекул ДНК або РНК, які містять полінуклеотид, що кодує поліпептид. Кодуюча послідовність може містити сигнали ініціації й термінації, функціонально пов'язані з регуляторними елементами, у тому числі з промотором і сигналом поліаденілювання, здатними керувати експресією.

Терміни "гомологія" або "подібність" стосуються ступеня подібності послідовностей двох поліпептидів або двох молекул полінуклеотидів, порівнюваних шляхом вирівнювання послідовностей. Ступінь гомології між двома окремими порівнюваними полінуклеотидами залежить від числа ідентичних або співпадаючих нуклеотидів у положеннях, що зіставляються.

Терміни "ідентичний" або "ідентичність" стосовно до двох або більше полінуклеотидів або поліпептидів означають, що послідовності мають певну процентну частку залишків, які є однаковими в межах певної ділянки. Процентну частку можна розрахувати шляхом оптимального вирівнювання двох послідовностей, порівняння двох послідовностей у межах певної ділянки, визначення числа положень, у яких в обох послідовностях перебувають ідентичні залишки, з одержанням числа співпадаючих положень, розподілу числа співпадаючих положень на загальне число положень у певній ділянці й множення результату на 100 з одержанням процентного значення ідентичності послідовностей, у тих випадках, коли ці дві послідовності мають різну довжину або під час вирівнювання створюється один або більше несиметрично розташованих кінців, і певна ділянка порівняння включає тільки одну послідовність, то під час розрахунків залишки одиночної послідовності включаються в знаменник, а не в чисельник. Під час порівняння ДНК і РНК тимін (Т) і урацил (У) можна вважати еквівалентними. Ідентичність можна визначати вручну або за допомогою комп'ютерного алгоритму для роботи з послідовностями, такого як Clustalw, Clustalx, BLAST, FASTA або алгоритм Сміта-Уотермана. Популярна програма множинного вирівнювання Clustalw (Nucleic Acids Research (1994) 22, 4673-4680; Nucleic Acids Research (1997), 24, 4876-4882) являє собою придатний спосіб одержання множинних вирівнювань поліпептидів або полінуклеотидів. Підходящі параметри для Clustalw можуть бути наступними. Для вирівнювань полінуклеотидів: штраф за відкриття гена = 15,0, штраф за продовження гена = 6,66 і матриця = ідентичність. Для вирівнювань поліпептидів: штраф за відкриття гена = 10,0, штраф за продовження гена = 0,2 і матриця = Gonnet. Для вирівнювань ДНК і білка: ENDGAP = -1 і GAPDIST = 4. Фахівцям у даній галузі буде зрозуміло, що може бути необхідним змінювати ці й інші параметри для оптимального вирівнювання послідовностей. Потім переважно проводять розрахунки процентних значень ідентичності на основі такого вирівнювання у вигляді (N/T), де N являє собою число положень, у яких у послідовностях присутній загальний ідентичний залишок, і T

являє собою загальне число порівнюваних положень із урахуванням гепів, але без урахування виступів.

Терміни "виділений" або "очищений" стосуються матеріалу, який по сутності або по суті не містить компоненти, які зазвичай є супутніми до нього, як виявляється в його нативному стані. Як правило, чистоту й однорідність визначають за допомогою методик аналітичної хімії, таких як електрофорез у поліакриламідному гелі або високоефективна рідинна хроматографія. Поліпептид, який є переважною молекулою, що присутня у препараті, є по суті очищеним. Зокрема, виділений полінуклеотид відділений від відкритих рамок зчитування, які фланкують необхідний ген і кодують поліпептиди, відмінні від необхідного поліпептиду. Термін "очищений", використовуваний у даному документі, позначає, що полінуклеотид або поліпептид дає по суті одну смугу в електрофоретичному гелі. Зокрема, це означає, що полінуклеотид або поліпептид є на щонайменше 85 % чистим, більш переважно на щонайменше 95 % чистим і найбільш переважно на щонайменше 99 % чистим. Виділені полінуклеотиди можуть бути очищені із клітин *и-хазіяна*, у якій вони зустрічаються в природі. Для одержання виділених полінуклеотидів можна застосовувати загальноприйняті способи очищення полінуклеотидів, відомі фахівцям у даній галузі. Даний термін також охоплює рекомбінантні полінуклеотиди й хімічно синтезовані полінуклеотиди.

Терміни "модулювати" або "модулювання" стосуються забезпечення або полегшення якісної або кількісної зміни, видозміни або модифікації процесу, шляху, функції або активності, що представляють інтерес. Без обмеження такі зміна, видозміна або модифікація можуть являти собою збільшення або зниження рівня відповідного процесу, шляху, функції або активності, що становлять інтерес. Наприклад, можна модулювати експресію гена, або експресію поліпептиду, або функцію або активність поліпептиду. Як правило, відносну зміну, видозміну або модифікацію визначають за допомогою порівняння з контролем.

Термін "такий, що не зустрічається в природі" описує об'єкт, такий як полінуклеотид, генетичну мутацію, поліпептид, рослину, рослинну клітину й рослинний матеріал, який не утворений природнім шляхом або не існує в природі. Такі об'єкти, що не зустрічаються в природі, або штучні об'єкти можна створити, синтезувати, виробити, модифікувати, піддати втручанню або маніпуляції способами, які описані в даному документі або які відомі з рівня техніки. Такі об'єкти, що не зустрічаються в природі, або штучні об'єкти можуть бути створені, синтезовані, вироблені, модифіковані, піддані втручанню або маніпуляції людиною. Як приклад, об'єкт, що не зустрічається в природі, може являти собою об'єкт, який був підданий мутації за допомогою способів, які, як відомо, індують мутагенез, що включають сайт-спрямований мутагенез, олігонуклеотид-спрямований мутагенез, мутагенез, індукований хімічними сполуками, мутагенез, індукований опроміненням, мутагенез із використанням модифікованих основ, мутагенез із використанням ДНК- дуплексу з генами, мутагенез, індукований двохнитковими розривами, мутагенез із використанням штамів-хазяїв з дефектом репарації, мутагенез за допомогою повного синтезу гена, перетасування ДНК й інші еквівалентні способи. Наприклад, можна застосовувати хімічний мутагенез, який передбачає застосування хімічних речовин, що додаються екзогенно, таких як мутагенні, тератогенні або канцерогенні органічні сполуки, для індукування мутацій. Мутантні форми із переважними властивостями можуть потім бути вибрані й ідентифіковані.

Терміни "олігонуклеотид" або "полінуклеотид" означають щонайменше два нуклеотиди, ковалентно зв'язані один з одним. Опис окремої нитки також визначає послідовність комплементарної нитки. Таким чином, полінуклеотид також охоплює нитку, комплементарну описаній окремій нитці. Багато варіантів полінуклеотиду можна застосовувати для тієї ж мети, що й вказаний полінуклеотид. Таким чином, полінуклеотид також охоплює по суті ідентичні полінуклеотиди й комплементарні до них послідовності. Окрема нитка являє собою зонд, який може гібридизуватися із вказаною послідовністю в жорстких умовах гібридизації. Таким чином, полінуклеотид також охоплює зонд, який гібридизується в жорстких умовах гібридизації. Полінуклеотиди можуть бути одонитковими або двохнитковими або можуть містити частини як двохниткової, так і одониткової послідовності. Полінуклеотид може являти собою ДНК - як геномну, так і кДНК, РНК або гібридну молекулу, де полінуклеотид може містити комбінації дезоксирибо- і рибонуклеотидів, а також комбінації основ, у тому числі урацилу, аденіну, тиміну, цитозину, гуаніну, інозину, ксантину, гіпоксантину, ізоцитозину й ізогуаніну. Полінуклеотиди можна одержувати за допомогою способів хімічного синтезу або за допомогою рекомбінантних способів.

Специфічність одониткової ДНК щодо гібридизації з комплементарними фрагментами визначається "жорсткістю" умов реакції. (Sambrook et al., *Molecular Cloning and Laboratory Manual*, Second Ed., Cold Spring Harbor (1989)). Жорсткість гібридизації збільшується в міру

зменшення схильності до утворення ДНК-дуплексів. У реакціях гібридизації полінуклеотидів жорсткість можна вибирати таким чином, щоб сприяти специфічним реакціям гібридизації (висока жорсткість), які можна застосовувати для ідентифікації, наприклад, повнорозмірних клонів з бібліотеки. Менш специфічні реакції гібридизації (низька жорсткість) можна застосовувати для ідентифікації споріднених, але не точно відповідних (гомологічних, але не ідентичних) молекул або сегментів ДНК. На стабілізацію ДНК-дуплексів впливають (1) число комплементарних пар основ; (2) тип пар основ; (3) концентрація солей (іонна сила) у реакційній суміші; (4) температура реакції й (5) присутність певних органічних розчинників, таких як формамід, які зменшують стабільність ДНК-дуплекса. Зазвичай чим довше зонд, тим вище температура, необхідна для належного відпау. Загальноприйнятий підхід полягає в зміні температури; більш високі відносні температури приводять до більш жорстких умов реакції. Для гібридизації в "жорстких умовах" описані протоколи гібридизації, у яких полінуклеотиди, на щонайменше 60 % гомологічні один одному, залишаються гібридизованими. Зазвичай жорсткі умови вибирають таким чином, щоб температура була приблизно на 5 °C нижче, ніж температура точки плавлення (T_m) для конкретної послідовності за певних значень іонної сили й pH. T_m являє собою температуру (за певних значень іонної сили, pH і концентрації полінуклеотиду), за якої 50 % зондів, комплементарних вказаній послідовності, гібридизуються із вказаною послідовністю в рівноважному стані. Оскільки вказані послідовності зазвичай присутні в надлишку, то за T_m 50 % зондів зайняті в рівноважному стані.

"Жорсткі умови гібридизації" являють собою умови, які дозволяють зонду, праймеру або олігонуклеотиду гібридизуватися тільки зі своєю специфічною послідовністю. Жорсткі умови залежать від послідовності й будуть відрізнятися. Жорсткі умови, як правило, включають: (1) низьку іонну силу й промивання за високої температури, наприклад 15 mM хлориду натрію, 1,5 mM цитрату натрію, 0,1 % додецилсульфату натрію за 50 °C; (2) присутність денатуруючого засобу під час гібридизації, наприклад 50 % (об./об.) формаміду, 0,1 % бичачого сироваткового альбуміну, 0,1 % фіколу, 0,1 % полів і НІЛ пірол ід он у, 50 mM натрій-фосфатного буфера (750 mM хлориду натрію, 75 mM цитрату натрію; pH 6,5) за 42 °C або (3) 50 % формамід. Як правило, промивання також передбачають 5 x SSC (0,75 M NaCl, 75 mM цитрату натрію), 50 mM фосфат натрію (pH 6,8), 0,1 % пірофосфат натрію, 5 x розчин Денхардта, ДНК із молок лососевих риб, піддану ультразвуковій обробці (50 мкг/мл), 0,1 % SDS і 10 % сульфат декстрана за 42 °C із промиванням за 42 °C в 0,2 x SSC (хлорид натрію/цитрат натрію) і 50 % формамід за 55 °C і наступним промиванням в умовах високої жорсткості, що передбачає 0,1 x SSC, що містить EDTA, за 55 °C. Умови переважно є такими, що послідовності, гомологічні один одній на щонайменше приблизно 65 %, 70 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 %, зазвичай залишаються гібридизованими один з одною.

В "умовах помірної жорсткості" використовують розчини для промивання й умови гібридизації, які є менш жорсткими, так що полінуклеотид гібридизується з усім полінуклеотидом, його фрагментами, похідними або аналогами. Один приклад передбачає гібридизацію в 6 x SSC, 5 x розчині Денхардта, 0,5 % SDS і 100 мкг/мл денатурованої ДНК із молок лососевих риб за 55 °C з наступними одним або більше промиваннями в 1 x SSC, 0,1 % SDS за 37 °C. Температуру, іонну силу і т.д. можна регулювати для забезпечення відповідності експериментальним факторам, таким як довжина зонду. Були описані інші умови помірної жорсткості (див. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumes 1-3, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N.J. (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual*, Stockton Press, New York, N.Y. (1990); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, 2nd edition, John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1988)).

В "умовах низької жорсткості" використовують розчини для промивання й умови гібридизації, які є менш жорсткими, ніж у випадку помірної жорсткості, так що полінуклеотид гібридизується з усім полінуклеотидом, його фрагментами, похідними або аналогами. Необмежуючий приклад умов гібридизації низької жорсткості передбачає гібридизацію в 35 % формаміді, 5 x SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, 0,02 % PVP, 0,02 % фіколі, 0,2 % BSA, 100 мкг/мл денатурованої ДНК із молок лососевих риб, 10 % (вага/про.) сульфаті декстрана за 40 °C з наступними однією або більше промиваннями в 2 X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM EDTA і 0,1 % SDS за 50 °C.

Термін "рослина" стосується будь-якої рослини на будь-якій стадії її життєвого циклу або розвитку та її потомства. В одному варіанті здійснення рослина являє собою рослину тютюну, яка стосується рослини, що належить до роду *Nicotiana*. Даний термін включає посилення на цілі рослини, органи рослин, рослинні тканини, паростки рослини, насіння рослин, рослинні клітини та їх потомство. Рослинні клітини включають без обмеження клітини з насіння, суспензійних культур, зародків, ділянок меристеми, калусної тканини, листків, корінь, пагонів,

гаметофітів, спорофітів, пилку й мікроспор. Придатні види, культивари, гібриди й сорта рослин тютюну описані в даному документі.

Терміни "полінуклеотид", "полінуклеотидна послідовність" або "полінуклеотидний фрагмент" використовуються в даному документі взаємозамінно й стосуються полімеру із РНК або ДНК, який є одно- або двохнитковим і необов'язково містить синтетичні, неприродні або змінні нуклеотидні основи. Нуклеотиди (що зазвичай перебувають у формі, 5'- монофосфату) називають за допомогою їх однобуквених позначень наступним чином: "А" для аденілату або дезоксиаденілату (відповідно для РНК або ДНК), "С" для цитидилату або дезоксицитидилату, "G" для гуанілату або дезоксигуанілату, "U" для уридилату, "T" для дезокситимідилату, "R" для пуринів (А або G), "Y" для піримідинів (С або Т), "K" для G або Т, "H" для А, або С, або Т, "I" для інозину й "N" для будь-якого нуклеотиду. Полінуклеотид може являти собою без обмеження геномну ДНК, комплементарну ДНК (кДНК), мРНК або антисенсову РНК або їх фрагмент(фрагменти). Крім того, полінуклеотид може бути одонитковим або двохнитковим, сумішшю одониткових і двохниткових ділянок, гібридною молекулою, що містить ДНК і РНК, або гібридною молекулою із сумішшю одониткових і двохниткових ділянок або їх фрагментом(фрагментами). На додаток, полінуклеотид може складатися із трьохниткових ділянок, що містять ДНК, РНК або їх обидві або їх фрагмент(фрагменти). Полінуклеотид може містити одну або більше модифікованих основ, таких як фосфотіоати, і може являти собою пептидну нуклеїнову кислоту (PNA). Як правило, полінуклеотиди можуть бути зібрані з виділених або клонованих фрагментів кДНК, геномної ДНК, олігонуклеотидів або окремих нуклеотидів або комбінації перерахованого вище. Хоча полінуклеотиди, описані в даному документі, показані у вигляді послідовностей ДНК, полінуклеотиди включають у себе їх відповідні послідовності РНК і комплементарні їм (наприклад, повністю комплементарні) послідовності ДНК або РНК, у тому числі послідовності, зворотно комплементарні їм. Полінуклеотиди за даним винаходом представлені в доданому переліку послідовностей.

Терміни "поліпептид" або "поліпептидна послідовність" стосуються полімеру з амінокислот, у якому один або більше амінокислотних залишків являють собою штучний хімічний аналог відповідної амінокислоти, що зустрічається в природі, а також полімерів з амінокислот, що зустрічаються в природі. Дані терміни також включають модифікації, у тому числі без обмеження глікозилювання, приєднання ліпідів, сульфатування, гамма-карбоксилювання залишків глютамінової кислоти, гідроксилювання й ADP-рибозилювання. Поліпептиди за даним винаходом представлені в доданому переліку послідовностей.

Термін "рекомбінантний", використовуваний у даному документі стосується штучної комбінації із двох в інших випадках розділених сегментів послідовності, одержаної, наприклад, за допомогою хімічного синтезу або за допомогою маніпуляції з виділеними сегментами полінуклеотидів за допомогою методик генної інженерії. Даний термін також включає посилення на клітину або вектор, які були модифіковані шляхом введення гетерологічного полінуклеотиду, або клітину, одержану з модифікованої в такий спосіб клітини, але не охоплює зміни клітини або вектора в результаті подій, що зустрічаються в природі (наприклад, у результаті спонтанної мутації, природної трансформації, або трансдукції, або транспозиції), таких як ті, які відбуваються без навмисного втручання людини.

Термін "тютюн" використовується в збірному сенсі для позначення сільськогосподарських культур тютюну (наприклад, безлічі рослин тютюну, вирощуваних у поле, і тютюну, вирощуваного не методом гідропоніки), рослин тютюну та їх частин, у тому числі без обмеження коріння, стебел, листків, квіток і насіння, підготовлених і/або одержаних так, як описано в даному документі. Зрозуміло, що термін "тютюн" стосується рослин *Nicotiana tabacum* і продуктів, одержуваних з них.

Термін "тютюнові продукти" стосується споживчих тютюнових продуктів, у тому числі без обмеження до курільних матеріалів (наприклад, сигарет, сигар і трубкового тютюну), нюхального тютюну, жувального тютюну, жувальної гумки й льодяників, а також компонентів, матеріалів й інфедієнтів для виробництва споживчих тютюнових продуктів. Дані тютюнові продукти переважно роблять із листків і стебел тютюну, зібраних з тютюну й нарізаних, зав'язаних, висушених і/або ферментованих відповідно до загальноприйнятих методик одержання тютюну.

Термін "варіант" стосовно пептиду або поліпептиду означає пептид або поліпептид, який відрізняється за послідовністю завдяки вставці, делеції або консервативній заміні амінокислот, але зберігає щонайменше одну біологічну функцію або форму активності. Варіант також може означати поліпептид, який зберігає щонайменше одну біологічну функцію або форму активності. Консервативну заміну амінокислоти, тобто заміщення амінокислоти іншою амінокислотою з

подібними властивостями (наприклад, ступенем гідрофільності й розподіленням заряджених ділянок), розуміють у даній галузі техніки, як таку, що зазвичай передбачає незначну зміну.

Термін "сорт" стосується популяції рослин, які мають постійні характеристики, що відокремлюють їх від інших рослин того ж виду. Хоча сорт володіє однією або більше відмінними ознаками, він додатково характеризується дуже невеликою загальною мінливістю між особинами в межах цього сорту. Сорт часто продається на комерційній основі.

Термін "вектор" стосується полінуклеотидного засобу доставки, який містить комбінацію компонентів полінуклеотиду для забезпечення транспорту полінуклеотидів, полінуклеотидних конструкцій і кон'югатів полінуклеотидів і т.п. Вектор може являти собою вірусний вектор, бактеріофаг, штучну бактеріальну хромосому або штучну хромосому дріжджів. Вектор може являти собою ДНК- або РНК-вектор. Придатні вектори включають епісоми, здатні до позахромосомної реплікації, такі як кільцеві плазмідні із двохниткової нуклеотидної послідовності; лінеаризовані плазмідні із двохниткової нуклеотидної послідовності й інші вектори будь-якого походження.

"Вектор експресії", як використовується в даному документі, являє собою полінуклеотидний засіб доставки, який містить комбінацію компонентів полінуклеотиду для забезпечення експресії полінуклеотиду(полінуклеотидів), полінуклеотидних конструкцій і кон'югатів полінуклеотидів і т.п. придатні вектори експресії включають епісоми, здатні до позахромосомної реплікації, такі як кільцеві плазмідні із двохниткової нуклеотидної послідовності; лінеаризовані плазмідні із двохниткової нуклеотидної послідовності й інші функціонально еквівалентні вектори експресії будь-якого походження. Вектор експресії містить щонайменше промотор, розташований вище полінуклеотиду, полінуклеотидних конструкцій або кон'югату полінуклеотиду, визначених нижче, і функціонально пов'язаний з ними.

Якщо в даному документі не визначене інше, то наукові й технічні терміни, використовувані у зв'язку з даним винаходом, будуть мати значення, які зазвичай зрозумілі фахівцям середньої кваліфікації в даній галузі техніки. Наприклад, будь-які системи номенклатури й методики, використовувані у зв'язку з культурами клітин або тканин, молекулярною біологією, імунологією, мікробіологією, генетикою, а також хімією й гібридизацією поліпептидів і полінуклеотидів, які описані в даному документі, добре відомі й широко застосовуються в даній галузі техніки. Значення й обсяг термінів повинні бути зрозумілі; однак у випадку будь-якої схованої двозначності визначення, наведені в даному документі, мають переважну силу в порівнянні з будь-яким словниковим або визначенням, що не стосується даного документа. Крім того, якщо інше не потрібно за контекстом, терміни в однині будуть включати множину, і терміни в множині будуть включати однину.

Термін "редагування геному" стосується такої зміни ендегенного гена, який кодує ендегенний поліпептид, за якої досягається експресія поліпептиду, що представляє собою усичений ендегенний поліпептид або ендегенний поліпептид, що має модифікацію амінокислоти, таку як заміна. Редагування геному може включати заміщення ділянки ендегенного гена, що підлягає націлюванню, або заміщення всього ендегенного гена копією гена, яка характеризується наявністю усікання або амінокислотної заміни, за допомогою механізму репарації, такого як репарація, що направляється гомологією. Редагування геному також може включати створення амінокислотної заміни в ендегенному гені за допомогою створення двохниткового розриву в ендегенному гені, який потім репарується за допомогою NHEJ. За допомогою NHEJ можна здійснювати додавання або делецію щонайменше однієї пари основ у ході репарації, завдяки чому можна створити амінокислотну заміну. Редагування геному також може включати делецію сегменту гена за допомогою одночасної дії двох нуклеаз на ту саму нитку ДНК для здійснення усікання між двома сайтами-мішенями для нуклеаз і репарації розриву ДНК за допомогою NHEJ.

Терміни "репарація, що направляється гомологією" або "HDR" стосуються механізму репарації двохниткових ушкоджень ДНК у клітинах у випадку присутності в ядрі гомологічного фрагмента ДНК, головним чином в G2- і S- фазі клітинного циклу У ході HDR використовується донорна ДНК або донорна матриця для спрямовування репарації, та її можна застосовувати для створення конкретних змін послідовностей у геномі, у тому числі для цілеспрямованого додавання цілих генів Якщо донорна матриця надається разом із сайт-специфічної нуклеазою, то клітинний апарат буде репарувати розрив за допомогою гомологічної рекомбінації, яка підсилюється за величиною на кілька порядків за наявності розщеплення ДНК Якщо гомологічний фрагмент ДНК відсутній, то замість цього може відбуватися NHEJ

Термін "шлях негомологічного з'єднання кінців (NHEJ)", використовуваний у даному документі, стосується шляху, за допомогою якого відбувається репарація двохниткових розривів у ДНК шляхом прямого літування юнців розривів без необхідності в гомологічній матриці

Незалежне від матриці повторне літування кінців ДНК за допомогою NHEJ є стохастичним, схильним до помилок процесом репарації, у ході якого в точку розриву ДНК уводяться випадкові мікроставки й мікрodelецп (вставки/делеці) Даний спосіб можна застосовувати для навмисного руйнування, делеції або зміни рамки зчитування в послідовностях генів-мішеней Як правило, у ході NHEJ використовуються короткі гомологічні послідовності ДНК, що називаються мікрогомолгами, для спрямовування репарації. Ці мікрогомолги часто присутні в одониткових виступах на кінцях двоохниткових розривів. Якщо виступи повністю сумісні, то в ході NHEJ зазвичай відбувається точна репарація розриву, хоча може мати місце також неточна репарація, що призводить до втрати нуклеотидів, однак набагато більш поширені випадки, коли виступи несумісні.

Термін "сайт-специфічна нуклеаза" стосується ферменту, здатного до специфічного розпізнавання й розщеплення послідовностей ДНК Сайт-специфічна нуклеаза може бути сконструйованою Приклади сконструйованих сайт-специфічних нуклеаз включають нуклеази з "цинковими пальцями" (ZFN), TAL-ефекторні нуклеази (TALEN), системи на основі CRISPR/Cas9 і мегануклеази.

Термін "ефектор, подібний активаторам транскрипції" або "TALE" стосується поліпептидної структури, яка розпізнає певну послідовність ДНК і зв'язується з нею. Термін "ДНК-зв'язувальний домен TALE" стосується ДНК-зв'язувального домену, який містить масив тандемних повторів з 33-35 амінокислот, також відомих як RVD-модулі, кожний з яких специфічно розпізнає одну пару основ ДНК. RVD-модулі можуть розташовуватися в будь-якому порядку, збираючись у масив, який розпізнає певну послідовність. Специфічність зв'язування ДНК- зв'язувального домену TALE визначається масивом RVD, за яким розташований один усічений повтор з 20 амінокислот. ДНК-зв'язувальний домен TALE може мати від 12 до 27 RVD-модулів, кожний з яких містить RVD і розпізнає одну пару основ ДНК. Були ідентифіковані специфічні RVD, які розпізнають кожний із чотирьох можливих нуклеотидів ДНК (А, Т, С і G). Оскільки ДНК-зв'язувальні домени TALE є модульними, то повтори, які розпізнають чотири різні нуклеотиди ДНК, можна зв'язати один з одним для розпізнавання будь-якої конкретної послідовності ДНК. Ці націлені ДНК- зв'язувальні домени можна потім об'єднати з каталітичними доменами для створення функціональних ферментів, у тому числі штучних факторів транскрипції, метилтрансфераз, інтеграз, нуклеаз і рекомбіназ.

Терміни "ефекторні нуклеази, подібні до активаторів транскрипції" або "TALEN", використовувані в даному документі взаємозамінно, стосуються сконструйованих злитих поліпептидів на основі каталітичного домену нуклеази, такої як ендонуклеаза FokI, і розробленого ДНК-зв'язувального домену TALE, який може бути націлений на спеціально синтезовану ДНК- послідовність.

Термін "мономер TALEN" стосується сконструйованого злитого поліпептиду з каталітичним доменом нуклеази й розробленим ДНК-зв'язувальним доменом TALE. Два мономери TALEN можуть бути розроблені таким чином, щоб вони націлювалися на ділянку, що є мішенню для TALEN, і розщеплювали його.

Термін "цинковий палець" стосується поліпептидної структури, яка розпізнає послідовності ДНК і зв'язується з ними. Домен типу "цинковий палець" є найпоширенішим ДНК-зв'язувальним мотивом у протеомі людини. Один домен типу "цинковий палець" містить приблизно 30 амінокислот і зазвичай функціонує шляхом зв'язування з 3 послідовними парами основ ДНК за допомогою взаємодій одного бічного ланцюга амінокислоти з кожною парою основ.

Термін "нуклеаза з "цинковими пальцями"" або "ZFN" стосується химерної молекули поліпептиду, що містить щонайменше один ДНК-зв'язувальний домен "цинковий палець", ефективно зв'язаний із щонайменше однією нуклеазою або частиною нуклеази, здатною в повністю зібраному виді розщеплювати ДНК.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

В одному аспекті передбачена виділена полінуклеотидна послідовність, що кодує поліпептид нітратредуктазу, що містить безперервну поліпептидну послідовність під SEQ ID NO: 5, де метіонін замінений амінокислотою, яка знижує активність нітратредуктази в порівнянні з контрольною рослинною клітиною.

Поліпептид нітратредуктази переважно містить безперервну поліпептидну послідовність під SEQ ID NO: 7, де метіонін замінений амінокислотою, яка зменшує активність нітратредуктази в порівнянні з контрольною рослинною клітиною.

Виділена полінуклеотидна послідовність переважно кодує поліпептид нітратредуктазу, у якому метіонін замінений іншою амінокислотою, переважно аліфатичною неполярною амінокислотою, більш переважно ізoleyцином.

Аліфатична неполярна амінокислота переважно вибрана із групи амінокислот, що складається із гліцину, аланіну, проліну, ізолейцину, лейцину або валіну.

Аліфатична неполярна амінокислота переважно являє собою ізолейцин. Згідно з даним варіантом здійснення нітратредуктаза містить безперервну поліпептидну послідовність із заміною під SEQ ID NO: 6 або SEQ ID NO: 8.

Виділена полінуклеотидна послідовність переважно кодує поліпептид нітратредуктазу, що містить послідовність із амінокислотною заміною в положенні, відповідному до положення 527 у послідовності, що характеризується щонайменше 80 % ідентичністю послідовності з SEQ ID NO: 1, що складається з неї або по суті складається з неї.

Виділена полінуклеотидна послідовність переважно кодує поліпептид нітратредуктазу, що містить послідовність, представлену під SEQ ID NO: 3, що складається з неї або по суті складається з неї.

Виділена полінуклеотидна послідовність переважно містить послідовність, що характеризується щонайменше 80 % ідентичністю послідовності з SEQ ID NO: 2, що складається з неї або по суті складається з неї.

Полінуклеотидна послідовність переважно містить полінуклеотидну послідовність, представлену під SEQ ID NO: 4, що складається з неї або по суті складається з неї.

Ілюстративна мутація за типом заміни за даним винаходом представлена в таблиці 1.

У певних варіантах здійснення полінуклеотидна послідовність містить послідовність, що характеризується щонайменше 80 % ідентичністю послідовності з будь-якою з послідовностей, описаних у даному документі, включаючи кожний з полінуклеотидів, показаних у переліку послідовностей, складається з неї або по суті складається з неї. Виділений полінуклеотид переважно містить послідовність, що характеризується щонайменше 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю послідовності з ними, складається з неї або по суті складається з неї.

Полінуклеотид(полінуклеотиди), описаний(описані) у даному документі, переважно кодує(коднують) активний поліпептид нітратредуктазу, який 24 характеризується щонайменше приблизно 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % або 90 % рівнем функції або активності в порівнянні з поліпептидом(поліпептидами), показаним(показаними) у переліку послідовностей.

В іншому варіанті здійснення передбачені полінуклеотидні фрагменти під SEQ ID NO: 4, що коднують поліпептидну послідовність, що містить мутацію M527I, з істотним ступенем гомології (тобто подібністю послідовності) або істотним ступенем ідентичності з ними, які характеризуються щонайменше приблизно 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % або 100 % ідентичністю послідовності з відповідними фрагментами під SEQ ID NO: 4.

Також розкриті фрагменти полінуклеотидів, до складу яких включена(включені) мутація(мутації), описана(описані) у даному документі. Полінуклеотидні фрагменти, як правило, містять щонайменше 10, щонайменше 20, щонайменше 30, щонайменше 40, щонайменше 50, щонайменше 100 або щонайменше 200 суміжних нуклеотидів.

Полінуклеотид, описаний у даному документі, може містити в собі полімер з нуклеотидів, який може являти собою немодифіковану або модифіковану дезоксирибонуклеїнову кислоту (ДНК) або рибонуклеїнову кислоту (РНК). Відповідно, полінуклеотид може являти собою без обмеження геномну ДНК, комплементарну ДНК (кДНК), мРНК або антисенсову РНК або їх фрагмент(фрагменти) або усічену(усічені) форму(форми). Окрім того, полінуклеотид може являти собою одониткову або двохниткову ДНК, ДНК, яка є сумішшю одониткових і двохниткових ділянок, гібридну молекулу, що містить ДНК і РНК, або гібридну молекулу із сумішшю одониткових і двохниткових ділянок або їх фрагмент(фрагменти). На додаток, полінуклеотид може складатися із трьохниткових ділянок, що містять ДНК, РНК або їх обидві або їх фрагмент(фрагменти). Як правило, полінуклеотиди можуть бути зібрані з виділених або клонованих фрагментів кДНК, геномної ДНК, олігонуклеотидів або окремих нуклеотидів або комбінації перерахованого вище. Хоча полінуклеотиди, описані в даному документі, показані у вигляді послідовностей ДНК, вони містять у собі їх відповідні послідовності РНК 1 комплементарні їм (наприклад, повністю комплементарні) послідовності ДНК або РНК, у тому числі послідовності, зворотно комплементарні їм.

Полінуклеотид, описаний у даному документі, зазвичай містить фосфодієфірні зв'язки. Інші аналоги полінуклеотидів включають полінуклеотиди з позитивно зарядженими остовами, неіоногенними остовами й безрибозними остовами. Модифікації рибозофосфатного кістяка можна здійснювати з цілого ряду причин, наприклад, для підвищення стабільності й періоду напівжиття таких молекул у фізіологічних середовищах або як зондів на біочипі. Можна

одержувати суміші полінуклеотидів, що зустрічаються в природі, та їх аналогів; у якості альтернативи, можна одержувати суміші різних аналогів полінуклеотидів і суміші полінуклеотидів, що зустрічаються в природі, та їх аналогів.

Аналоги полінуклеотидів можуть включати в себе аналоги з позитивно зарядженими остовами, неіоногенними остовами й безрибозними остовами. Полінуклеотиди, що містять один або більше карбоциклічних цукрів, також включені.

Інші аналоги включають в себе пептидні полінуклеотиди, які є пептидними аналогами полінуклеотидів. Ці кістяки є практично неіоногенними в нейтральніших умовах на відміну від високочарядженого фосфодієфірного остову полінуклеотидів, що зустрічаються в природі. Це може надавати переваги. По-перше, пептидний остов полінуклеотиду може демонструвати поліпшені кінетичні характеристики гібридизації. Пептидні полінуклеотиди характеризуються більш значними змінами температури плавлення у випадку наявності неспівпадаючих пар основ у порівнянні з абсолютно співпадаючими парами основ. ДНК і РНК, як правило, демонструють зниження температури плавлення на 2-4 °C за наявності внутрішньої розбіжності. У випадку неіоногенного пептидного остова полінуклеотиду зниження є більш близьким до 7-9 °C. Подібним чином, через них неіоногенної природи, гібридизація основ, приєднаних до цих кістяків, є відносно нечутливою до концентрації солей. Додатково, пептидні полінуклеотиди можуть не руйнуватися або руйнуватися меншою мірою клітинними ферментами, і, таким чином, можуть бути більш стабільними.

У числі застосувань розкритих полінуклеотидів та їх фрагментів перебуває застосування фрагментів як зондів в аналізах гібридизації або як праймерів для застосування в аналізах ампліфікації. Такі фрагменти зазвичай містять щонайменше приблизно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 або більше суміжних нуклеотидів із ДНК-послідовності. В інших варіантах здійснення фрагмент ДНК містить щонайменше приблизно 10, 15, 20, 30, 40, 50 або 60 або більше суміжних нуклеотидів із ДНК-послідовності. Таким чином, в одному аспекті також передбачений спосіб виявлення полінуклеотиду, що включає застосування зондів або праймерів, або того й іншого. Ілюстративні праймери описані в даному документі.

Основні параметри, що впливають на вибір умов гібридизації, і керівництво для розробки придатних умов описані в Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Використовуючи дані про генетичний код у комбінації з поліпептидними послідовностями, описаними в даному документі, можна одержати набори вироджених олігонуклеотидів. Такі олігонуклеотиди застосовні як праймери, наприклад, у полімеразних ланцюгових реакціях (ПЦР), за допомогою яких виділяють і ампліфікують фрагменти ДНК. У певних варіантах здійснення вироджені праймери можна застосовувати як зонди для генетичних бібліотек. Такі бібліотеки включають бібліотеки кДНК, геномні бібліотеки й навіть електронні бібліотеки міток експресованих послідовностей або ДНК. Гомологічні послідовності, ідентифіковані цим способом, будуть потім використані як зонди для ідентифікації гомологів послідовностей, вказаних у даному документі.

Також, потенційно застосовними є полінуклеотиди й олігонуклеотиди (наприклад, праймери або зонди), які гібридизуються в умовах зниженої жорсткості, як правило, в умовах помірної жорсткості й зазвичай в умовах високої жорсткості з полінуклеотидом(полінуклеотидами), описаним(описаними) у даному документі. Основні параметри, що впливають на вибір умов гібридизації, і керівництво для розробки придатних умов викладені в Sambrook J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) і можуть бути легко визначені фахівцями середньої кваліфікації в даній галузі техніки на основі, наприклад, довжини або складу основ полінуклеотиду.

У даному документі визначений один спосіб досягнення умов помірної й високої жорсткості. Слід розуміти, що температуру промивання й концентрацію солей для промивання за потреби можна регулювати для досягнення необхідного ступеня жорсткості за допомогою застосування основних принципів, які керують реакціями гібридизації й стабільністю дуплексів, як це відомо фахівцям у даній галузі техніки й додатково описано нижче (див., наприклад, Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Спринт Харбор, Нью-Йорк). За умов гібридизації полінуклеотиду з полінуклеотидом з невідомою послідовністю передбачається, що довжина гібрида буде такою як у полінуклеотиду, що гібридизується. За умов гібридизації полінуклеотидів з відомими послідовностями довжина гібрида може бути визначена шляхом вирівнювання послідовностей полінуклеотидів й ідентифікації ділянки або ділянок з оптимальною комшіментарністю послідовності. Температура гібридизації для гібридів, довжина яких приблизно становить менше 50 пар основ, повинна бути на 5-10 °C менше, ніж температура плавлення гібрида, де

температуру плавлення визначають у відповідності з наступними рівняннями. Для гібридів, довжина яких становить менше 18 пар основ, температура плавлення ($^{\circ}\text{C}$) = $2(\text{число основ A+T})+4(\text{число основ G+C})$. Для гібридів, довжина яких становить більше 18 пар основ, температура плавлення ($^{\circ}\text{C}$) = $81,5+16,6(\log_{10} [\text{Na}^{+}])+0,41(\% \text{ G+C})-(600/\text{N})$, де N являє собою число основ у гібриді, і $[\text{Na}^{+}]$ являє собою концентрацію іонів натрію в буфері для гібридизації ($[\text{Na}^{+}]$ для 1x стандартного цитрату натрію = 0,165 M). Як правило, кожний такий полінуклеотид, гібридується, має довжину, яка становить щонайменше 25 % (зазвичай щонайменше 50 %, 60 % або 70 % і найбільш часто щонайменше 80 %) від довжини полінуклеотиду, з яким він гібридується, і характеризується щонайменше 60 % ідентичністю послідовності (наприклад, щонайменше 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 %) з полінуклеотидом, з яким він гібридується.

Як буде зрозуміло фахівцям в даній галузі техніки, лінійна ДНК має дві можливі орієнтації: напрямку 5'-3' і напрямку 3'-5'. Наприклад, якщо перша послідовність розташована в напрямку 5'-3', і якщо друга послідовність розташована в напрямку 5'-3' в одній і тій же полінуклеотидній молекулі/нитці, то перша послідовність і друга послідовність орієнтовані в одному напрямку або мають однакову орієнтацію. Як правило, послідовність промотору і ген, що становить інтерес, що перебуває під контролем даного промотору, розташовані в однаковій орієнтації. Однак якщо стосовно першої послідовності, розташованої в напрямку 5'-3', друга послідовність розташована в напрямку 3'-5' в одній і тій самій молекулі/нитці полінуклеотиду, тоді перша послідовність і друга послідовність орієнтовані в антисенсовому напрямку або мають антисенсову орієнтацію. Дві послідовності, що мають антисенсові орієнтації один щодо одного, можуть бути альтернативно описані як такі, що мають однакову орієнтацію, якщо перша послідовність (напрямок 5'-3') і послідовність, зворотно комплементарна першій послідовності (першій послідовності, розташованій в 5'-3'), розташовані в межах однієї й тієї ж полінуклеотидної молекули/нитки. Послідовності, представлені в даному документі, показані в напрямку 5'-3'.

Також представлені вектори, що містять рекомбінантні полінуклеотидні конструкції, такі як описані в даному документі. Придатні основи для векторів включають, наприклад, ті, які зазвичай використовуються у даній галузі техніки, такі як плазмиди, віруси, штучні хромосоми, штучні бактеріальні хромосоми, штучні хромосоми дріжджів або штучні хромосоми бактеріофагів. Придатні вектори експресії включають без обмеження плазмиди й вірусні вектори, одержані з, наприклад, бактеріофага, бакуловірусів і ретровірусів. Численні вектори й системи експресії є комерційно доступними.

В одному аспекті передбачений виділений поліпептид, що містить поліпептид, що характеризується щонайменше 80 % ідентичності послідовності з кожним з поліпептидів, описаних у даному документі, включаючи з будь-яким із поліпептидів, наведених у переліку послідовностей, що складається з нього або по суті складається з нього. Виділений поліпептид переважно містить послідовність, що характеризується щонайменше 80 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % або 100 % ідентичністю послідовності з ними, складається з неї або по суті складається з неї.

В іншому аспекті розкриті поліпептидна послідовність, що кодується полінуклеотидною послідовністю, описаною в даному документі.

В іншому аспекті розкритий поліпептид нітратредуктаза, що містить безперервну поліпептидну послідовність під SEQ ID NO: 5, де метіонін замінений амінокислотою, яка знижує активність нітратредуктази в порівнянні з контрольною рослинною клітиною. Послідовність SEQ ID NO: 5 виступає як сайт розпізнавання для зв'язування кінази нітратредуктази, відповідальної за фосфорилування амінокислоти S523 NtNIA2.

Переважно нітратредуктаза містить безперервну поліпептидну послідовність під SEQ ID NO: 7, де метіонін замінений амінокислотою, яка знижує активність нітратредуктази в порівнянні з контрольною рослинною клітиною.

Метіонін переважно замінений іншою амінокислотою, такою як аліфатична неполярна амінокислота, яка може бути вибрана із групи амінокислот, що складається із гліцину, аланіну, проліну, ізолейцину, лейцину або валіну.

Переважно аліфатична неполярна амінокислота являє собою I. Згідно з даним варіантом здійснення нітратредуктаза містить безперервну поліпептидну послідовність під SEQ ID NO: 6 або SEQ ID NO: 8.

Поліпептид нітратредуктаза переважно містить послідовність з амінокислотною заміною в положенні, відповідному до положення 527 у послідовності, що характеризується щонайменше 80 % ідентичністю послідовності з SEQ ID NO: 1, складається з неї або по суті складається з неї.

Поліпептид нітратредуктаза переважно містить послідовність з амінокислотною заміною M5271 у послідовності, що характеризується щонайменше 80 % ідентичністю послідовності з SEQ ID NO: 1, складається з неї або по суті складається з неї.

Поліпептид нітратредуктаза переважно містить послідовність, представлену під SEQ ID NO: 3, складається з неї або по суті складається з неї.

Також розкриті фрагменти поліпептидів, в які вбудована(вбудовані) мутація(мутації), описана(описані) у даному документі. Як правило, фрагменти поліпептиду(поліпептидів) у деякій мірі або повністю зберігають функцію або активність повнорозмірної послідовності. Як правило, фрагменти поліпептиду містять щонайменше 10, щонайменше 20, щонайменше 30, щонайменше 40, щонайменше 50, щонайменше 100 або щонайменше 200 суміжних амінокислот. Поліпептиди, розкриті в даному документі, містять щонайменше одну мутацію, одержану за допомогою введення однієї або більше змін будь-якого типу, які можуть бути виділені природно, функція або активність поліпептиду нітратредуктази, у склад якого включена(включені) мутація (мутації), переважно модулюється (наприклад, знижується) за допомогою введення мутації. Мутація переважно являє собою заміну. Заміна стосується заміщення щонайменше однієї амінокислоти поліпептиду нітратредуктази іншою амінокислотою, що володіє подібними властивостями (такими як подібна гідрофобність, гідрофільність, антигенність, схильність до утворення або розриву альфа-спіральных структур або β-складчастих структур тощо).

Переважно мутація являє собою заміну метіоніну в безперервній поліпептидній послідовності SEQ ID NO: 5 або SEQ ID NO: 7, у якій метіонін замінений амінокислотою, при цьому рослина, що несе заміну, має знижену активність нітратредуктази в порівнянні з контрольною рослиною. В одному варіанті здійснення метіонін замінений аліфатичною неполярною амінокислотою, такою як гліцин, аланін, пролін, ізолейцин, лейцин або валін. В одному варіанті здійснення аліфатична неполярна амінокислота являє собою ізолейцин, і тоді безперервна поліпептидна послідовність переважно являє собою SEQ ID NO: 6 або SEQ ID NO: 8. В одному варіанті здійснення заміна являє собою M527I. Ілюстративна поліпептидна послідовність нітратредуктази, що несе мутацію M527I, являє собою SEQ ID NO: 3.

Розкриті рослина або рослинна клітина, що містять або несуть мутацію в одному або більше полінуклеотидах або поліпептидах, описаних у даному документі, де вказана мутація приводить до модуляції функції або активності нітратредуктази. Мутації, описані в даному документі, можуть включати мутації, внесені людиною, або синтетичні мутації. Мутації в полінуклеотидах і поліпептидах, описаних у даному документі, можуть являти собою мутації, які одержані або які можна одержати за допомогою способу, який включає стадію маніпуляції *in vitro* або *in vivo*. Мутації в полінуклеотидах і поліпептидах, описаних у даному документі, можуть являти собою мутації, які одержані або які можна одержати за допомогою способу, який включає втручання людини. Передбачений спосіб модулювання рівня поліпептиду в (висушеній) рослині або в (висушеному) рослинному матеріалі, при цьому вказаний спосіб включає введення в геном вказаної рослини однієї або більше мутацій, які модулюють експресію щонайменше одного гена, де вказана щонайменше одна мутація вибрана з мутацій в послідовностях згідно з даним винаходом, наприклад, M527I. Переважно ген кодує поліпептид нітратредуктазу *Nicotiana tabacum*, описаний у даному документі.

Також розкриті рослина або клітина, які є гетерозиготними або гомозиготними щодо однієї або більше мутацій згідно з даним винаходом, при цьому вказана мутація в результаті призводить до модуляції експресії гена або функції або активності поліпептиду, кодованого ним.

Функція або активність одного або більше поліпептидів за даним винаходом в рослині є підвищеними або зниженими, якщо функція або активність є більш низькими або більше високими, ніж функція або активність того(тих) самого(самих) поліпептиду(поліпептидів) у рослині, яка не була модифікована для пригнічення функції або активності цього поліпептиду, і яку культивували, збирали й висушували зі застосуванням тих же протоколів.

Також розкриті способи одержання мутантних полінуклеотидів і поліпептидів, описаних у даному документі. Рослину, що становить інтерес, таку як тютюн, в тому числі раслинну клітину або рослинний матеріал, можна генетично модифікувати за допомогою різних способів, які, як відомо, індукують мутагенез, у тому числі сайт-спрямований мутагенез, олігонуклеотид-спрямований мутагенез, індукований хімічними сполуками мутагенез, індукований іонізуючим випромінюванням мутагенез, мутагенез із застосуванням модифікованих основ, мутагенез із застосуванням ДНК-дуплекса з гепом, мутагенез, індукований двохнитковими розривами, мутагенез із застосуванням штамів-хазяїв з дефектом репарації, мутагенез за допомогою повного синтезу гена, перетасування ДНК й інші способи, описані нижче.

Способи, за допомогою яких вводять мутації в полінуклеотид випадковим чином, можуть включати хімічний мутагенез і радіаційний мутагенез. Хімічний мутагенез передбачає застосування хімічних речовин, що додаються екзогенно, таких як мутагенні, тератогенні або канцерогенні органічні сполуки, для індукування мутацій. Для створення мутацій можна застосовувати мутагени, які створюють головним чином точкові мутації й короткі делеції, вставки, міссенс- мутації, прості повторювані послідовності, трансверсії й/або транзиції, у тому числі хімічні мутагени або випромінювання. Мутагени включають етилметансульфонат, метилметансульфонат, N-етил-N-нітрозосечовину, триетилмеламін, N-метил-N-нітрозосечовину, проокарбазин, хлорамбуцил, циклофосфамід, діетилсульфат, акриламідний мономер, мельфалан, азотистий іприт, вінкристин, диметилнітрозамін, N-метил-N'-нітронітрозогуанідин, нітрозозуанідин, 2-амінопурин, 7,12-диметилбенз(а)антрацен, етиленоксид, гексаметилфосфорамід, бісульфан, дієпоксидалькани (дієпоксидоктан, дієпоксидбутан тощо), 2-метокси-6-хлор-9[3-(етил-2-хлоретил)амінопропіламіно] акридину дигідрохлорид і формальдегід.

Способи, за допомогою яких вводять одну або більше націлених мутацій в полінуклеотидну послідовність, включають без обмеження технологію редагування геному, зокрема, мутагенез, опосередкований нуклеазою з "цинковими пальцями", TILLING (націлені індуковані локальні ушкодження в геномі), гомологічну рекомбінацію, олігонуклеотид-спрямований мутагенез і мутагенез, опосередкований мегануклеазою.

Поліпептиди з "цинковими пальцями" можуть використовуватися для введення однієї або більше націлених мутацій в полінуклеотидну послідовність. У різних варіантах здійснення послідовності геномної ДНК, що містить частину або всю кодуючу послідовність полінуклеотиду, модифікують шляхом мутагенезу, опосередкованого нуклеазою з "цинковими пальцями". У послідовності геномної ДНК здійснюють пошук унікального сайту для зв'язування поліпептиду з "цинковими пальцями". У якості альтернативи, у послідовності геномної ДНК здійснюють пошук двох унікальних сайтів для зв'язування поліпептиду з "цинковими пальцями", при цьому обидва сайти знаходяться на протилежних нитках і близько один до одного, наприклад на відстані 1, 2, 3, 4, 5, 6 або більше пар основ один від одного. Відповідно, передбачені поліпептиди з "цинковими пальцями", які зв'язуються з полінуклеотидами. Поліпептид з "цинковими пальцями" можна сконструювати для розпізнавання вибраного сайту-мішені в гені. Поліпептид з "цинковими пальцями" може містити будь- яку комбінацію мотивів, одержаних із природних ДНК-зв'язувальних доменів з "цинковими пальцями" і неприродних ДНК-зв'язувальних доменів з "цинковими пальцями" за допомогою усікання, або подовження, або способу сайт-спрямованого мутагенезу в комбінації зі способом добору, таким як без обмеження добір за допомогою фагового дисплея, добір за допомогою бактеріальної двугібридної системи або добір за допомогою бактеріальної однігібридної системи. Термін "неприродний ДНК-зв'язувальний домен з "цинковими пальцями"" стосується ДНК-зв'язувального домену з "цинковими пальцями", який зв'язує послідовність із трьох пар основ у полінуклеотиді- мішені та який не зустрічається в клітині або організмі, що містять полінуклеотид, який підлягає модифікації. Способи розробки поліпептиду з "цинковими пальцями", який зв'язує специфічні полінуклеотиди, які є унікальними для цільового гена-мішені, відомі з рівня техніки. Способи доставки поліпептиду з "цинковими пальцями" і нуклеази з "цинковими пальцями" у рослину аналогічні способам, описаним нижче для доставки мегануклеази.

Мегануклеази, такі як I-CreI, можуть використовуватися для введення однієї або більше націлених мутацій в полінуклеотидну послідовність. Мегануклеази, що зустрічаються в природі, а також рекомбінантні мегануклеази можна застосовувати, зокрема, для специфічного здійснення двохниткового розриву в одному сайті або у відносно невеликій кількості сайтів у геномній ДНК рослини із забезпеченням руйнування одного або більше полінуклеотидів, описаних у даному документі. Мегануклеаза може являти собою сконструйовану мегануклеазу зі зміненими властивостями розпізнавання ДНК. Поліпептиди мегануклеаз можна доставляти в рослинні клітини за допомогою ряду різних механізмів, відомих з рівня техніки. Мегануклеази можна застосовувати для розщеплення за сайтами розпізнавання мегануклеазами в кодуючих ділянках полінуклеотиду. Таке розщеплення часто призводить до делеції ДНК у сайті розпізнавання мегануклеазою з наступною мутагенною репарацією ДНК шляхом негомологічного з'єднання кінців. Такі мутації в кодуючій послідовності гена є, як правило, достатніми для інактивації гена. Цей спосіб модифікації рослинної клітини передбачає, по-перше, доставку касети експресії мегануклеази в рослинну клітину за допомогою придатного способу трансформації. Для досягнення максимальної ефективності необхідно зв'язати касету експресії мегануклеази із селективним маркером і відібрати успішно трансформовані клітини в присутності селективного засобу. Цей підхід у результаті приведе до інтеграції касети експресії

мегануклеази в геном, що, однак, може бути небажаним, якщо для рослини, можливо, буде вимагатися дозвіл контролюючого органу. У таких випадках касету експресії мегануклеази (і зв'язаний селективний маркерний ген) можна усунути шляхом сегрегації у наступних поколіннях рослин за допомогою загальноприйнятих методик селекції. Після доставки касети експресії мегануклеази рослинні клітини вирощують початково в умовах, які є типовими для конкретної процедури трансформації, яку застосовували. Це може означати вирощування трансформованих клітин на середовищі за температури нижче 26 °C, найчастіше в темряві. Такі стандартні умови можна застосовувати протягом деякого періоду часу, переважно 1-4 днів, для забезпечення відновлення рослинної клітини після процесу трансформації. У будь-який момент після цього початкового періоду відновлення температуру росту можна підвищити, щоб стимулювати функцію сконструйованої мегануклеази, що полягає у розщепленні й здійсненні мутації за сайтом розпізнавання мегануклеазою.

Один спосіб редагування геному передбачає застосування ефекторних нуклеаз, подібних активатору транскрипції (TALEN), які індукують утворення двохниткових розривів, на які клітина може відповідати за допомогою механізмів репарації. NHEJ забезпечує відновлення зв'язку ДНК по обидва боки двохниткового розриву, де перекривання послідовностей для відпалу є дуже невеликим або зовсім відсутнім. Цей механізм репарації індукуює помилки в геномі за допомогою вставки, або делеції, або хромосомної перебудови. Будь-які такі помилки можуть зробити продукти гена, закодовані в цьому місцезрешташуванні, не функціональними. Для певних видів застосування може бути необхідним точне видалення полінуклеотиду з геному рослини. Такі застосування можливі із застосуванням пари сконструйованих мегануклеаз, кожна з яких розщеплює сайт розпізнавання мегануклеазою по обидві сторони від передбачуваної делеції. Також можна застосовувати TALEN, які здатні розпізнавати ген і зв'язуватися з ним і вносити двохнитковий розрив у геном.

Інший спосіб редагування геному включає застосування бактеріальної системи CRISPR/Cas. Бактерії й архебактерії характеризуються наявністю хромосомних елементів, що називаються короткими паліндромними повторами, регулярно розташованими групами (CRISPR), які є частиною адаптивної імунної системи, що захищає від проникнення вірусної й плазмідної ДНК. У випадку систем CRISPR типу II, CRISPR-PHK (crRNA) функціонують разом із транскрипційною crRNA (tracrRNA) і CRISPR-асоційованими (Cas) поліпептидами для введення двохниткових розривів у ДНК-мішені. Для розщеплення мішені за допомогою Cas9 необхідне спарювання основ crRNA і tracrRNA, а також спарювання основ crRNA і ДНК-мішені. Розпізнавання мішені полегшується за наявності короткого мотиву, що називається мотивом, що прилягає до протоспейсера (PAM), який відповідає послідовності NGG. Дану систему можна застосовувати для редагування геному. Cas9 зазвичай профамується подвійною РНК, що складається з crRNA і tracrRNA. Тим не менш, корові компоненти цих РНК можуть бути об'єднані в єдину гібридну "спрямовувальну РНК" для націлювання Cas9. Використання некодувальної спрямовувальної РНК для націлювання на ДНК з метою сайт-специфічного розщеплення обіцяє бути значно більш простим, ніж існуючі технології, такі як TALEN. За умов застосування стратегії CRISPR/Cas перенацілювання нуклеазного комплексу необхідне тільки введення нової послідовності РНК, і немає необхідності в реконструюванні специфічності поліпептидних факторів транскрипції. Технологію CRISPR/Cas реалізовували в рослинах у способі за міжнародною заявкою на патент WO 2015/189693, у якій розкрита платформа для опосередкованого вірусом редагування геному, яка є широко застосовною для різних видів рослин. Геном RNA2 вірусу погремковості тютюну (TRV) був сконструйований для переносу й доставки спрямовувальної РНК у рослини *Nicotiana benthamiana* із надекспресією ендонуклеази Cas9. У контексті даного винаходу пряма РНК може бути одержана з будь-якої з послідовностей, розкритих у даному документі, й ідей з WO 2015/189693, застосованих для редагування геному рослинної клітини й одержання необхідної мутантної рослини. Високий темп розвитку технології забезпечив появу великої різноманітності протоколів із широкими можливостями застосування в рослинах, які були добре класифіковані в ряді недавніх наукових оглядів (наприклад. *Plant Methods* (2016) 12:8; і *Front Plant Sci.* (2016) 7:506). Огляд систем CRISPR/Cas з особливим акцентом на їхньому застосуванні описаний в *Biotechnology Advances* (2015) 33, 1, 41-52). Більш недавні розробки щодо застосування CRISPR/Cas для маніпуляцій з геномами рослин описані в *Acta Pharmaceutica Sinica B* (2017) 7, 3, 292-302 і *Curr. Op. in Plant Biol.* (2017) 36, 1-8. Плазмиди на основі CRISPR/Cas9 для застосування в рослинах переаховані в "Addgene", некомерційному депозитарії плазмід (addgene.org), і плазмиди CRISPR/Cas є комерційно доступними. Одну або більше введених мутацій, таких як мутація, описана в даному документі, можна ідентифікувати або піддавати добору із застосуванням способів, відомих фахівцям у даній галузі техніки, таких як Саузерн-блот-аналіз, секвенування ДНК, ПЦР-аналіз або фенотипічний аналіз. Мутації, які

впливають на експресію гена або які порушують функцію кодованого поліпептиду, можна визначати за допомогою способів, добре відомих з рівня техніки.

Рослини або рослинні клітини згідно з даним винаходом містять описану мутацію й необов'язково будь-яку комбінацію однієї або більше додаткових мутацій в одному або більше генах. Наприклад, рослини або клітини рослин можуть містити одну мутацію в одному гені; кілька мутацій в одному гені; одну мутацію у двох або більше, або трьох або більше, або чотирьох або більше генах; або кілька мутацій у двох або більше, або трьох або більше, або чотирьох або більше генах. Приклад такої мутації описаний у даному документі.

В одному варіанті здійснення насіння рослини піддають мутагенезу й потім вкрощують із них мутантні рослини першого покоління. Потім забезпечують можливість самозапилення рослин першого покоління, й з насін'я від рослин першого покоління вирощують рослини другого покоління, які потім піддають скринінгу щодо мутацій, таких як мутація, описана в даному документі, у їх локусах. Незважаючи на те, що підданий мутації рослинний матеріал можна піддати скринінгу щодо мутацій, перевагою скринінгу рослин другого покоління є те, що всі соматичні мутації відповідають гермінативним мутаціям. Фахівцеві в даній галузі техніки буде зрозуміло, що різний рослинний матеріал, у тому числі без обмеження насіння, пилок, рослинну тканину або рослинні клітини, можна піддати мутагенезу для створення мутантних рослин. Однак тип рослинного матеріалу, підданого мутагенезу, може мати значення, коли полінуклеотид рослини піддають скринінгу щодо мутацій. Наприклад, якщо пилок піддають мутагенезу до запилення рослини, не підданої мутагенезу, то з насіння, одержаного під час цього запилення, вирощують рослини першого покоління. Кожна клітина рослин першого покоління буде містити мутації, створені в пилку; таким чином, ці рослини першого покоління можна потім піддати скринінгу щодо мутацій замість того, щоб чекати появи другого покоління.

Полінуклеотид, одержаний з окремих рослин, рослинних клітин або рослинного матеріалу, можна необов'язково об'єднати, щоб прискорити скринінг щодо щонайменше мутації, описаної в даному документі, у популяції рослин, що походять з підданих мутагенезу рослинних тканин, клітин або матеріалу. Можна перевірити одне або більше наступних поколінь рослин, рослинних клітин або рослинного матеріалу. Розмір необов'язково об'єднаної групи залежить від чутливості застосовуваного способу скринінгу. Після необов'язкового об'єднання зразків, їх можна піддати аналізу за допомогою методик ампліфікації, специфічної щодо полінуклеотиду, таких як ПЦР. Будь-який один або більше праймерів або зондів, специфічних щодо гена або послідовностей, що безпосередньо прилягають до гена, можна застосовувати для ампліфікації послідовностей у необов'язково об'єднаному зразку. Переважно для ампліфікації ділянок локусу, у яких з найбільшою ймовірністю виникають корисні мутації, переважно розробляють один або більше праймерів або зондів. Праймер найбільш переважно розробляють для виявлення мутацій у ділянках полінуклеотиду. Додатково, для праймера(праймерів) і зонда(зондів) переважно є уникнення відомих поліморфних сайтів для полегшення скринінгу точкових мутацій. Для полегшення виявлення продуктів ампліфікації один або більше праймерів або зондів можна мітити за допомогою будь-якого загальноприйнятого способу мічення. Праймер(праймери) або зонд(зонди) можна розробляти на основі послідовностей, описаних у даному документі, за допомогою способів, які добре відомі з рівня техніки.

Для полегшення виявлення продуктів ампліфікації праймер(праймери) або зонд(зонди) можна мітити за допомогою будь-якого загальноприйнятого способу мічення. їх можна розробляти на основі послідовностей, описаних у даному документі, за допомогою способів, які добре відомі з рівня техніки.

Поліморфізми можна ідентифікувати за допомогою засобів, відомих з рівня техніки, при чому деякі з них були описані в літературі.

Відповідно, у додатковому аспекті передбачений спосіб одержання рослини, що містить мутацію, описану в даному документі. Спосіб передбачає одержання щонайменше однієї клітини рослини, що містить ген, що кодує функціональний полінуклеотид нітратредуктази. Далі щонайменше одну клітину рослини обробляють в умовах, ефективних для модулювання функції полінуклеотиду нітратредуктази. Потім щонайменше одну мутантну клітину рослини розмножують із одержанням мутантної рослини, при цьому мутантна рослина характеризується модульованим рівнем поліпептиду нітратредуктази в порівнянні таким у контрольної рослини. В одному варіанті здійснення стадія обробки передбачає вплив на щонайменше одну клітину хімічного мутагенного засобу, описаного у даному документі, і в умовах, ефективних для одержання щонайменше однієї мутантної рослинної клітини. В іншому варіанті здійснення даного способу стадія обробки передбачає вплив на щонайменше одну клітину джерела випромінювання в умовах, ефективних для одержання щонайменше однієї мутантної рослинної клітини. Термін "мутантна рослина" включає мутантні рослини, у яких генотип є мо/шфікованим

у порівнянні з генотипом у контрольної рослини, переважно за допомогою способів, відмінних від способів генної інженерії й генетичної модифікації.

У певних варіантах здійснення мутантна рослина, мутантна рослинна клітина або мутантний рослинний матеріал може містити одну або більше мутацій, які зустрічаються в природі в іншій рослині, рослинній клітині або рослинному матеріалі й забезпечують необхідну ознаку. Цю мутацію можна ввести (наприклад, шляхом інтрогресії) в іншу рослину, рослинну клітину або рослинний матеріал (наприклад, рослину, рослинну клітину або рослинний матеріал з генетичним оточенням, що відрізняється генетичного оточення рослини, з якої походить мутація) для забезпечення в них даної ознаки. Таким чином, як приклад, мутацію, яка зустрічається в природі в першій рослині, можна ввести в другу рослину, таку як друга рослина з генетичним оточенням, що відрізняється від генетичного оточення першої рослини. Таким чином, фахівець у даній галузі техніки може здійснювати пошук й ідентифікування рослини, що несе в природніх умовах у своєму геномі один або більше мутантних алелів генів, описаних у даному документі, які забезпечують бажану ознаку. Мутантний алель(алелі), який(які) зустрічається(зустрічаються) в природі, можна перенести в другу рослину різними способами, включаючи селекцію, зворотне схрещування й інтрогресію з одержанням ліній, сортів або гібридів, які мають одну або більше мутацій у генах, описаних у даному документі. Та ж методика також може бути застосована для інтрогресії однієї або більше мутацій, що не зустрічаються в природі, з першої рослини в другу рослину. Рослини, що демонструють бажаний ознаку, можна відібрати з пулу мутантних рослин. Переважно, добір здійснюють із застосуванням даних про полінуклеотид, описаний в даному документі. Отже, можна здійснювати добір за генетичною ознакою в порівнянні з контролем. Такий скринінговий підхід може передбачати застосування загальноприйнятих методик ампліфікації й/або гібридизації, що обговорювалися в даному документі. Таким чином, додатковий аспект даного винаходу стосується способу ідентифікації мутантної рослини, що включає наступні стадії: (а) одержання зразка, що містить полінуклеотид, з рослини; і (b) визначення послідовності полінуклеотиду, де відмінність у послідовності полінуклеотиду в порівнянні з полінуклеотидом контрольної рослини вказує на те, що вказана рослина являє собою мутантну рослину. В іншому аспекті передбачений спосіб ідентифікації мутантної рослини, яка накопичує нітрати на зниженому рівні в порівнянні з контрольною рослиною, що віслючає стадії: (а) одержання зразка з рослини, що підлягає скринінгу; (b) визначення того, чи містить вказаний зразок одну або більше мутацій, описаних у даному документі, у полінуклеотиді, що кодує нітратредуктазу; і (c) визначення рівня нітратів у вказаній рослині. Переважно рівень нітратів визначають у висушеному листку. В іншому аспекті передбачений спосіб одержання мутантної рослини, що характеризується зниженими рівнями нітратів у порівнянні з контрольною рослиною, що включає наступні стадії: (а) одержання зразка з першої рослини; (b) визначення того, чи містить вказаний зразок одну або більше мутацій, описаних у даному документі, які призводять до зниження рівнів нітратів, у полінуклеотиді, що кодує нітратредуктазу; і (c) переносу однієї або більше мутацій у другу рослину. Переважно рівень нітратів визначають у висушеному листку. Мутацію(мутації) можна перенести в другу рослину за допомогою різних способів, які відомі з рівня техніки, як, наприклад, за допомогою генної інженерії, маніпуляції з генами, інтрогресії, селекції рослин, зворотного схрещування й т.п. В одному варіанті здійснення перша рослина є рослиною, що зустрічається в природі. В одному варіанті здійснення друга рослина характеризується генетичним оточенням, що відрізняється від генетичного оточення першої рослини. В іншому аспекті передбачений спосіб одержання мутантної рослини, яка характеризується зниженими рівнями нітратів у порівнянні з контрольною рослиною, що включає наступні стадії: (а) одержання зразка з першої рослини; (b) визначення того, чи містить вказаний зразок одну або більше мутацій, описаних у даному документі, які приводять до зниження рівнів нітратів, у полінуклеотиді, що кодує нітратредуктазу; і (c) інтрогресії однієї або більше мутацій з першої рослини в другу рослину. Переважно рівень нітратів визначають у висушеному листку. В одному варіанті здійснення стадія інтрогресії включає селекцію рослин, необов'язково включаючи зворотне схрещування й т.п. В одному варіанті здійснення перша рослина є рослиною, що зустрічається в природі. В одному варіанті здійснення друга рослина характеризується генетичним оточенням, що відрізняється від генетичного оточення першої рослини, в одному варіанті здійснення перша рослина не стосується культивуру або елітного культивуру. В одному варіанті здійснення друга рослина стосується культивуру або елітного культивуру. Додатковий аспект стосується мутантної рослини (в тому числі мутантної рослини, що стосується культивуру або елітного культивуру), одержаної або одержуваної за допомогою способів, описаних у даному документі. У певних варіантах здійснення "мутантні рослини" можуть мати одну або більше мутацій, локалізованих тільки в конкретній ділянці рослини, як, наприклад, у

послідовності одного або більше полінуклеотидів, описаних у даному документі. Згідно з даним варіантом здійснення інша геномна послідовність мутантної рослини буде такою ж або практично такою ж, як у рослини до мутагенезу.

У додатковому аспекті передбачений спосіб ідентифікації рослини, рослинної клітини або рослинного матеріалу, що містять мутацію в гені, що кодує полінуклеотид нітратредуктази, що включає: (а) здійснення мутагенезу щодо рослини, рослинної клітини або рослинного матеріалу; (b) одержання зразка із вказаної рослини, рослинної клітини або рослинного матеріалу або їх нащадків; і (с) визначення наявності мутантної полінуклеотидної послідовності, що несе мутацію, описану в даному документі.

Розкриті композиції й способи можна застосовувати щодо будь-якого виду з роду *Nicotiana*, включаючи *N. rustica* і *N. tabacum* (наприклад, LA B21, LN KY171, TI 1406, Basma, Galpao, Perique, Beinhart 1000-1 і Petico). Інші види включають *N. acaulis*, *N. acuminata*, *N. africana*, *N. alata*, *N. ameghinoi*, *N. amplexicaulis*, *N. arentsii*, *N. attenuata*, *N. azambujae*, *N. benavidesii*, *N. benthamiana*, *N. bigelovii*, *N. bonariensis*, *N. cavicola*, *N. clevelandii*, *N. cordifolia*, *N. corymbosa*, *N. debneyi*, *N. excelsior*, *N. forgetiana*, *N. fragrans*, *N. glauca*, *N. glutinosa*, *N. goodspeedii*, *N. gossei*, *N. hybrida*, *N. ingulba*, *N. kawakamii*, *N. knightiana*, *N. langsdorffii*, *N. linearis*, *N. longiflora*, *N. maritima*, *N. megalosiphon*, *N. miersii*, *N. noctiflora*, *N. nudicaulis*, *N. obtusifolia*, *N. occidentalis*, *N. occidentalis* subsp. *hesperis*, *N. otophora*, *N. paniculata*, *N. pauciflora*, *N. petunioides*, *N. plumbaginifolia*, *N. quadrivalvis*, *N. raimondii*, *N. repanda*, *N. rosulata*, *N. rosulata* subsp. *ingulba*, *N. rotundifolia*, *N. setchellii*, *N. simulans*, *N. solanifolia*, *N. spegazzinii*, *N. stocktonii*, *N. suaveolens*, *N. sylvestris*, *N. thyrsoflora*, *N. tomentosa*, *N. tomentosiformis*, *N. trigonophylla*, *N. umbratica*, *N. undulata*, *N. velutina*, *N. wigandioides* і *N. × sanderae*.

В одному варіанті здійснення рослина являє собою *N. tabacum*.

Застосування культиварів тютюну й елітних культиварів тютюну також передбачено в даному документі. Рослина, таким чином, може являти собою сорт тютюну або елітний культивар тютюну, який містить одну або більше генетичних мутацій. Генетична(генетичні) мутація (мутації) (наприклад, один або більше поліморфізмів) можуть являти собою мутації, які не існують у природі в окремому сорті тютюну або культиварі тютюну (наприклад, елітному культиварі тютюну), або можуть являти собою генетичну(генетичні) мутацію(мутації), яка(які) існує(існують) у природі, за умови, що мутація не зустрічається в природі в окремому сорті тютюну або культиварі тютюну (наприклад, в елітному культиварі тютюну).

Сорту *Nicotiana tabacum* включають різновиди тютюну типу Берлей, темного типу, типу трубовогневого сушіння й східного типу. Необмежуваними прикладами сортів або культиварів є: AA37, BD 64, CC 101, CC 200, CC 27, CC 301, CC 400, CC 500, CC 600, CC 700, CC 800, CC 900, Coker 176, Coker 319, Coker 371 Gold, Coker 48, CD 263, DF911, тютюн DT 538 LC Galpao, GL 26H, GL 350, GL 600, GL 737, GL 939, GL 973, HB 04P, HB 04P LC, HB3307PLC, гібрид 403LC, гібрид 404LC, гібрид 501 LC, K 149, K 326, K 346, K 358, K 394, K 399, K 730, KDH 959, KT 200, KT204LC, KY10, KY14, KY 160, KY 17, KY 171, KY 907, KY907LC, KY14xL8 LC, Little Crittenden, McNair 373, McNair 944, msKY 14xL8, Narrow Leaf Madole, Narrow Leaf Madole LC, NBH 98, N-126, N- 777LC, N-7371LC, NC 100, NC 102, NC 2000, NC 291, NC 297, NC 299, NC 3, NC 4, NC 5, NC 6, NC7, NC 606, NC 71, NC 72, NC 810, NC BH 129, NC 2002, Neal Smith Madole, OXFORD 207, PD 7302 LC, PD 7309 LC, PD 7312 LC, тютюн "Перик", PVH03, PVH09, PVH19, PVH50, PVH51, R 610, R 630, R 7-11, R 7-12, RG 17, RG 81, RG H51, RGH 4, RGH 51, RS 1410, Speight 168, Speight 172, Speight 179, Speight 210, Speight 220, Speight 225, Speight 227, Speight 234, Speight G-28, Speight G-70, Speight H-6, Speight H20, Speight NF3, TI 1406, TI 1269, TN 86, TN86LC, TN 90, TN 97, TN97LC, TN D94, TN D950, TR (Tom Rosson) Madole, VA 309, VA359, AA 37-1, B13P, Xanthi (Mitchell-Mor), Bel-W3, 79-615, Samsun Holmes NN, KTRDC номер 2 - гібрид 49, Burley 21, KY8959, KY9, MD 609, PG01, PG04, PO1, PO2, PO3, RG11, RG 8, VA509, AS44, Banket Al, Basma Drama B84/31, Basma I Zichna ZP4/B, Basma Xanthi BX 2A, Batek, Besuki Jember, C104, Coker 347, Criollo Misionero, Delcrest, Djebel 81, DVH 405, Galpao Comum, HB04P, Hicks Broadleaf, Kabakulak Ellassona, Kutsage El, LA BU 21, NC 2326, NC 297, PVH 2110, Red Russian, Samsun, Saplak, Simmaba, Talgar 28, Wislica, Yayaldag, Prilep HC-72, Prilep P23, Prilep PB 156/1, Prilep P12-2/1, Yaka JK-48, Yaka JB 125/3, TI-1068, KDH-960, TI-1070, TW136, Basma, TKF 4028, L8, TKF 2002, GR141, Basma xanthi, GR149, GR153, Petit Havana. Також передбачені підрізновиди вищевказаного з низьким рівнем перетворення нікотину в норнікотин, навіть якщо вони спеціально не вказані в даному документі.

В одному варіанті здійснення, культивар являє собою AA37, який зазвичай розуміється як продукт схрещування південноамериканського темного тютюну й ідіоплазми американського Берлея.

Варіанти здійснення також спрямовані на композиції й способи одержання рослин, які були модифіковані з метою модулювання експресії або функції полінуклеотиду(полінуклеотидів), описаного(описаних) у даному документі (або будь-якої їхньої комбінації, описаної в даному документі). Одержані рослини за загальним зовнішнім виглядом переважно можуть бути

5 подібними з контрольними рослинами або по суті такими ж, як вони. Різні фенотипічні характеристики, такі як ступінь зрілості, кількість листків на рослині, висота стебла, кут уростання листків, розмір листка (ширина й довжина), довжина міжвузля й співвідношення мас листової пластинки й центральної жилки можна оцінити шляхом польових спостережень.

Один аспект стосується насіння рослини, описаної в даному документі. Переважно, насіння

10 являють собою насіння тютюну. Додатковий аспект стосується пилку або насінного зачатку рослини, описаної в даному документі. Додатково, передбачена рослина, описана в даному документі, яка додатково містить полінуклеотид, що забезпечує чоловічу стерильність.

Також передбачена культура тканин з регеноерованих клітин рослини, описаної в даному документі, при цьому з культури регенерують рослини, здатні експресувати всі морфологічні й

15 фізіологічні характеристики батьківської особи. Клітини, що піддаються регенерації, включають клітини з листків, пилку, зародків, сім'ядоль, гіпокотилів, коріння, кінчиків коріння, пильовиків, квіток та їх частини, насінного зачатку, пагонів, стебел, черешків, серцевини й насінних коробочок, або калюси або протопласти, одержані з них.

Одним об'єктом є одержання рослин або їх частин, які демонструють модульовані рівні

20 нітратів у рослинному матеріалі, наприклад, у висушеному листку. Рослини або їх частини переважно демонструють модульовані рівні нітратів у порівнянні з контрольною рослиною.

Рослини або їх частини переважно характеризуються по суті такою ж загальною біомасою врожаю (вказаною як біомаса свіжого листків на рослину), як й у контрольній рослині.

Рослини або їх частини переважно мають по суті такий самий рівень вмісту нікотину в

25 листку рослини, як і контрольна рослина.

Рослини або їх частини переважно характеризуються по суті таким самим рівнем загального вмісту алкалоїдів у листку, як і контрольна рослина.

Рослини або їх частини переважно характеризуються по суті таким самим рівнем вмісту

30 аміаку в листку, як і контрольна рослина.

Рослини або їх частини переважно характеризуються по суті таким самим рівнем вмісту відновлюючих цукрів, у листку рослини, як і контрольна рослина.

Відповідно, у даному документі описані рослини або їх частини або рослинні клітини, які характеризуються модульованими рівнями нітратів у порівнянні з контрольними клітинами або контрольними рослинами. Рослини або клітини рослин є модифікованими для модулювання

35 синтезу або функції одного або більше поліпептидів, описаних у даному документі, шляхом модулювання експресії одного або більше відповідних полінуклеотидів, описаних у даному документі. Модульовані рівні нітратів переважно спостерігаються у висушеному листку, у певних варіантах здійснення рівень нітратів у рослині, наприклад, у висушеному листку або висушеному тютюні, є зменшеним.

Додатковий аспект стосується рослини або рослинної клітини, де експресія або функція

40 одного або більше поліпептидів, описаних у даному документі, є модульованими, і частина рослини (наприклад, висушені листки рослини або висушений тютюн) характеризується зниженням рівнів нітратів в ній, зниженими на щонайменше приблизно 37 % у порівнянні з контрольною рослиною, у

45 якій експресія або функція вказаного(вказаних) поліпептиду(поліпептидів) не були модульовані. У певних варіантах здійснення рівень нітратів у рослині, як, наприклад, у висушених листках або висушеному тютюні, може бути знижений, наприклад, на щонайменше приблизно 30 % або більше, або приблизно 35 % або більше, або

приблизно 37 % або більше, або приблизно 40 % або більше.

Ще один додатковий аспект стосується висушеного рослинного матеріалу, такому як

50 висушений листок рослини або висушений тютюн, одержаному або одержуваному з рослини або рослинної клітини, описаних у даному документі, де експресія одного або більше полінуклеотидів, описаних у даному документі, або функція поліпептиду, кодованого ними, є

модульованими й де рівень нітратів є модульованим на щонайменше приблизно 37 % у порівнянні з контрольною рослиною, наприклад, на щонайменше приблизно 30 % або більше,

55 або приблизно 35 % або більше, або приблизно 40 % або більше.

Варіанти здійснення також спрямовані на композиції й способи одержання рослин або

60 рослинних клітин, які були модифіковані для модулювання експресії або функції одного або більше полінуклеотидів або поліпептидів, описаних у даному документі, що може призводити до одержання рослин, або компонентів рослини (наприклад, листків, таких як висушені листки рослини, або тютюну), або рослинних клітин з модульованим вмістом нітратів.

Підвищення функції або активності в порівнянні з контролем може становити від приблизно 5 % до приблизно 100 %, або підвищення становить щонайменше 10 %, щонайменше 20 %, щонайменше 25 %, щонайменше 30 %, щонайменше 40 %, щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або 100 % або більше, як, наприклад, 200 %, 300 %, 500 %, 1000 % або більше.

Зниження функції або активності в порівнянні з контролем може становити від приблизно 5 % до приблизно 100 %, або зниження становить щонайменше 10 %, щонайменше 20 %, щонайменше 25 %, щонайменше 30 %, щонайменше 40 %, щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або 100 %.

Рослину, що містить мутацію, описану в даному документі, у полінуклеотиді, що кодує нітратредуктазу, можна застосовувати в програмі селекції рослин для створення застосовних ліній, сортів і гібридів. Зокрема, мутант може бути інтрогресований у комерційно значимі сорти, описані вище. Таким чином, передбачені способи селекції рослин, які включають схрещування рослини, описаної в даному документі, з рослиною, що містить інші генетичні особливості. Спосіб може додатково включати схрещування рослини-нащадка з іншою рослиною й необов'язкове повторення схрещування доти, поки не буде одержаний нащадок з необхідними генетичними ознаками або генетичним оточенням. Однією метою, для якої підходять такі способи селекції, є введення необхідної генетичної ознаки в інші сорти, селекційні лінії, гібриди або культивари, особливо ті, які становлять комерційний інтерес. Іншою метою є полегшення нагромадження генетичних модифікацій різних генів в окремих сортах, лініях, гібридах або культиварах рослин. Передбачені внутрішньовидові, а також міжвидові схрещування. Рослин и-нащадки, які виникають у результаті таких схрещувань, які також називаються селекційними лініями, являють собою приклади рослин за даним винаходом.

В одному варіанті здійснення передбачений спосіб одержання рослини, що включає: (a) схрещування рослини за даним винаходом із другою рослиною з одержанням насіння тютюну, що є насінням-нащадком; (b) вирощування насіння тютюну, що є насінням-нащадком, в умовах росту рослин з одержанням рослини, що не зустрічається в природі. Спосіб може додатково включати; (c) схрещування рослини, що не зустрічається в природі, з попереднього покоління із самою собою або з іншою рослиною з одержанням насіння тютюну, що є насінням-нащадком; (d) вирощування насіння тютюну, що є насінням-нащадком, зі стадії (c) у умовах росту рослин з одержанням додаткових рослин, що не зустрічаються в природі; і (e) повторення стадій схрещування й вирощування (c) і (d) кілька раз із одержанням наступних поколінь рослин, що не зустрічаються у природі. Спосіб може необов'язково включати перед стадією (a) стадію одержання батьківської рослини, яка містить генетичні особливості, характеристики яких визначені і не є ідентичними рослині за даним винаходом. У деяких варіантах здійснення залежно від програми селекції стадії схрещування й вирощування повторюють від 0 до 2 разів, від 0 до 3 разів, від 0 до 4 разів, від 0 до 5 разів, від 0 до 6 разів, від 0 до 7 разів, від 0 до 8 разів, від 0 до 9 разів або від 0 до 10 разів для одержання поколінь рослин, що не зустрічаються в природі. Зворотне схрещування являється прикладом такого способу, у якому нащадка схрещують із одною з відповідних йому батьківських форм або з іншою рослиною, генетично подібною до відповідної йому батьківської форми, для одержання рослини-нащадка в наступному поколінні, яке має генетичні особливості, більш близькі до особливостей однієї з батьківських форм. Методики селекції рослин, зокрема селекція рослин, добре відомі й можуть застосовуватися в способах за даним винаходом. Певні варіанти здійснення виключена стадія добору рослини.

Згідно з даним винаходом в програмі селекції в результаті успішних схрещувань утворюються рослини F1, які є фертильними. Відібрані рослини F1 можна схрещувати з одною з батьківських форм, і рослини першого покоління, одержані в результаті зворотного схрещування, піддають самозапиленню з одержанням популяції, яку знову піддають скринінгу щодо експресії варіантного гена (наприклад, нульової версії гена). Процес зворотного схрещування, самозапилення й скринінгу повторюють, наприклад, щонайменше 4 рази доти, поки за остаточного скринінгу не одержать рослину, яка є фертильною і в достатньому ступені подібною рекурентній батьківській рослині. Цю рослину за необхідності піддають самозапиленню і потомство потім знову піддають скринінгу, щоб підтвердити, що рослина демонструє експресію варіантного гена. У деяких варіантах здійснення популяцію рослин у поколінні F2 піддають скринінгу щодо експресії варіантного гена, наприклад, рослину, яка не здатна експресувати поліпептид через відсутність гена, ідентифікують згідно зі стандартними способами, наприклад, за допомогою методики ПЦР із застосуванням праймерів, розроблених на основі інформації про

полінуклеотидну послідовність для полінуклеотиду(полінуклеотидів), описаного(описаних) в даному документі (або будь-якої їхньої комбінації, описаної в даному документі).

Крім мутацій, описаних в даному документі, рослину або рослинні клітини, описані в даному документі, можуть мати одну або більше додаткових мутацій або в тих же полінуклеотидах або поліпептидах, які описані в даному документі, або в одному або більше інших полінуклеотидах або поліпептидах у геномі.

Без обмеження рослини та їх частини, описані в даному документі, можна модифікувати до або після модулювання експресії, функції або активності одного або більше полінуклеотидів і/або поліпептидів відповідно до даного винаходу.

Одна або більше із наступних додаткових генетичних модифікацій (наприклад, мутацій) можуть бути присутніми у рослинах та їх частинах.

Один або більше генів, які залучені в перетворення проміжних продуктів азотного обміну, можуть бути модифіковані (наприклад, піддані мутації), що в результаті приводить до більш низьких рівнів щонайменше одного специфічного для тютюну нітрозаміну (TSNA). Необмежуючі приклади таких генів включають гени, що кодуєть нікотин-деметилазу, такі як CYP82E4, CYP82E5 і CYP82E10, описані в WO2006/091194, WO2008/070274, WO2009/064771 і WO2011/088180, і нітратредуктазу, як описано в WO2016046288.

Один або більше генів, які беруть участь у поглинанні важких металів або транспорті важких металів, можуть бути модифіковані (наприклад, піддані мутації), що приводить до більш низького вмісту важких металів. Необмежуючі приклади включають сімейства поліпептидів, асоційованих із множинною лікарською стійкістю, сімейства посередників дифузії катіонів (CDF), сімейство Zrt/Irt-подібних поліпептидів (ZIP), сімейство катіонообмінників (CAH), сімейство транспортерів міді (COPT), сімейство АТФаз, що є переносниками важких металів (наприклад, HMA, як описано в WO2009/074325 і WO2017/129739), сімейство гомологів поліпептидів макрофагів, асоційованих із природньою стійкістю (NRAMP), й інші члени сімейства транспортерів з АТФ- зв'язувальною касетою (ABC) (наприклад, MRP), як описано в WO2012/028309, які беруть участь у транспорті важких металів, таких як кадмій.

Інші ілюстративні модифікації (наприклад, мутації) можуть приводити до одержання рослин з модульованою експресією або функцією ізопропілмалатсинтази, що в результаті приводить до зміни складу складних ефірів сахарози, яка може використовуватися для зміни ароматичного профілю (див. WO2013029799).

Інші ілюстративні модифікації (наприклад, мутації) можуть приводити до одержання рослин з модульованою експресією або функцією треонінсинтази, при цьому можна модулювати рівні метіонала (див. WO2013029800).

Інші ілюстративні модифікації (наприклад, мутації) можуть приводити до одержання рослин з модульованою експресією або функцією однієї або більше із неоксантиносинтази, лікопен-бета-циклази й 9-цис- епоксикаротиноїддіоксигенази для модулювання вмісту бета-дамасценону для зміни ароматичного профілю (див. WO2013064499).

Інші ілюстративні модифікації (наприклад, мутації) можуть приводити до одержання рослин з модульованою експресією або функцією представників сімейства CLC хлоридних каналів для модулювання в них рівнів нітратів (див. WO2014096283 і WO2015197727).

Інші ілюстративні модифікації (наприклад, мутації) можуть приводити до одержання рослин з модульованою експресією або функцією однієї або більше аспарагінсинтаз для модулювання рівнів аспарагіну в листку й досягнення модульованих рівнів акриламідів в аерозолі, одержаному під час нагрівання або горіння листків (див. WO2017042162).

Приклади інших модифікацій (наприклад, мутацій) включають модулювання переносимості до гербіцидів, наприклад, до гліфосату, який є активним інгредієнтом багатьох гербіцидів широкого спектра дії.

Інші ілюстративні модифікації (наприклад, мутації) приводять до одержання рослин, які є стійкими до комах. Токсини *Bacillus thuringiensis*(Bt) можуть забезпечувати ефективний шлях відстрочки появи шкідників, стійких до Bt, як, було нещодавно показано на брокколі, де "пірамідовані" гени Bt cry1Ac і cry1C забезпечували контроль видів капустяної моли, стійкої до будь-якого окремого поліпептиду, і суттєво затримували еволюційний розвиток стійких комах.

Інша ілюстративна модифікація (наприклад, мутація) приводить до одержання рослин, які стійкі до захворювань, що викликані патогенами (наприклад, вірусами, бактеріями, грибами). Були розроблені рослини, що експресують ген Ха21 (стійкість до бактеріального некрозу), при цьому рослини, експресували як злитий ген Bt, так і ген хітинази (стійкість до жовтої вогникової хвороби й витривалість до ризоктоніозу).

Інша ілюстративна модифікація (наприклад, мутація) призводить до зміни репродуктивної здатності, наприклад, до чоловічої стерильності. Інша ілюстративна модифікація (наприклад,

мутація) призводить до одержання рослин, які є витривалими до абіотичного стресу (наприклад, посухи, зміни температури, засоленості).

Інша ілюстративна модифікація (наприклад, мутація) призводить до одержання рослин, у яких активність однієї або більше глікозилтрансфераз, таких як N- ацетил глюкозам і нилтрансфераза, р (1,2)-ксилозилтрансфераза й а (1,3)- фукозилтрансфераза, є модульованою (див. WO/2011/117249).

Інша ілюстративна модифікація (наприклад, мутація) приводить до одержання рослин, у яких активність однієї або більше нікотин-п-деметилаз модулюють таким чином, що можуть модулюватися рівні норнікотину й метаболітів норнікотину, які утворюються під час сушіння (див. WO2015169927).

Інші ілюстративні модифікації (наприклад, мутації) можуть призводити до одержання рослин з поліпшеними запасними поліпептидами й маслами, рослин з підвищеною ефективністю фотосинтезу, рослин із тривалим строком зберігання, рослин з підвищеним вмістом вуглеводів і рослин, стійких до грибів.

Один або більше генів, які залучені в шлях синтезу нікотину, можна модифікувати (наприклад, піддавати мутації) з одержанням рослин або частин рослин, у яких під час сушіння виробляються модульовані рівні нікотину. Гени, відповідні за синтез нікотину, можуть бути вибрані із групи, що складається з: A622, BBLa, BBLb, JRE5L1, JRE5L2, MATE1, MATE2, MPO1, MPO2, MYC2a, MYC2b, NBB1, nic1, nic2, NUP1, NUP2, PMT1, PMT2, PMT3, PMT4 і QPT або комбінації одного або більше із них.

Один або більше генів, які залучені в регулювання кількості одного або більше алкалоїдів, можна модифікувати (наприклад, піддавати мутації) з одержанням рослин або частин рослин, які виробляють модульовані рівні алкалоїду. Гени, що забезпечують контроль рівня алкалоїдів, можуть бути вибрані із групи, що складається з BBLa, BBLb, JRE5L1, JRE5L2, MATE1, MATE 2, MYC2a, MYC2b, nic1, nic2, NUP1 і NUP2 або комбінації двох або більше із них.

Частини рослин, описаних у даному документі, зокрема листову пластинку й центральну жилку даних рослин, можна включити у виготовлення різних продуктів споживання, включаючи без обмеження матеріали, що утворюють аерозоль, обладнання, що утворюють аерозоль, курильні вироби, вироби для паління, бездимні продукти, медичні або косметичні продукти, препарати для внутрішньовенного введення, таблетки, порошки й тютюнові продукти, або застосовувати у їх виготовленні. Приклади матеріалів, що утворюють аерозоль, включають тютюнові композиції, різновиди тютюну, тютюновий екстракт, різаний тютюн, різаний наповнювач, сушений тютюн, взірваний тютюн, гомогенізований тютюн, відновлений тютюн і різновиди трубкового тютюну. Курильні вироби й вироби для паління є типами пристроїв, що утворюють аерозоль. Приклади курильних виробів або виробів для паління включають сигарети, сигарили й сигари. Приклади бездимних продуктів включають жувальний тютюн і нюхальний тютюн. У певних обладнаннях, що утворюють аерозоль, замість згоряння, тютюнова композиція або інший матеріал, що утворює аерозоль, нагрівають за допомогою одного або більше електричних нагрівальних елементів з одержанням аерозолу. В іншому типі обладнання, що нагрівається, що утворює аерозоль, аерозоль одержують шляхом переміщення тепла від горючого елемента, що виділяє тепло, або джерела тепла до фізично відділеного матеріалу, що утворює аерозоль, який може бути розташований усередині, навколо або нижче джерела тепла. Бездимні тютюнові продукти й різні матеріали, що містять тютюн, що утворюють аерозоль, можуть містити тютюн у будь-якому виді, у тому числі у вигляді висушених часток, шматків, гранул, порошоків або суспензій, нанесених на інші інгредієнти, змішаних з ними, оточені ними або іншим чином об'єднані з ними в будь-якому форматі, такому як пластівці, плівки, таблетки, піни або кульки Використовуваний у даному документі термін "дим" використовують для опису типу аерозолу, який утворюється курильними виробами, таких як сигарети, або під час спалювання матеріалу, що утворює аерозоль.

В одному варіанті здійснення також запропонований висушений рослинний матеріал, одержаний з рослин, описаних у даному документі Способи сушіння зелених тютюнових листків ВІДОМІ фахівцям у даній галузі й включають без обмеження повітряне сушіння, вогневе сушіння, трубовогогневе сушіння й сонячне сушіння, як описано в даному документі.

В іншому варіанті здійснення описані тютюнові продукти, у тому числі матеріали, що містять тютюн, що утворюють аерозоль, що містять рослинний матеріал, такий як листки, переважно висушені листки з рослин тютюну, описаних у даному документі Тютюнові продукти, описані в даному документі, можуть являти собою змішаний тютюновий продукт, який може додатково містити немодифікований тютюн.

Продукти й способи для керування сільськогосподарськими культурами й для сільського господарства.

Для рослин можуть існувати інші шляхи застосування в, наприклад, сільському господарстві. Наприклад, рослини, описані в даному документі, можна застосовувати для виготовлення корму для тварин і продуктів харчування для людини.

У даному винаході також передбачені способи одержання насіння, що включають культивування рослини, описаної в даному документі, і збір насіння культивованих рослин. Насіння рослин, описаних у даному документі, можна кондиціонувати і пакувати в пакувальний матеріал за допомогою засобів, відомих у даній галузі техніки, з одержанням готового виробу. Пакувальний матеріал, такий як папір або тканина, добре відомий у даній галузі техніки. Пакування насіння може мати етикетку, наприклад маркування або етикетку, прикріплену до пакувального матеріалу, етикетку, надруковану на пакуванні, яка описує походження насіння, що містяться в ній.

Композиції, способи й набори для генотипування рослин для ідентифікації, добору або селекції можуть включати засоби для виявлення присутності полінуклеотиду (або будь-якої їхньої комбінації, описаної в даному документі) у зразку полінуклеотиду. Відповідно, описана композиція, що містить один або більше праймерів для специфічної ампліфікації щонайменше частини одного або більше полінуклеотидів, і необов'язково один або більше зондів, і необов'язково один або більше реагентів для проведення ампліфікації або виявлення.

Відповідно, розкриті геноспецифічні олігонуклеотиди ні праймери або зонди, що містять приблизно 10 або більше суміжних полінуклеотидів, що відповідають полінуклеотиду(полінуклеотидам), описаному(описаним) в даному документі. вказані праймери або зонди можуть містити або складатися із приблизно 15, 20, 25, 30, 40, 45 або 50 або більше суміжних полінуклеотидів, які гібридизуються (наприклад, специфічно гібридизуються) з полінуклеотидом(полінуклеотидами), описаним(описаними) у даному документі.

У деяких варіантах здійснення праймери або зонди можуть містити приблизно 10-50 суміжних нуклеотидів, приблизно 10-40 суміжних нуклеотидів, приблизно 10-30 суміжних нуклеотидів або приблизно 15-30 суміжних нуклеотидів або складатися із них, які можна застосовувати у залежних від послідовності способах ідентифікації (наприклад, Саузерн-блот-гібридизації) або виділення гена (наприклад, гібридизації *in situ* бактеріальних колоній або бляшок бактеріофагів) або виявлення гена (наприклад, у вигляді одного або більше праймерів ампліфікації під час ампліфікації або виявлення). Один або більше специфічних праймерів або зондів можна розробити й застосовувати для ампліфікації й виявлення частини або всього полінуклеотиду(полінуклеотидів). У якості конкретного прикладу, два праймера можна застосовувати в протоколі ПЦР для ампліфікації полінуклеотидного фрагмента. ПЦР можна також проводити із застосуванням одного праймера, який одержаний з послідовності полінуклеотиду, і другого праймера, який гібридизується з послідовністю вище або нижче полінуклеотидної послідовності, такої як послідовність промотору, 3'-кінець мРНК-попередника або послідовність, одержана з вектора. Приклади термічних й ізотермічних методик, застосованих для ампліфікації полінуклеотидів *in vitro*, добре відомі з рівня техніки, зразок може являти собою рослину, рослинну клітину або рослинний матеріал або тютюновий продукт, одержаний з рослини, рослинної клітини або рослинного матеріалу, описаних в даному документі, або може бути одержаний з них.

У додатковому аспекті також передбачений спосіб виявлення полінуклеотиду (полінуклеотидів), описаного(описаних) в даному документі (або будь-якої їхньої комбінації, описаної в даному документі) у зразку, що включає стадії: (а) одержання зразка, що містить або імовірно містить полінуклеотид; (b) приведення вказаного зразка в контакт із одним або більше праймерами або одним або більше зондами для специфічного виявлення щонайменше частини полінуклеотиду(полінуклеотидів); і (c) виявлення присутності продукту ампліфікації, де присутність продукту ампліфікації свідчить про присутність полінуклеотиду(полінуклеотидів) у зразку, у додатковому аспекті також передбачене застосування одного або більше праймерів або зондів для специфічного виявлення щонайменше частини полінуклеотиду(полінуклеотидів). Також передбачені набори для виявлення щонайменше частини полінуклеотиду(полінуклеотидів), які містять один або більше праймерів або зондів для специфічного виявлення щонайменше частини полінуклеотиду(полінуклеотидів). Набір може містити реагенти для ампліфікації полінуклеотидів, наприклад реагенти для ПЦР, або реагенти для технології виявлення із застосуванням гібридизації з зондом, такий як Саузерн-блотинг, нозерн-блотинг, гібридизація *in situ* або мікроматричний аналіз. Набір може містити реагенти для технології виявлення шляхом зв'язування антитіл, такий як вестерн-блотинг, ELISA, SELDI-мас-спектрометрія або аналіз за допомогою тест-смужок. Набір може містити реагенти для секвенування ДНК. Набір може містити реагенти й інструкції із застосування набору.

У деяких варіантах здійснення набір може містити інструкції по виконанню одного або більше описаних способів. Описані набори можуть бути застосовні для визначення генетичної особливостей, філогенетичних досліджень, генотипування, гаплотипування, генеалогічного аналізу або селекції рослин, зокрема, з кількісною оцінкою кодомінантних ознак.

У даному винаході також передбачений спосіб генотипування рослини, рослинної клітини або рослинного матеріалу, що містять полінуклеотид, описаний у даному документі. Генотипування забезпечує засоби проведення відмінності між гомологами в парі хромосом і може застосовуватися для розрізнення сегрегантів у популяції рослин. Способи з використанням молекулярних маркерів можна застосовувати для філогенетичних досліджень, визначення характеристик генетичної спорідненості між сортами сільськогосподарських культур, ідентифікації продуктів схрещування або соматичних гібридів, визначення локалізації хромосомних сегментів, що впливають на моногенні ознаки, клонування на основі генетичних карт і вивчення кількісного спадкування. У певному способі генотипування може використовуватися будь-яка кількість методик аналізу молекулярних маркерів, включаючи поліморфізми довжин ампліфікованих фрагментів (AFLP). AFLP є результатом алельних відмінностей між ампліфікованими фрагментами, обумовленими мінливістю полінуклеотиду. Таким чином, у даному винаході додатково запропоновані способи відстеження сегрегації одного або більше генів або полінуклеотидів, а також хромосомних послідовностей, генетично щеплених із цими генами або полінуклеотидами, із застосуванням таких методик, як аналіз AFLP.

Даний винахід додатково описаний у прикладах нижче, які представлені для більш докладного опису даного винаходу. Ці приклади, у яких викладений переважний принцип, передбачений в даному документі для здійснення даного винаходу, призначені для ілюстрації, а не для обмеження даного винаходу.

ПРИКЛАД

Насіння M0 *Nicotiana tabacum* AA37 обробляли етилметансульфонатом (EMS) за різних концентрацій і значеннях часу впливу для одержання популяції рослин з випадковими точковими мутаціями. Криву загину оцінювали у покоління M1 для кожного виду обробки разом з летальністю, фертильністю й ступенем хімеризму. Рослини M1 піддавали самозаплідненню з утворенням сімейств насіння M2 для забезпечення можливості одержання рецесивних алелів у гомозиготному стані й виділення летальних алелів у гетерозиготному стані. Геномну ДНК від восьми рослин M2 на кожне сімейство в популяції, підданої мутагенезу за допомогою EMS, витягали й піддавали скринінгу на мутанти, у той час як рослинний матеріал M2 і насіння M3 збирали й зберігали для проведення майбутніх аналізів. Для ідентифікації й визначення характеристик мутантних варіантів зразки геномної ДНК від рослин M2 поєднували в групи й піддавали скринінгу шляхом секвенування фрагментів гена-мішені. Фрагменти цільового гена ампліфікували за допомогою праймерів, специфічних щодо гена NIA2 тютюну, показаних у таблиці 2. Пошук мутацій у цільових генах здійснювали шляхом секвенування окремих фрагментів ДНК. Мутація M527I в NIA2 тютюну описана в таблиці 1. Мутантну рослину схрещували з AA37 дикого типу й одержаною в результаті самозапилення рослиною F1, яке було гетерозиготним. Сегрегантів F2 аналізували за допомогою способу кількісної ампліфікації нуклеїнових кислот (TaqMan).

У польовому випробуванні три мутантні лінії, гомозиготні за NIA2 M527I, тестували в порівнянні з 5 позасегрегантними гомозиготними лініями дикого типу й 1 контрольною лінією AA37, що не зазнала обробки із застосуванням EMS. Згідно з планом польового випробування рослини розташовували на 20 дослідних ділянках з рослинами, розподіленими довільним чином для мінімізації ефекту розташування, обумовленого неоднорідністю поля. Рослини вирощували у відповідності зі стандартом належної сільськогосподарської практики Швейцарії для тютюну Берлей. Під час збору врожаю вимірювали загальну біомасу свіжого листків рослини. Вимірювання біомаси листків рослини проводили за допомогою зрізання листків під час збору врожаю й запису показників їх сирої ваги.

Листки другого збору (з положення в середній частині стебла) потім піддавали повітряному сушінню й зразки аналізували для складання хімічного профілю за допомогою стандартних способів Skalar.

Результати наведено на фігурі 2. У ході польового випробування мутантні лінії рослини NtNIA2 M527I демонстрували 37 % зниження рівнів нітратів у висушених листках у порівнянні із позасегрегантними контрольними рослинами дикого типу. Ефект щодо загальної біомаси врожаю рослини (позначеної як біомаса свіжого листків на рослину), а також щодо вмісту нікотину, загального вмісту алкалоїдів, вмісту аміаку та відновлюючих цукрів у листку рослини не спостерігався.

Будь-яка публікація, цитована або описана в даному документі, надає відповідну інформацію, розкрити до дати подачі даної заявки. Заяви, зроблені в даному документі, не повинні витлумачуватися як визнання того, що автори даного винаходу не мають підстав для його протиставлення таким розкриттям як більш раннім. Усі публікації, згадані у вищенаведеному описі, включені в даний документ за допомогою посилання. Різні модифікації й варіанти даного винаходу будуть очевидні фахівцям у даній галузі без відступу від обсягу й суті даного винаходу. Незважаючи на те, що даний винахід був описаний у зв'язку з конкретними переважними варіантами здійснення, слід розуміти, що заявлений винахід не повинний бути неправомірно обмежений такими конкретними варіантами здійснення. У дійсності мається на увазі, що різні модифікації описаних варіантів здійснення винаходу, які очевидні фахівцям у клітинній, молекулярній біології й біології рослин або в суміжних галузях, перебувають у межах обсягу формули винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 Поліпептидна послідовність дикого типу, що кодується геном нітратредуктази NIA2 з *Nicotiana tabacum*, номер доступу в GenBank X14059. Послідовність, яка виступає як сайт розпізнавання для зв'язування кінази нітратредуктази, відповідальної за фосфорилування амінокислоти S523 NtNIA2, виділена жирним шрифтом і підкресленням.

MAASVENRQFSHLEAGLSRSFKPRSDSPVRGCNFPSPNSTNFQKKPNSTIYLD
YSSSEDDDDDDDEKNEYLQMIKKGNSELEPSVHDTRDEGTADNWIERNFSMIR
LTGKHPFNSEPLNRLMHHGFITPVLHYVRNHGPPVPGKTWDDWTVEVTGL
VKRPMKFTMDQLVNEFPRELPTLVCAGNRRKEQNMVKQTIGFNWGAAA
VSTTIWRGVPLRALLKRCGVFSKNKGALNVCFEGADVLPGGGGSKYGTSIKK
EFAMDPARDIIVAYMQNGEKLAPDHGFPVRMIIIPGFIGGRMVKWKRIIVTTQ
ESDSYYHFKDNRVLPPHVDAELANTEAWWYKPEYIINELNINSVITTPCHEEI
LPINAWTTQRPYTLRGYSYSGGGKKVTRVEVTLDGGETWQVSTLDHPEKPT
KYGKYWCWCWFSLEVEVLDLLSAKEIAVRAWDETNTQPEKLIWNVMGM
MNNCWFRVKMNVCKPHKGEIGIVFEHPTQPGNQSGGWMakerHLEISAEAP
QTLKKSISTPFMNTASKMYSMSEVRKHSSADSAWIIVHGHYDATRFLKDHP
GGTDSILINAGTDCTEEFDAIHSDKAKKLLDFRIGELITTGYTSDSPGNSVHG
SSSFSSFLAPIKELVPAQRSVALIPREKIPCKLIDKQSISHDVRKFRFALPSEDQV
LGLPVGKHIFLCAVIDDKLCMRAYTPTSTIDEVGYFELVVKIYFKGIHPKFPNG
GQMSQYLD SMPLGSFLDVKGPLGHIEYQGKGNFLVHGKQKFAKKLAMIAGG
TGITPVYQVMQAILKDPEDDTEMYVVYANRTEDDILLKEELDSWAEEKIPERV
KVWYVVQDSIKEGWKYSIGFITEAILREHIPEPSHTTLALACGPPPMIQFAVNP
NLEKMGYDIKDSLLVF

SEQ ID NO: 2 Полінуклеотидна послідовність дикого типу гена нітратредуктази NIA2 з *Nicotiana tabacum*, номер доступу в GenBank X14059. Послідовність, яка виступає як сайт розпізнавання для зв'язування кінази нітратредуктази, відповідальної за фосфорилування амінокислоти S523 NtNIA2, виділена жирним шрифтом і підкресленням.

1 tacatacaag ggcgcgaata aactttttt aaagtaaag tatatgaact tgcaatgaaa
 61 gaggacccta acttgtttgt cttgttgct ttctgcaat ttcaccta cagcccatt
 121 gagattgatt tagttagta taacaattag ttaaatgctt gtgtaattg aagaaaatat
 181 ttggacgtgc tcgctgaaaa cattatact ctatataata gaaatactt ctgaaaagtt
 241 ggtcttggtc aaaaacgtat aagagagttg gtcttctcat aaatagtcac tagctttctg
 301 attttttct acttttata tcacgtaaat aggtactcaa attgatatt tacaccaaac
 361 aaatgaaaat aggatatgtg ttttcatac gtatatfct ctatctact taatgataca
 421 tacatataca tataacctta ctttttgatt actaaaaatt taattatatt taatttggt
 481 aaatatcaga tgccacaaaa catttaccta gccactgtt ttgactacta aaaattaat
 541 tatgtttagc ttgggtaaat atcagatgtc actaaacatt ttacctagcc attctctga
 601 aaagaaattg agaaggaaat tagagttagt ggagccataa taatgtttaa tgtgaccata
 661 actcgggtgaa aaccacggca agaataagaa acagctgtta aggctaacca acagctgcat
 721 atctttaagc catttctat taccacaaca tcgcatctt ctctgatccc gacctacgg
 781 gcgtaaaaag tgtaaatcgt tagaattgtt ttattattt tatgatgtca ctattttta
 841 aaatcaaaat taaattgggg tgctgattt ttgggtcct gcttatgtat agtatggcgc
 901 tatggaggca ctgagagagt ccgaaacgtt tctatataag gccacccac gcattacaa
 961 actcgttcc caaacagaac aagaaaatca aatctcggag agagagagag agaaatatt
 1021 tgagagagaa atacagaaaa tctctcttcc ttcttctt ttttttcaa tccccattca
 1081 tattctttt ttagaataat ctatggcggc atctgtcgaa aacaggcagt tcagtcacct
 1141 agaagccggt ttatcccggt cttcaagcc ccggtctgat tccccggtc gtggctgcaa
 1201 ctcccttcg cccaacagta ctaattcca aaagaaacca aattccacca ttacctga
 1261 ttactcgtcg agtgaagacg acgatgatga tgacgaaaaa aatgagtacc ttcaaatgat

1321 taaaaaagg aattcagagt tagagccatc tgttcacgac actagggacg aaggtaccgc
 1381 tgataattgg attgaacgca acttttccat gattcgtctc accggaaagc atccatttaa
 1441 ctccgaacca ccgttgaacc ggctcatgca ccacggcttt atcacaccgg tcccacttca
 1501 ttacgttcgt aacctggac cggttcccaa gggcacgtgg gatgactgga ccgtggaagt
 1561 cacgggacta gtgaagcgtc ctatgaaatt cacaatggac cagttggta acgaattccc
 1621 ttgtagagaa ttgcccgta cgttgtttg tcttggaat cgaaggaaag aacagaacat
 1681 ggtaaaca accattggt tcaactggg cgcgctgcc gtttcaaca cgatatggcg
 1741 cgggggtacc ctccgcgtt tgctaaacg gtgcggtgt tttagcaaga ataaaggggc
 1801 gettaatgt tcttcgaag gagctgatgt gttgcccgga ggtggtggt caaagtatgg
 1861 aaccagcatt aagaaggaat ttgcaatgga tccagcacga gataatcatg tagcctacat
 1921 gcagaacgga gaaaaattg caccgacca cgggtttcca gtaagaatga taattccagg
 1981 attcattgga ggaagaatg tgaaatgat aaaggaggat atagtcacca ccaagaate
 2041 agacagctat tatcattca aggacaatag agttcttct cccatgttg atgctgaact
 2101 tgcaataacc gaaggtacgt accgtaacta tttaattta ttactccatt tgttccaatt
 2161 tatgtgaacc tatttcttt ttggtcgtt caaaaaagaa tgaaccttt cttaatttgg
 2221 taacaattta gtttaaactt acaactcac ccttaatgag aaactttat aaccacaca
 2281 atacctggg gccatttgg acttgtttag gtcgacaaat tcaaaaagt ttatttttt
 2341 cttaaactt gtgtcagtc aaacaggtc acgtaaattg aaacggagag agtatcatt
 2401 ttattaagg gtataaatat atttaatta gttgagact gcacataca gtaaaatatt
 2461 tctagaata caaatcaac tgaaagctt ctcttaatta tatggtttg aatttctt
 2521 tcaatgaagt aaataaaaag gaaacaatta tattcaacgc atgtaggtat atggtcctgt
 2581 cattatctca aatcaaatg tttaagaca aaggactttg gaaacataga attgtcagct
 2641 ttatagtat ggagtactat attagttagc tgtttgcatc tattcataat tggctctat
 2701 gtgtgcagca tgggtgtaca agccagagta tatcatcaat gagcttaata ttaactctgt
 2761 cattacgac ccgtgtcatg aagaaattt gccaatcaac gctggacga ctacgcacc

2821 ttacacgttg aggggctatt cttattctgg ttagtatttt tataatttcc gattttgctg
 2881 agaatatcat atttcttagt ttgtcgata catcgatcc tctaactctg acgttttact
 2941 tcgtccctat gcaccacctt acgtccctac ttctcagac agtttattga tgaaaactac
 3001 ttactatttt cgacccgata gccctcagcg ccttaattaa atgtgatgtt ttgaaagaga
 3061 tattctctcc cgtctatttt aattaatttt tggtgtttt tatacgtggg aatctatttt
 3121 taacattaat taatatagaa atgaaccata ttaattattt taatttcttc attgaaaata
 3181 caacaaatac tcttcggctc ttactacaat gacaattttg aagaaaaata attaatcct
 3241 tcctaataac tgaaaaatca aatattgttg accataaaaa aaggtaaaaa aattaattaa
 3301 aatgaactgg agagagtaaa ttgaaaaata taattatagc actagtaatt aaagttatta
 3361 gatgtcttct ttaaaaagcg tgtgaaaact ttaaagacga aatataatat gaattattac
 3421 taatacttag aaagtgtcaa taattggtag acaatttaaa ctatatacta gttaaaaagt
 3481 ctgtcaatac aactattagt attggggatt agagagaata gtagtaaaat ggagtaattg
 3541 gacgcatgag ctggggcatg ctgattgctg tcagcttggt tgctaattgtg aaaaagaaaa
 3601 tagtaagaaa aggccacat gggtttgttt attttattat gtggttagtac aaaaaacct
 3661 ggggagcttt cctagttctg aagagtcggt ctttggtagc aaaaaattaa tagtatagta
 3721 taccaagtga atattaaatt caattgtcta aagcacggaa tcttttgac tactttagt
 3781 cctgcatctt ggggtgcctc aacaacacce ttattgaat tattatagta atgttcaata
 3841 taatatacaa ttgaaaaaca ctctaagtg tgactttata tggatctagt caatactatt
 3901 tcttetaaac aacgtgccta attacttccc actttccagt acatgaccac cattaagtt
 3961 aattttgtc aattccttgt gcaattggcc ctcaaatga gcagaagtgt tacgtaggaa
 4021 aactaacttc agctactatt ataggagtaa acctgttagg aaaagatgct cgaggaaactg
 4081 aaaaaacttg tagaataatt agccattgta ttgattgaaa tactgattgt gaacgtgtaa
 4141 caaacaggcg gagggaaaaa agtaacgca gtagaagtga cgttgatgg aggagaaaca
 4201 tggcaagtta gcacactaga tcaccagag aagcccacca aatatggcaa gtactgggt
 4261 tgggtctttt ggtcactcga ggttgaggtg ttagacttgc tcagtgttaa agaaattgct

4321 gttcgagctt gggatgagac cctcaatact caacccgaga agcttatttg gaacgtcatg
 4381 gtacgttcac ttcttctttt acctttattt cttttaactt ctatatacta gcggtgtaaa
 4441 gttattttac accataagti aacttacaaa aatatgtaac tatttatact acgagtgatg
 4501 agggcaagaa ggggtttaag tatttgacaa taaatgtaaa ccctgcaatt ttgttctaa
 4561 tttttatcc ttcaactct ttgtgattgc ttcaattct agattcacag agcacatgtg
 4621 ttacatgcc aaaacaaaaa actacaaaca aaaaaacttt tcactagctt tagtctaaga
 4681 ttcccctttt ttttttggg aggtgtgtgg tccatactcc atagatcaat tccagccact
 4741 gacgtaccaa accctgaaaa ttctagtag ttatagcgac gtacaatcat ttcatattat
 4801 gtaagcagag acgtgatcac atgaactaga tgtgaatacc acttgcccag tccaccaggt
 4861 caattcatct agatgtgtaa atcttgacac cagcactggg tcacttttat aacactagca
 4921 ttaacaaca ttctactct gaacattact tgggctaatt aataagtatt ttttttata
 4981 tactctaaaa attgtaatta cataaatgaa ttaacttat acacgtgac aatgttacta
 5041 attccacttt ttacggacgg ttatctatag aaatcattta ggtgaaacaa ttctcttaca
 5101 ctatgatcag tgttagtaca taatggttat tacattttct aaatattgtg ctatgttgca
 5161 atgttcaggg aatgatgaat aattgctggt tccgagtaaa gatgaatgtg tgcaagcctc
 5221 acaagggaga gattggaata gtgtttgagc atccgactca acctggaaac caatcagggtg
 5281 gatggatggc gaaggagaga catttggaga taccagcaga ggcacctcaa acactaaaga
 5341 agagtatctc aactccattc atgaacacag ctccaagat gtactccatg tccgaggtea
 5401 ggaaacacag ctctgctgac tctgcttga tcatagtcca tggtcataac tatgacgcca
 5461 cgcgtttctt gaaagatcac cctgggtggga ctgacagcat tctcatcaat gctggcactg
 5521 attgcactga ggaatttgat gcaattcatt ctgataaggc taagaagctc ttggaggatt
 5581 tcaggattgg tgaactcata actactggtt acacctctga ctctctggc aactccgtgc
 5641 acggatcttc ttcttcagc agctttctag cacctattaa ggaactgtt ccagcgcaga
 5701 ggagtgtggc cctaattcca agagagaaaa tcccatgcaa actcatcgac aagcaatcca
 5761 tctcccatga tgttaggaaa ttctgatttg cattgccctc tgaggatcaa gtcttgggct

5821 tgcctgttgg aaaacatata ttctctgtg ccgttattga cgataagctc tgcattgcgcg
 5881 cttacacgcc tactagcacg atcgatgagg tggggactct cgagttgggt gtcaagatat
 5941 acttcaaagg aattcacctt aaattcccca atggagggca aatgtcacag tatcttgatt
 6001 ctatgccgtt aggggtcatt ctgcacgtga aagggtccatt aggtcacatt gaataccaag
 6061 gaaagggaaa ttcttagtt catggcaaac agaagtttgc caagaagttg gccatgatag
 6121 cagggtgaac aggaataact ccagtgtatc aagtcattga ggcaattctg aaagatccag
 6181 aagatgacac agaaatgtat gtgggtgatg ctacacagac agaggatgat attttactta
 6241 aggaagagct tgattcatgg gctgagaaaa ttccagagag ggtaaaagt ttgtatgtgg
 6301 ttcaggattc tattaagaa ggatggaagt acagcattgg ttatttaca gaagccattt
 6361 tgagagaaca tatccctgag ccatttcaca caacactggc ttggcttgt ggaccacctc
 6421 ctatgattca atttgcgtt aatccaaact tggagaagat gggctatgac attaaggatt
 6481 ccttattggt gtctaatat taaaaacaaa acaatatctg caggaataaa tttttttt
 6541 cccctatca gttgtacata ttgtatttgg ttatcaccc ccatgtacta cgtagtgtt
 6601 gtatttctta cattttatt tttagaatt ttttaaac ttaggatata aaggtttt
 6661 cttccaacaa agtgattctt tagggaagaa atgtactgta ctgtactagt atgtctaage
 6661 cttccaacaa agtgattctt tagggaagaa atgtactgta ctgtactagt atgtctaage
 6721 cgaaagttgt aatgtttacc atgacaaatt gtattcaatt cctcatggaa tagtaacatt
 6781 gtgttcattg gtcttcctgt aagcgatctt caaaatatca atgtatat atagtaattg
 6841 caaaccattg ttcttttcc cgatgtagt aactactctt tctttagctt ctagtctctg
 6901 gtgaatatat tttttctat aactctttaa ttaatacggc ctfaaataag agaaaagttt
 6961 aaaccacgaa tatcattatg cagacgtata ggtaattaat ctacttttg aaaaaaatc
 7021 tattttctt atgtgtcct tcaaaataat attctagaac cttttgtata ttcccttta
 7081 acttctattt agtttt

- 5 SEQ ID NO: 3 Мутантна поліпептидна послідовність, що кодується геном нітратредуктази NIA2 з *Nicotiana tabacum*. Мутантний поліпептид у сайті розпізнавання для зв'язування кінази нітратредуктази виділений жирним шрифтом і підкресленням.

MAASVENRQFSHLEAGLSRSFKPRSDSPVRGCNFPSPNSTNFQKKPNSTIYLD
 YSSEDDDDDDDEKNEYLQMIKKGNSELEPSVHDTRDEGTADNWIERNFSMIR
 LTGKHPFNSEPPNRLMHHGFITPVPLHYVRNHGPVPGKTWDDWTVEVTGL
 VKRPMKFTMDQLVNEFPCRELPTLV CAGNRRKEQNMVKQTIGFNWGAAA
 VSTTIWRGVPLRALLKRCGVFSKNKGALNVCFEGADVLPGGGGSKYGTSTIKK
 EFAMDPARDIIVAYMQNGEKLAPDHGFPVRMIIPGFIGGRMVKWKRIIVTTQ
 ESDSYHFKDNRVLPPhVDAELANTEAWWYKPEYIINELNINSVITTPCHEEI
 LPINAWTTQRPYTLRGYSYSGGGKKVTRVEVTLDGGETWQVSTLDHPEKPT
 KYGKYWCWCWFSLEVEVLDLLSAKEIAVRAWDETNTQPEKLIWNVMGM
 MNNCWFRVKMNVCKPHKGEIGIVFEHPTQPGNQSGGWMakerHLEISAEAP
 QTLKKSISTPFI⁵NTASKMYSMSEVRKHSSADSAWIVHGHYDATRFLKDHPG
 GTDSILINAGTDCTEEFDAIHSDKAKKLEDFRIGELITTGYTSDSPGNSVHGSS
 SFSSFLAPIKELVPAQRSVALIPREKIPCKLIDKQSISHDVRKFRFALPSEDQVL
 GLPVGKHIFLCAVIDDKLCMRAYTPTSTIDEVGYFELVVKIYFKGIHPKFPNG
 GQMSQYLD SMPLGSFLDVKGPLGHIEYQGKGNFLVHGKQKFAKKLAMIAGG
 TGITPVYQVMQAILKDPEDDTEMYVVYANRTEDDILLKEELDSWAEKIPERV
 KVWYVVQDSIKEGWKYSIGFITEAILREHIPEPSHTTLALACGPPPMIQFAVNP
 NLEKMGYDIKDSL⁵LVF

- 5 SEQ ID NO: 4 Мутантна полінуклеотидна послідовність гена нітратредуктази NIA2 з *Nicotiana tabacum*. Послідовність, яка виступає як сайт розпізнавання для зв'язування кінази нітратредуктази, відповідальної за фосфорилування амінокислоти S523 NtNIA2, виділена жирним шрифтом. Мутація у вигляді заміни g на a виділена нижнім підкресленням.

1 tacatacaag ggcgcgaata aacttttttt aaagtaa⁵atg tatatgaact tgcaatgaaa
 61 gaggacctta acttgtttgt ctttgttget ttctgcaaat ttcaccttaa cageccattt
 121 gagattgatt tagttagtta taacaattag ttaaatgctt gtgtaatttg aagaaaatat
 181 ttggacgtgc tcgctgaaaa cattatactc ctatataata gaaatacttt ctgaaaagtt
 241 ggtcttgttc aaaaacgtat aagagagttg gtcttctcat aaatagtcac tagctttctg
 301 atttttttc actttctata tcacgtaa⁵at aggtactcaa atttgatatt tacaccaaac
 361 aaatgaaaat aggatatgtg ttttcatatc gtatat⁵tat ctatcg⁵tact taatgatata
 421 tacatataca tataacctta ctttttgatt actaaaaatt taattatatt taatttgggt
 481 aaatacaga tgccacaaaa catttaccta gccactgttt ttgactacta aaaattta⁵at

541 tatgttttagc ttgggttaa atcagatgtc actaaacatt ttacctagcc attcctccga
 601 aaagaaattg agaaggaaat tagagttagt ggagccataa taatgtttaa tgtgaccata
 661 actcgggtgaa aaccacggca agaataagaa acagctgtta aggctaacca acagctgcat
 721 atctttaage catttgetat taceccaaca tgecatcttc ctctgatecc gaccctacgg
 781 gcgtaaaaag tgtaaatcgt tagaattgtt ttatttattt tatgatgtca ctatttttta
 841 aaatcaaaat taaattgggg tctcgatttt ttgggtcct gcttatgtat agtatggcgc
 901 tatggaggca ctgagagagt ccgaaacgtt tctatataag gccacccac gcattcacia
 961 attcgttcc caaacagaac aagaaaatca aatctcggag agagagagag agaaatattt
 1021 tgagagagaa atacagaaaa tctctcttcc ttcttctt ttttttcaa tccccattca
 1081 tattttttt ttagaataat ctatggcggc atctgtcgaa aacaggcagt tcagtcacct
 1141 agaagccgggt ttatcccggt ctttcaagcc ccggtctgat tccccgggtc gtggtgcaa
 1201 ctcccttcg cccaacagia ctaatttcca aaagaaacca aattccacca ttaccttga
 1261 ttactcgtcg agtgaagacg acgatgatga tgacgaaaaa aatgagtacc ttcaaagat
 1321 taaaaaaggg aattcagagt tagagccatc tgttcatgac actagggacg aaggtagcgc
 1381 tgataattgg attgaacgca acttttccat gattcgtctc accggaaagc atccatttaa
 1441 ctccgaacca ccgttgaacc ggctcatgca ccacggcttt atcacaccgg tcccacttca
 1501 ttacgttcgt aacctggac cggttcccaa gggcacgtgg gatgactgga ccgtggaagt
 1561 cacgggacta gtgaagcgtc ctatgaaatt cacaatggac cagttgggtt acgaattccc
 1621 tttagagaaa ttgcccggtt cgcttgtttg tgctggcaat cgaaggaaag aacagaacat
 1681 ggtaaaaca accattgggt tcaactgggg cgccgctgcc gtttcaaca cgatatggcg
 1741 cggggtagcc ctccgcgctt tgctaaaacg gtgcggtgtt ttagcaaga ataaaggggc
 1801 gcttaattgt tgcttgaag gagctgatgt gttgcccgga ggtgggtggt caaagtatgg
 1861 aaccagcatt aagaaggaa ttgcaatgga tccagcacga gatatcatcg tagectacat

1921 gcagaacgga gaaaaattgg cacccgacca cgggtttcca gtacgaatga taattccagg
 1981 attcattgga ggaagaatgg tgaaatggat aaagaggatt atagtcacca cccaagaatc
 2041 agacagctat tatcatttca aggacaatag agttcttctt ccccatgttg atgctgaact
 2101 tgcaaatacc gaaggtacgt accgtaacta ttcaattta ttactccatt tgttccaatt
 2161 tatgtgaacc tatttctttt ttggtccgtt caaaaaagaa tgaacccttt ctaaatttgg
 2221 taacaattta gcttaaaactt acaacttcac ccttaatgag aaacttttat aaccacacaa
 2281 ataccctggg gcccatgttg acttggttag gtcgacaaat tccaaaagt ttatttttt
 2341 cttaaacttc gtgtcagtc aaacagggtc acgtaaattg aaacggagag agtatcattt
 2401 ttattaaggg gtataaatat attttaatta gttgagactt gcacatacaa gtaaaatatt
 2461 tcttagaata caaaatcaac tgaaagctta cttctaatta tatggtttg aatttctt
 2521 tcaatgaagt aaataaaaag gaaacaatta tattcaacgc atgtaggat atggctctgt
 2581 cattatctca aatcaaatgg tttaaagaca aaggactttg gaaacataga attgtcagct
 2641 ttatagttat ggagtactat attagttagc tgtttgcac tattcataat tggctctatc
 2701 gtgtgcagca tgggtgtaca agccagagta tatcatcaat gagcttaata ttaactctgt
 2761 cattacgacg ccgtgtcatg aagaaatttt gccaatcaac gcctggacga ctcagcgacc
 2821 ttacacgttg aggggctatt ctattctgg ttagtatttt tatattttcc gattttgctg
 2881 agaatatcat atttcttagt ttgtcgata catcgtatcc tctaactctg acgttttact
 2941 tcgtcttat gcacccactt acgtccttac ttctcagac agttattga tgaaaactac
 3001 ttactatttt cgacccgata gccacagct ccttaattaa atgtgatgtt ttgaaagaga
 3061 tattctctcc cgtctatttt aattaatttt tggctgtttt tatacgtggg aatctatttt
 3121 taacattaat taatatagaa atgaaccata ttaattattat taatttcttc attgaaaata
 3181 caacaaatac tcttcggctc ttactacaat gacaattttg aagaaaaata attaatctct
 3241 tcctaataac tgaaaaatca aatattgttg accataaaaa aaggtaaaaa aattaattaa
 3301 aatgaactgg agagagtaaa ttgaaaaata taattatagc actagtaatt aaagtatta
 3361 gatgtcttct ttaaaaagcg tgtgaaaact ttaaagacga aatataatat gaatattatc
 3421 taatacttag aaagtgtcaa taattggtag acaatttaaa ctatatacta gttaaaaagt

3481 cigtcaatac aactattagt attggggatt agagagaata gtagtaaaat ggagtaattg
 3541 gacgeatgag ctggggcatg ctgattgctg tcagcttggt tgctaattgtg aaaaagaaaa
 3601 tagtaagaaa aggccaacat ggttttgttt attttattat gtggtagtac aaaaaaacct
 3661 ggggagcttt cctagttctg aagagtcggt ctttggtagc aaaaattaa tagtatagta
 3721 taccaagtga atattaaatt caattgtcta aagcacggaa tcttttgac tactttagt
 3781 cctgcatctt gggttgccct aacaacaccc ttattgaat tattatagta atgttcaata
 3841 taatatacaa ttagaaaaca ctctaagtgg tcactttata tggatctagt caatactatt
 3901 tcttctaaac aacgtgccta attacttccc actttccagt acatgaccac cattaagttt
 3961 aattttgtc aattccttgt gcaattggcc ctcaaatga gcagaagtgt tacgtaggaa
 4021 aactaacttc agctactatt ataggagtaa acctgttagg aaaagatgct cgaggaactg
 4081 aaaaacttg tagaataatt agccattgta ttgattgaaa tactgattgt gaacgtgtaa
 4141 caaacaggcg gagggaaaaa agtaacgcga gtagaagtga cgttggtatg aggagaaaca
 4201 tggcaagta gcacactaga tcaccagag aagcccacca aatatggcaa gtactggtgt
 4261 tgggtctttt ggctactcga gggtgaggtg ttgacttgc tcagtctaa agaaattgct
 4321 gttcgagctt gggatgagac cctcaatact caaccgaga agcttatttg gaacgtcatg
 4381 gtacgttcac ttcttcttt acctttattt cttttaactt ctatatacta gcggtgtaaa
 4441 gttattttac accataagtt aacttacaaa aatatgtaac tatttatact acgagtgatg
 4501 agggcaagaa ggggtttaag tatttgacaa taaatgtaa cctgcaatt ttgttctaa
 4561 tttttatcc ttcaactct ttgtgattgc ttattatct agattcacag agcacatgtg
 4621 ttacatgcc aaaacaaaaa actacaaaca aaaaaacttt tcaactagct tagtctaaga
 4681 tcccccttt ttttttggg aggtgtgtgg tccatactcc atagatcaat tccagccact
 4741 gacgtaccaa acctgaaaa ttctagtag ttatagcgac gtacaatcat ttcatattat
 4801 gtaagcagag acgtgatcac atgaactaga tgtgaatacc acttgcccag tccaccaggt
 4861 caattcatct agatgtgtaa atcttgacac cagcactggg tcacttttat aacactagca

4921 tttacaaca tttcactctt gaacattact tgggctaatt aataagtatt ttttttata
 4981 tactctaaaa attgtaatta cataaatgaa tttacttat acacgctgac aatgttacta
 5041 attccacttt ttacggacgg ttatctatag aaatcattta ggtgaaacaa ttctcttaca
 5101 ctatgatcag tgtagtaca taatggttat tacattttct aaatattgtg ctatgttgca
 5161 atgttcaggg aatgatgaat aattgctggt tccgagtaaa gatgaatgtg tgcaagcctc
 5221 acaagggaga gattggaata gtgtttgagc atccgactca acctggaaac caatcaggtg
 5281 gatggatggc gaaggagaga catttggaga taccagcaga ggcacctcaa acactaaaga
 5341 agagtatctc aactccattc **ataaacacag** ctccaagat gtactccatg tccgaggcca
 5401 ggaaacacag ctctgctgac tctgcttggg tcatagtcca tggatcatc tatgacgcca
 5461 cgcgtttctt gaaagatcac cctggtggga ctgacagcat tctcatcaat gctggcactg
 5521 attgcaactg ggaattgat gcaattcatt ctgataaggc taagaagctc ttggaggatt
 5581 tcaggattgg tgaactcata actactggtt acacctctga ctctcctggc aactccgtgc
 5641 acggatcttc ttcttcagc agctttctag cacctattaa ggaacttgtt ccagcgcaga
 5701 ggagtgtggc cctaattcca agagagaaaa tcccatgcaa actcatcgac aagcaatcca
 5761 tctcccatga tgtaggaaa ttctgatttg cattgccttc tgaggatcaa gtcttgggct
 5821 tgcctgttgg aaaacatact ttctctgtg ccgttatga cgataagctc tgcctgcgag
 5881 ctacacgcc tactagcagc atcgatgagg tggggtactt cgagttggtt gtcaagatat
 5941 actcaaaagg aattcacctt aaattcccca atggagggca aatgtcacag tatcttgatt
 6001 ctatgccgtt aggttcattt ctgacgtga aaggtccatt aggtcacatt gaataccaag
 6061 gaaagggaaa ttcttagtt catggcaaac agaagtttgc caagaagttg gccatgatag
 6121 caggtggaac aggaataact ccagtgtatc aagtcatgca ggcaattctg aaagatccag
 6181 aagatgacac agaaatgtat gtggtgtatg ctaacagaac agaggatgat attttactta
 6241 aggaagagct tgattcatgg gctgagaaaa ttccagagag ggttaaagtt tggtatgtgg
 6301 ttcaggattc tattaagaa ggatggaagt acagcattgg ttatttaca gaagccattt

6361 tgagagaaca tatccctgag ccattcaca caacactggc ttggcttgt ggaccacctc
 6421 ctatgattca atttctgtt aatccaaact tggagaagat gggctatgac attaaggatt
 6481 ccttattggt gttctaattt taaaaacaaa acaatatctg caggaataaa tttttttt
 6541 cccctatca gttgtacata ttgtatttgg ttatcaccc ccatgtacta cgtagtgtt
 6601 gtagttctta catttttatt ttttagaatt ttttaaacc ttaggataata aaggttttct
 6661 ctccaacaa agtgattctt tagggaagaa atgtactgta ctgtactagt atgtctaagc
 6721 cgaaagtgtt aatgtttacc atgacaaatt gtattcaatt cctcatggaa tagtaacatt
 6781 gtgttcattg gtcttctgt aagegatctt caaaatatca atgtatatat atagtaattg
 6841 caaacattg ttcttttcc cgatgtagt aactactctt tctttagctt ctagtctctg
 6901 gtgaatattt tttttctat aactctttaa ttaatacggc cttaaataag agaaaagt
 6961 aaaccacgaa tatcattatg cagacgtata ggtaattaat ctacttttg aaaaaaatc
 7021 tattttctt atgtggctct tcaaaataat attctagaac cttttgtata ttcccttta
 7081 acttctattt agttt

- 5 SEQ ID NO: 5 Поліпептидна послідовність, що виступає як сайт розпізнавання для зв'язування кінази нітратредуктази, відповідальної за фосфорилування амінокислоти S523 NtNIA2, з поліпептидної послідовності дикого типу, що кодується геном нітратредуктази NIA2 з *Nicotiana tabacum*, номер доступу в GenBank X14059
 LK(K або R)(S або T)(I, або V, або A)S(T або S)PFM
- 10 SEQ ID NO: 6 Мутантна поліпептидна послідовність під SEQ ID NO: 5.
 LK(K або R)(S або T)(I, або V, або A)S(T або S)PF1
- SEQ ID NO: 7. Поліпептидна послідовність дикого типу, що виступає як сайт розпізнавання для зв'язування кінази нітратредуктази, відповідальної за фосфорилування амінокислоти S523 NtNIA2, з поліпептидної послідовності, що кодується геном нітратредуктази N1A2 з *Nicotiana tabacum*, номер доступу в GenBank X14059.
- 15 LKKSISTPFM
 SEQ ID NO: 8 (Мутантна поліпептидна послідовність під SEQ ID NO; 7).
 LKKSISTPFI

Таблиця 1

Докладна інформація про мутацію M527I NtNIA2

Мутація	Послідовність, що розташована перед мутацією	Послідовність, що розташована після мутації	Початковий кодон	Початкова амінокислота	Кодон після мутації	Амінокислота після мутації
M 527I	ctccattcat	aacacagctt	atG	Met	atA	Ile

- 20 Показана інформація про послідовність для мутації M527I NtNIA2. У другому й третьому стовпцях показано 10 нуклеотидів, що розташовані безпосередньо перед мутним нуклеотидом, і 10 нуклеотидів, що розташовані після мутантного нуклеотиду. у четвертому й п'ятому стовпцях наведені вихідний кодон і амінокислота (відповідно) відповідно до послідовності дикого типу, в останніх двох стовпцях наведені вихідний кодон і амінокислота (відповідно) у мутантній послідовності. Жирним шрифтом і підкресленням виділена мутація за типом заміни G на A.
- 25

Докладна інформація про специфічні праймери для NtNIA2

Праймер	Послідовність від 5' до 3'
Прямий NIA2	CCACTTTTTACGGACGGTTATCT
Зворотний NIA2	GCAAATCGAAATTTCTAACATCAT

Наведена докладна інформація про послідовність специфічних праймерів для NtNIA2. У другому стовпці вказані послідовності ДНК праймерів.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Філіп Морріс Продуктс С.А.

<120>

МОДУЛЮВАННЯ РІВНІВ НІТРАТІВ У РОСЛИНАХ ЗА ДОПОМОГОЮ МУТАЦІЇ

НІТРАТРЕДУКТАЗИ

<130> P10597EP

<160> 13

<170> версія PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 904

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 1

```

Met Ala Ala Ser Val Glu Asn Arg Gln Phe Ser His Leu Glu Ala Gly
1          5          10          15

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

Asn Phe Pro Ser Pro Asn Ser Thr Asn Phe Gln Lys Lys Pro Asn Ser
          35          40          45

Thr Ile Tyr Leu Asp Tyr Ser Ser Ser Glu Asp Asp Asp Asp Asp
50          55          60

Glu Lys Asn Glu Tyr Leu Gln Met Ile Lys Lys Gly Asn Ser Glu Leu
65          70          75          80

Glu Pro Ser Val His Asp Thr Arg Asp Glu Gly Thr Ala Asp Asn Trp
          85          90          95

Ile Glu Arg Asn Phe Ser Met Ile Arg Leu Thr Gly Lys His Pro Phe
          100         105         110

Asn Ser Glu Pro Pro Leu Asn Arg Leu Met His His Gly Phe Ile Thr
          115         120         125

Pro Val Pro Leu His Tyr Val Arg Asn His Gly Pro Val Pro Lys Gly
130         135         140

Thr Trp Asp Asp Trp Thr Val Glu Val Thr Gly Leu Val Lys Arg Pro
145         150         155         160

Met Lys Phe Thr Met Asp Gln Leu Val Asn Glu Phe Pro Cys Arg Glu
          165         170         175

Leu Pro Val Thr Leu Val Cys Ala Gly Asn Arg Arg Lys Glu Gln Asn
          180         185         190

Met Val Lys Gln Thr Ile Gly Phe Asn Trp Gly Ala Ala Ala Val Ser
          195         200         205

Thr Thr Ile Trp Arg Gly Val Pro Leu Arg Ala Leu Leu Lys Arg Cys
210         215         220

Gly Val Phe Ser Lys Asn Lys Gly Ala Leu Asn Val Cys Phe Glu Gly
225         230         235         240

```

Ala Asp Val Leu Pro Gly Gly Gly Gly Ser Lys Tyr Gly Thr Ser Ile
245 250 255

Lys Lys Glu Phe Ala Met Asp Pro Ala Arg Asp Ile Ile Val Ala Tyr
260 265 270

Met Gln Asn Gly Glu Lys Leu Ala Pro Asp His Gly Phe Pro Val Arg
275 280 285

Met Ile Ile Pro Gly Phe Ile Gly Gly Arg Met Val Lys Trp Ile Lys
290 295 300

Arg Ile Ile Val Thr Thr Gln Glu Ser Asp Ser Tyr Tyr His Phe Lys
305 310 315 320

Asp Asn Arg Val Leu Pro Pro His Val Asp Ala Glu Leu Ala Asn Thr
325 330 335

Glu Ala Trp Trp Tyr Lys Pro Glu Tyr Ile Ile Asn Glu Leu Asn Ile
340 345 350

Asn Ser Val Ile Thr Thr Pro Cys His Glu Glu Ile Leu Pro Ile Asn
355 360 365

Ala Trp Thr Thr Gln Arg Pro Tyr Thr Leu Arg Gly Tyr Ser Tyr Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Lys Lys Val Thr Arg Val Glu Val Thr Leu Asp Gly Gly
385 390 395 400

Glu Thr Trp Gln Val Ser Thr Leu Asp His Pro Glu Lys Pro Thr Lys
405 410 415

Tyr Gly Lys Tyr Trp Cys Trp Cys Phe Trp Ser Leu Glu Val Glu Val
420 425 430

Leu Asp Leu Leu Ser Ala Lys Glu Ile Ala Val Arg Ala Trp Asp Glu
435 440 445

Thr Leu Asn Thr Gln Pro Glu Lys Leu Ile Trp Asn Val Met Gly Met
450 455 460

Met Asn Asn Cys Trp Phe Arg Val Lys Met Asn Val Cys Lys Pro His
465 470 475 480

Lys Gly Glu Ile Gly Ile Val Phe Glu His Pro Thr Gln Pro Gly Asn
485 490 495

Gln Ser Gly Gly Trp Met Ala Lys Glu Arg His Leu Glu Ile Ser Ala
500 505 510

Glu Ala Pro Gln Thr Leu Lys Lys Ser Ile Ser Thr Pro Phe Met Asn
515 520 525

Thr Ala Ser Lys Met Tyr Ser Met Ser Glu Val Arg Lys His Ser Ser
530 535 540

Ala Asp Ser Ala Trp Ile Ile Val His Gly His Ile Tyr Asp Ala Thr
545 550 555 560

Arg Phe Leu Lys Asp His Pro Gly Gly Thr Asp Ser Ile Leu Ile Asn
565 570 575

Ala Gly Thr Asp Cys Thr Glu Glu Phe Asp Ala Ile His Ser Asp Lys
580 585 590

Ala Lys Lys Leu Leu Glu Asp Phe Arg Ile Gly Glu Leu Ile Thr Thr
595 600 605

Gly Tyr Thr Ser Asp Ser Pro Gly Asn Ser Val His Gly Ser Ser Ser
610 615 620

Phe Ser Ser Phe Leu Ala Pro Ile Lys Glu Leu Val Pro Ala Gln Arg
625 630 635 640

Ser Val Ala Leu Ile Pro Arg Glu Lys Ile Pro Cys Lys Leu Ile Asp
645 650 655

Lys Gln Ser Ile Ser His Asp Val Arg Lys Phe Arg Phe Ala Leu Pro
660 665 670

Ser Glu Asp Gln Val Leu Gly Leu Pro Val Gly Lys His Ile Phe Leu
675 680 685

Cys Ala Val Ile Asp Asp Lys Leu Cys Met Arg Ala Tyr Thr Pro Thr
690 695 700

Ser Thr Ile Asp Glu Val Gly Tyr Phe Glu Leu Val Val Lys Ile Tyr
705 710 715 720

Phe Lys Gly Ile His Pro Lys Phe Pro Asn Gly Gly Gln Met Ser Gln
725 730 735

Tyr Leu Asp Ser Met Pro Leu Gly Ser Phe Leu Asp Val Lys Gly Pro
740 745 750

Leu Gly His Ile Glu Tyr Gln Gly Lys Gly Asn Phe Leu Val His Gly
755 760 765

Lys Gln Lys Phe Ala Lys Lys Leu Ala Met Ile Ala Gly Gly Thr Gly
770 775 780

Ile Thr Pro Val Tyr Gln Val Met Gln Ala Ile Leu Lys Asp Pro Glu
785 790 795 800

Asp Asp Thr Glu Met Tyr Val Val Tyr Ala Asn Arg Thr Glu Asp Asp
805 810 815

Ile Leu Leu Lys Glu Glu Leu Asp Ser Trp Ala Glu Lys Ile Pro Glu
820 825 830

Arg Val Lys Val Trp Tyr Val Val Gln Asp Ser Ile Lys Glu Gly Trp
835 840 845

Lys Tyr Ser Ile Gly Phe Ile Thr Glu Ala Ile Leu Arg Glu His Ile
850 855 860

Pro Glu Pro Ser His Thr Thr Leu Ala Leu Ala Cys Gly Pro Pro Pro
865 870 875 880

Met Ile Gln Phe Ala Val Asn Pro Asn Leu Glu Lys Met Gly Tyr Asp
885 890 895

Ile Lys Asp Ser Leu Leu Val Phe
900

<210> 2

<211> 7096

<212> ДНК

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 2

tacatacaag ggcgcgaata aacttttttt aaagtaaag tatatgaact tgcaatgaaa	60
gaggacctta acttggttgt ctttggtgct ttctgcaaat ttcaccttaa cagcccat	120
gagattgatt tagttagtta taacaattag ttaaagctt gtgtaatttg aagaaaatat	180
ttggacgtgc tcgctgaaaa cattatactc ctatataata gaaatacttt ctgaaaagtt	240
ggtcttggtc aaaaacgtat aagagagttg gtcttctcat aaatagtcac tagctttctg	300
attttttttc actttctata tcacgtaaat aggtactcaa atttgatatt tacacaaac	360
aatgaaaaat aggatatgtg tttttcatac gtatatatt ctatcgtact taatgatata	420
tacatatata tataacctta ctttttgatt actaaaaatt taattatatt taatttgggt	480
aaatatcaga tgccacaaaa catctaccta gccactgttt ttgactacta aaaattta	540
tatgttttagc ttgggtaaat atcagatgtc actaaacatt ttacctagcc attcctccga	600
aaagaaattg agaaggaaat tagagtagt ggagccataa taatgtttta tgtgaccata	660
actcgttgaa aaccacggca agaataagaa acagctgtta aggctaacca acagctgcat	720
atctttaagc catttctat taccacaaca tcgcatcttc ctctgatccc gacctacgg	780
gcgtaaaaag tgtaaatcgt tagaattggt ttatttatt tatgatgtca ctatttttta	840
aatcaaaat taaattgggg tgcgatttt ttgggtcct gcttatgtat agtatggcgc	900
tatggaggca ctgagagagt ccgaaacgtt tctatataag gccacccac gcattcaca	960
acttcgttc caaacagaa aagaaaatca aatctcggag agagagagag agaaatatt	1020
tgagagagaa atacagaaaa tctctcttc tcttttctt tttttttcaa tccccattca	1080
tattcttttt ttagaataat ctatggcggc atctgtcgaa aacaggcagt tcagtcacct	1140
agaagccggt ttatcccggt ctttcaagcc ccggtctgat tccccggtc gtggctgcaa	1200
cttcccttcg cccaacagta ctaatttcca aaagaaacca aattccacca ttaccttga	1260
ttactcgtcg agtgaagacg acgatgatga tgacgaaaaa aatgagtacc ttcaaatgat	1320
taaaaaagg aattcagagt tagagccatc tgttcatgac actagggacg aagggtaccgc	1380
tgataattgg attgaacgca acttttccat gattcgtctc accggaaagc atccatttaa	1440
ctccgaacca ccgttgaacc ggctcatgca ccacggcttt atcacaccg tcccatttca	1500
ttacgttcgt aacctggac cggttcccaa gggcacgtgg gatgactgga ccgtggaagt	1560
cacgggacta gtgaagcgtc ctatgaaatt cacaatggac cagttgggtta acgaattccc	1620
ttgtagagaa ttgcccgta cgttgtttg tgctggcaat cgaaggaaag aacagaacat	1680
ggttaaaca accattgggt tcaactgggg cgcgctgcc gtttcaaca cgatatggcg	1740
cggggtacc ctccgcgtt tgctaaaacg gtgcgggtgt ttagcaaga ataaaggggc	1800

gcttaatgtt tgcttcgaag gagctgatgt gttgcccgga ggtggtggtt caaagtatgg	1860
aaccagcatt aagaaggaat ttgcaatgga tccagcacga gatatcatcg tagcctacat	1920
gcagaacgga gaaaaattgg cacccgacca cgggtttcca gtacgaatga taattccagg	1980
attcattgga ggaagaatgg tgaaatggat aaagaggatt atagtcacca cccaagaatc	2040
agacagctat tatcatttca aggacaatag agttcttctt ccccatgttg atgctgaact	2100
tgcaaatacc gaaggtagct accgtaacta tttcaattta ttactccatt tgttccaatt	2160
tatgtgaacc tatttctctt ttggtccgtt caaaaaagaa tgaacccttt ctaaatttgg	2220
taacaattta gcttaaaactt acaacttcac ccttaatgag aaacttttat aaccacacaa	2280
ataccctggg gccatttgg acttgtttag gtcgacaaat tccaaaagtt ttattttttt	2340
cttaaaactt gtgctcagtc aaacagggtt acgtaaattg aaacggagag agtatcattt	2400
ttattaaggg gtataaatat attttaatta gttgagactt gcacatacaa gtaaaatatt	2460
tcttagaata caaaatcaac tgaaagctta cttctaatta tatgggtttg aattttctct	2520
tcaatgaagt aaataaaaag gaaacaatta tattcaacgc atgtaggtat atggctctgt	2580
cattatctca aatcaaatgg tttaaagaca aaggactttg gaaacataga attgtcagct	2640
ttatagttat ggagtactat attagtttagc tgtttgcac tattcataat tggctctatc	2700
gtgtgcagca tgggtgtaca agccagagta tatcatcaat gagcttaata ttaactctgt	2760
cattacgacg cctgtcatg aagaaatttt gccaat AAC gcctggacga ctacgagacc	2820
ttacacgttg aggggtatt cttattcttg ttagtatttt tataattttcc gattttgctg	2880
agaatatcat atttcttagt ttgttcgata catcgatatc tctaactctg acgttttact	2940
tcgtctttat gcaccactt acgtctctac tttctcagac agtttattga tgaaaaactac	3000
ttactatttt cgaccgata gcctcagcgt ccttaattaa atgtgatgtt ttgaaagaga	3060
tattctctcc cgtctatttt aattaatttt tggctgtttt tatacgtggg aatctatttt	3120
taacattaat taatatagaa atgaaccata ttaatatatt taatttcttc attgaaaata	3180
caacaaatac tcttcggctc ttactacaat gacaattttg aagaaaaata attaatctct	3240
tcctaataatc tgaaaaatca aatattgtgg accataaaaa aagggtcaaaa aattaattaa	3300
aatgaactgg agagagttaa ttagaaaata taattatagc actagtaatt aaagtatta	3360
gatgtcttct ttaaaaagcg tgtgaaaact ttaaagacga aatataatat gaatattatc	3420
taataacttag aaagtgtcaa taattggtag acaatttaaa ctatatacta gttaaaaagt	3480
ctgtcaatac aactattagt attggggatt agagagaata gtagtaaaat ggagtaattg	3540
gacgcatgag cttgggcatg ctgattgctg tcagcttggt tgctaattgtg aaaaagaaaa	3600
tagtaagaaa aggccaacat ggttttgttt attttattat gtggtagtac acaaaaacct	3660
ggggagcttt cctagttctg aagagtcggt ctttggttagc acaaaattaa tagtatagta	3720

taccaagtga atattaaatt caattgtcta aagcacggaa tctttttgac tacttttagtt	3780
cctgcatctt ggggttgctc aacaacaccc tttattgaat tattatagta atgttcaata	3840
taatatacaa ttagaaaaca ctctaagtgg tcactttata tggatctagt caatactatt	3900
tcttctaaac aacgtgccta attacttccc actttccagt acatgaccac cattaagttt	3960
aattttttgtc aattccttgt gcaattggcc cttcaaata gacagaagtgt tacgtaggaa	4020
aactaacttc agctactatt ataggagtaa acctgttagg aaaagatgct cgaggaactg	4080
acaaaacttg tagaataatt agccattgta ttgattgaaa tactgattgt gaacgtgtaa	4140
caaacaggcg gagggaaaaa agtaacgcga gtagaagtga cgttggatgg aggagaaaca	4200
tggcaagtta gcacactaga tcacccagag aagcccacca aatatggcaa gtactgggtgt	4260
tgggtgctttt ggctactcga gggttgagggtg ttagacttgc tcagtgtctaa agaaattgct	4320
gttcgagctt gggatgagac cctcaatact caaccgcaga agcttatttg gaacgtcatg	4380
gtacgttcac ttcttctttt acctttattt cttttaactt ctatatacta gcggtgtaaa	4440
gttatttttac accataagtt aacttacaaa aatatgtaac tatttatact acgagtgtatg	4500
agggcaagaa ggggtttaag tatttgacaa taaatgtaaa ccctgcaatt ttgttcttaa	4560
ttttttatcc tttcaactct ttgtgattgc ttcattatct agattcacag agcacatgtg	4620
ttcacatgcc aaaacaaaaa actacaaaca aaaaaacttt tcactagctt tagtctaaga	4680
ttcccccttt tttttttggg aggtgtgtgg tccatactcc atagatcaat tccagccact	4740
gacgtaccaa accctgaaaa ttcttagtag ttatagcgac gtacaatcat ttcatattat	4800
gtaagcagag acgtgatcac atgaactaga tgtgaatacc acttgcccag tccaccaggt	4860
caattcatct agatgtgtaa atcttgacac cagcactggg tcacttttat aacactagca	4920
tttaacaaca ttctatctt gaacattact tgggctaatt aataagtatt tttttttata	4980
tactctaaaa attgtaatta cataaatgaa tttaacttat acacgtgac aatgttacta	5040
attccacttt ttacggacgg ttatctatag aaatcattta ggtgaaacaa ttctcttaca	5100
ctatgatcag tgttagtaca taatggttat tacattttct aaatattgtg ctatgttgca	5160
atgttcaggg aatgatgaat aattgctggg tccgagtaaa gatgaatgtg tgcaagcctc	5220
acaagggaga gattggaata gtgtttgagc atccgactca acctggaaac caatcaggtg	5280
gatggatggc gaaggagaga catttggaaga tatcagcaga ggcacctcaa aactaaaga	5340
agagtatctc aactccattc atgaacacag ctccaagat gtactccatg tccgaggtca	5400
ggaaacacag ctctgctgac tctgcttggg tcatagteca tggatcatatc tatgacgcc	5460
cgcgtttctt gaaagatcac cctgggtggg ctgacagcat tctcatcaat gctggcactg	5520
attgcactga ggaatttgat gcaattcatt ctgataaggc taagaagctc ttggaggatt	5580
tcaggattgg tgaactcata actactgggt acacctctga ctctctggc aactccgtgc	5640

```

acggatcttc ttccttcagc agctttctag cacctattaa ggaacttggt ccagcgcaga 5700
ggagtgtggc cctaattcca agagagaaaa tcccatgcaa actcatcgac aagcaatcca 5760
tctcccatga tgtaggaaa ttctgatttg cattgccttc tgaggatcaa gtcttgggct 5820
tgctgttgg aaaacatata ttcctctgtg ccgttattga cgataagctc tgcattgcgcg 5880
cttacacgcc tactagcagc atcgatgagg tggggtactt cgagttgggt gtcaagatat 5940
acttcaaagg aattcaccct aaattcccca atggagggca aatgtcacag tatcttgatt 6000
ctatgccgtt agggtcattt ctgcacgtga aagggtcatt aggtcacatt gaataccaag 6060
gaaagggaaa tttcttagtt catggcaaac agaagtttgc caagaagttg gccatgatag 6120
caggtggaac aggaataact ccagtgtatc aagtcatgca ggcaattctg aaagatccag 6180
aagatgacac agaaatgtat gtggtgtatg ctaacagaac agaggatgat attttactta 6240
aggaagagct tgattcatgg gctgagaaaa ttccagagag ggttaaagtt tggtatgtgg 6300
ttcaggattc tattaaagaa ggatggaagt acagcattgg ttttattaca gaagccattt 6360
tgagagaaca tatccctgag ccattctaca caacactggc tttggcttgt ggaccacctc 6420
ctatgattca atttctgtgt aatccaaact tggagaagat gggctatgac attaaggatt 6480
ccttatttgt gttctaattt taaaaacaaa acaatatctg caggaataaa tttttttttt 6540
ccccctatca gttgtacata ttgtatttgg tttatcacc ccatgtacta cgtagtgttt 6600
gtagtcttta cttttttatt ttttagaatt tttttaaac ttaggatata aaggttttct 6660
cttccaacaa agtgattctt tagggaagaa atgtactgta ctgtactagt atgtctaagc 6720
cgaaagttgt aatgtttacc atgacaaatt gtattcaatt cctcatggaa tagtaacatt 6780
gtgttcatgt gtcttctgt aagcgatctt caaaatatca atgtatatat atagtaattg 6840
caaaccattg ttccttttcc cgatgtagtt aactactctt tctttagctt ctagtctctg 6900
gtgaatattt tttttctat aactctttaa ttaatacggc cttaaataag agaaaagttt 6960
aaaccacgaa tatcattatg cagacgtata ggtaattaat ctactttttg aaaaaaatc 7020
tattttcttt atgtggctct tcaaaataat attctagaac cttttgtata ttccctttta 7080
acttctattt agtttt 7096

```

```

<210> 3
<211> 904
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

```

```

<400> 3

```

```

Met Ala Ala Ser Val Glu Asn Arg Gln Phe Ser His Leu Glu Ala Gly
1           5           10           15
Leu Ser Arg Ser Phe Lys Pro Arg Ser Asp Ser Pro Val Arg Gly Cys
                20           25           30

```

Asn Phe Pro Ser Pro Asn Ser Thr Asn Phe Gln Lys Lys Pro Asn Ser
 35 40 45
 Thr Ile Tyr Leu Asp Tyr Ser Ser Ser Glu Asp Asp Asp Asp Asp
 50 55 60
 Glu Lys Asn Glu Tyr Leu Gln Met Ile Lys Lys Gly Asn Ser Glu Leu
 65 70 75 80
 Glu Pro Ser Val His Asp Thr Arg Asp Glu Gly Thr Ala Asp Asn Trp
 85 90 95
 Ile Glu Arg Asn Phe Ser Met Ile Arg Leu Thr Gly Lys His Pro Phe
 100 105 110
 Asn Ser Glu Pro Pro Leu Asn Arg Leu Met His His Gly Phe Ile Thr
 115 120 125
 Pro Val Pro Leu His Tyr Val Arg Asn His Gly Pro Val Pro Lys Gly
 130 135 140
 Thr Trp Asp Asp Trp Thr Val Glu Val Thr Gly Leu Val Lys Arg Pro
 145 150 155 160
 Met Lys Phe Thr Met Asp Gln Leu Val Asn Glu Phe Pro Cys Arg Glu
 165 170 175
 Leu Pro Val Thr Leu Val Cys Ala Gly Asn Arg Arg Lys Glu Gln Asn
 180 185 190
 Met Val Lys Gln Thr Ile Gly Phe Asn Trp Gly Ala Ala Ala Val Ser
 195 200 205
 Thr Thr Ile Trp Arg Gly Val Pro Leu Arg Ala Leu Leu Lys Arg Cys
 210 215 220
 Gly Val Phe Ser Lys Asn Lys Gly Ala Leu Asn Val Cys Phe Glu Gly
 225 230 235 240
 Ala Asp Val Leu Pro Gly Gly Gly Gly Ser Lys Tyr Gly Thr Ser Ile
 245 250 255
 Lys Lys Glu Phe Ala Met Asp Pro Ala Arg Asp Ile Ile Val Ala Tyr
 260 265 270
 Met Gln Asn Gly Glu Lys Leu Ala Pro Asp His Gly Phe Pro Val Arg
 275 280 285
 Met Ile Ile Pro Gly Phe Ile Gly Gly Arg Met Val Lys Trp Ile Lys
 290 295 300
 Arg Ile Ile Val Thr Thr Gln Glu Ser Asp Ser Tyr Tyr His Phe Lys
 305 310 315 320
 Asp Asn Arg Val Leu Pro Pro His Val Asp Ala Glu Leu Ala Asn Thr
 325 330 335
 Glu Ala Trp Trp Tyr Lys Pro Glu Tyr Ile Ile Asn Glu Leu Asn Ile
 340 345 350
 Asn Ser Val Ile Thr Thr Pro Cys His Glu Glu Ile Leu Pro Ile Asn
 355 360 365
 Ala Trp Thr Thr Gln Arg Pro Tyr Thr Leu Arg Gly Tyr Ser Tyr Ser

370		375		380
Gly Gly Gly Lys Lys Val Thr Arg Val Glu Val Thr Leu Asp Gly Gly				
385		390		395 400
Glu Thr Trp Gln Val Ser Thr Leu Asp His Pro Glu Lys Pro Thr Lys				
	405		410	415
Tyr Gly Lys Tyr Trp Cys Trp Cys Phe Trp Ser Leu Glu Val Glu Val				
	420		425	430
Leu Asp Leu Leu Ser Ala Lys Glu Ile Ala Val Arg Ala Trp Asp Glu				
	435		440	445
Thr Leu Asn Thr Gln Pro Glu Lys Leu Ile Trp Asn Val Met Gly Met				
	450		455	460
Met Asn Asn Cys Trp Phe Arg Val Lys Met Asn Val Cys Lys Pro His				
	465		470	475 480
Lys Gly Glu Ile Gly Ile Val Phe Glu His Pro Thr Gln Pro Gly Asn				
	485		490	495
Gln Ser Gly Gly Trp Met Ala Lys Glu Arg His Leu Glu Ile Ser Ala				
	500		505	510
Glu Ala Pro Gln Thr Leu Lys Lys Ser Ile Ser Thr Pro Phe Ile Asn				
	515		520	525
Thr Ala Ser Lys Met Tyr Ser Met Ser Glu Val Arg Lys His Ser Ser				
	530		535	540
Ala Asp Ser Ala Trp Ile Ile Val His Gly His Ile Tyr Asp Ala Thr				
	545		550	555 560
Arg Phe Leu Lys Asp His Pro Gly Gly Thr Asp Ser Ile Leu Ile Asn				
	565		570	575
Ala Gly Thr Asp Cys Thr Glu Glu Phe Asp Ala Ile His Ser Asp Lys				
	580		585	590
Ala Lys Lys Leu Leu Glu Asp Phe Arg Ile Gly Glu Leu Ile Thr Thr				
	595		600	605
Gly Tyr Thr Ser Asp Ser Pro Gly Asn Ser Val His Gly Ser Ser Ser				
	610		615	620
Phe Ser Ser Phe Leu Ala Pro Ile Lys Glu Leu Val Pro Ala Gln Arg				
	625		630	635 640
Ser Val Ala Leu Ile Pro Arg Glu Lys Ile Pro Cys Lys Leu Ile Asp				
	645		650	655
Lys Gln Ser Ile Ser His Asp Val Arg Lys Phe Arg Phe Ala Leu Pro				
	660		665	670
Ser Glu Asp Gln Val Leu Gly Leu Pro Val Gly Lys His Ile Phe Leu				
	675		680	685
Cys Ala Val Ile Asp Asp Lys Leu Cys Met Arg Ala Tyr Thr Pro Thr				
	690		695	700
Ser Thr Ile Asp Glu Val Gly Tyr Phe Glu Leu Val Val Lys Ile Tyr				
	705		710	715 720

Phe Lys Gly Ile His Pro Lys Phe Pro Asn Gly Gly Gln Met Ser Gln
 725 730 735
 Tyr Leu Asp Ser Met Pro Leu Gly Ser Phe Leu Asp Val Lys Gly Pro
 740 745 750
 Leu Gly His Ile Glu Tyr Gln Gly Lys Gly Asn Phe Leu Val His Gly
 755 760 765
 Lys Gln Lys Phe Ala Lys Lys Leu Ala Met Ile Ala Gly Gly Thr Gly
 770 775 780
 Ile Thr Pro Val Tyr Gln Val Met Gln Ala Ile Leu Lys Asp Pro Glu
 785 790 795 800
 Asp Asp Thr Glu Met Tyr Val Val Tyr Ala Asn Arg Thr Glu Asp Asp
 805 810 815
 Ile Leu Leu Lys Glu Glu Leu Asp Ser Trp Ala Glu Lys Ile Pro Glu
 820 825 830
 Arg Val Lys Val Trp Tyr Val Val Gln Asp Ser Ile Lys Glu Gly Trp
 835 840 845
 Lys Tyr Ser Ile Gly Phe Ile Thr Glu Ala Ile Leu Arg Glu His Ile
 850 855 860
 Pro Glu Pro Ser His Thr Thr Leu Ala Leu Ala Cys Gly Pro Pro Pro
 865 870 875 880
 Met Ile Gln Phe Ala Val Asn Pro Asn Leu Glu Lys Met Gly Tyr Asp
 885 890 895
 Ile Lys Asp Ser Leu Leu Val Phe
 900

<210> 4

<211> 7096

<212> ДНК

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 4

tacatacaag ggcgcgaata aacttttttt aaagtaaag tatatgaact tgcaatgaaa
 gaggacctta acttgtttgt ctttggtgct ttctgcaaat ttcaccttaa cagccccatt
 gagattgatt tagttagtta taacaattag ttaaagctt gtgtaatttg aagaaaatat
 ttggacgtgc tcgctgaaaa cattatactc ctatataata gaaatacttt ctgaaaagtt
 ggtcttggtc aaaaacgtat aagagagttg gtcttctcat aaatagtcac tagctttctg
 attttttttc actttctata tcacgtaaat aggtactcaa atttgatatt tacaccaaac
 aaatgaaaat aggatatgtg tttttcatac gtatatatt ctatcgtact taatgatata
 tacatataca tataacctta ctttttgatt actaaaaaatt taattatatt taatttgggt
 aaatatcaga tgccacaaaa catttaccta gccactgttt ttgactacta aaaatttaatt
 tatgttttagc ttgggtaaat atcagatgtc actaaacatt ttacctagcc attcctccga
 aaagaaattg agaaggaaat tagagttagt ggagccataa taatgtttta tgtgaccata

Phe Lys Gly Ile His Pro Lys Phe Pro Asn Gly Gly Gln Met Ser Gln
725 730 735

Tyr Leu Asp Ser Met Pro Leu Gly Ser Phe Leu Asp Val Lys Gly Pro
740 745 750

Leu Gly His Ile Glu Tyr Gln Gly Lys Gly Asn Phe Leu Val His Gly
755 760 765

Lys Gln Lys Phe Ala Lys Lys Leu Ala Met Ile Ala Gly Gly Thr Gly
770 775 780

Ile Thr Pro Val Tyr Gln Val Met Gln Ala Ile Leu Lys Asp Pro Glu
785 790 795 800

Asp Asp Thr Glu Met Tyr Val Val Tyr Ala Asn Arg Thr Glu Asp Asp
805 810 815

Ile Leu Leu Lys Glu Glu Leu Asp Ser Trp Ala Glu Lys Ile Pro Glu
820 825 830

Arg Val Lys Val Trp Tyr Val Val Gln Asp Ser Ile Lys Glu Gly Trp
835 840 845

Lys Tyr Ser Ile Gly Phe Ile Thr Glu Ala Ile Leu Arg Glu His Ile
850 855 860

Pro Glu Pro Ser His Thr Thr Leu Ala Leu Ala Cys Gly Pro Pro Pro
865 870 875 880

Met Ile Gln Phe Ala Val Asn Pro Asn Leu Glu Lys Met Gly Tyr Asp
885 890 895

Ile Lys Asp Ser Leu Leu Val Phe
900

<210> 4

<211> 7096

<212> ДНК

<213> Nicotiana tabacum

<400> 4

tacatacaag ggcgcgaata aacttttttt aaagtaaag tatatgaact tgcaatgaaa	60
gaggacctta acttggttgt ctttggtgct ttctgcaaat ttcaccttaa cagcccat	120
gagattgatt tagttagtta taacaattag ttaaatgctt gtgtaatttg aagaaaatat	180
ttggacgtgc tcgctgaaaa cattatactc ctatataata gaaatacttt ctgaaaagtt	240
ggtcttggtc aaaaacgtat aagagagttg gtcttctcat aaatagtcac tagctttctg	300
atTTTTTTT actttctata tcacgtaaat aggtactcaa atttgatatt tacaccaa	360
aatgaaaat aggatatgtg ttttcatatc gtatatatat ctatcgtact taatgatata	420
tacatatata tataacctta ctttttgatt actaaaaatt taattatatt taatttgggt	480
aaatatcaga tgccacaaaa catttaccta gccactggtt ttgactacta aaaatttaat	540
tatgttttagc ttgggtaaat atcagatgtc actaaacatt ttacctagcc attcctccga	600
aaagaaattg agaaggaaat tagagttagt ggagccataa taatgtttta tgtgaccata	660

actcggtgaa aaccacggca agaataagaa acagctgtta aggctaacca acagctgcat	720
atctttaagc catttgetat tacccecaaca tgcacatcttc ctctgateccc gaccctacgg	780
gcgtaaaaag tgtaaactcgt tagaattggt ttattttattt tatgatgtca ctatttttta	840
aatcaaaat taaattgggg tgcgattttt ttgggtcct gcttatgtat agtatggcgc	900
tatggaggca ctgagagagt ccgaaacgtt tctatataag gccacccac gcattcacia	960
acttcgttcc caaacagaa aagaaaatca aatctcggag agagagagag agaaatattt	1020
tgagagagaa atacagaaaa tctctcttcc ttctttcctt tttttttcaa tccccattca	1080
tattcttttt ttagaataat ctatggcggc atctgtcgaa aacaggcagt tcagtcacct	1140
agaagccggt ttatcccggt ctttcaagcc ccggtctgat tccccgggtc gtggctgcaa	1200
cttcccttcg cccaacagta ctaatttcca aaagaaacca aattccacca tttacctga	1260
ttactcgtcg agtgaagacg acgatgatga tgacgaaaaa aatgagtacc ttcaaagat	1320
taaaaaaggg aattcagagt tagagccatc tgttcatgac actagggacg aagggtaccgc	1380
tgataattgg attgaacgca acttttccat gattcgtctc accggaagc atccatttaa	1440
ctccgaacca ccgttgaacc ggctcatgca ccacggcttt atcacaccg tccacttca	1500
ttacgttcgt aaccatggac cggttcccaa gggcacgtgg gatgactgga ccgtggaagt	1560
cacgggacta gtgaagcgtc ctatgaaatt cacaatggac cagttgggta acgaattccc	1620
ttgtagagaa ttgcccgta cgcttggttg tgctggcaat cgaaggaaag aacagaacat	1680
ggttaaacaa accattgggt tcaactgggg cgccgctgcc gtttcaacaa cgatatggcg	1740
cgggggtacc ctccgcgctt tgctaaaacg gtgcgggtgt tttagcaaga ataaaggggc	1800
gcttaatggt tgcttcgaag gagctgatgt gttgcccgga ggtggtggtt caaagtatgg	1860
aaccagcatt aagaaggaat ttgcaatgga tccagcacga gatatcatcg tagcctacat	1920
gcagaacgga gaaaaattgg cacccgacca cgggtttcca gtacgaatga taattccagg	1980
attcattgga ggaagaatgg tgaaatggat aaagaggatt atagtcacca cccaagaatc	2040
agacagctat tatcatttca aggacaatag agttcttcc tcccatgttg atgctgaact	2100
tgcaaatacc gaaggtagct accgtaacta tttcaattta ttactccatt tgttccaatt	2160
tatgtgaacc tatttcttt ttggtccgtt caaaaaagaa tgaaccttt ctaaatttgg	2220
taacaattta gcttaaaactt acaacttcac ccttaatgag aaacttttat aaccacacaa	2280
atacctggg gccatttgg acttgtttag gtcgacaaat tccaaaagtt ttattttttt	2340
cttaaaactt gtgctcagtc aaacagggtt acgtaaattg aaacggagag agtatcattt	2400
ttattaaggg gtataaatat attttaatta gttgagactt gcacatacaa gtaaaatatt	2460
tcttagaata caaaatcaac tgaaagctta cttetaatta tatggttttg aattttcctt	2520
tcaatgaagt aaataaaaag gaaacaatta tattcaacgc atgtagggtat atgggtcctgt	2580

cattatctca aatcaaatgg tttaaagaca aaggactttg gaaacataga attgtcagct	2640
ttatagttat ggagtactat attagttagc tgtttgcac tttcataat tgggtctatct	2700
gtgtgcagca tgggtgtaca agccagagta tatcatcaat gagcttaata ttaactctgt	2760
cattacgacg ccgtgtcatg aagaaatttt gccaat AAC gcttggacga ctcagcgacc	2820
ttacacgttg aggggctatt cttattcttg ttagtatttt tatattttcc gattttgctg	2880
agaatatcat atttcttagt tttgtcgata catcgtatcc tctaactctg acgttttact	2940
tgcctcttat gcacccactt acgtccttac tttctcagac agtttattga tgaaaactac	3000
ttactatttt cgacccgata gctcagcgt ccttaattaa atgtgatgtt ttgaaagaga	3060
tattctctcc cgtctatttt aattaatttt tggctgtttt tatacgtggg aatctatttt	3120
taacattaat taatatagaa atgaaccata ttaatatatt taatttcttc attgaaaata	3180
caacaaatac tcttcggctc ttactacaat gacaattttg aagaaaaata attaatctct	3240
tcctaataac tgaaaaatca aatattgttg accataaaaa aaggtaaaaa aattaattaa	3300
aatgaactgg agagagtaaa ttagaaaaata taattatagc actagtaatt aaagtatta	3360
gatgtcttct ttaaaaagcg tgtgaaaact ttaaagacga aatataatat gaattatttc	3420
taatacttag aaagtgtcaa taattggtag acaatttaaa ctatatacta gttaaaaagt	3480
ctgtcaatac aactattagt attggggatt agagagaata gtagtaaaat ggagtaattg	3540
gacgcattgag cttgggcatg ctgattgctg tcagcttggt tgctaattgtg aaaaagaaaa	3600
tagtaagaaa aggccacat ggttttgttt attttattat gtggtagtac aaaaaacct	3660
ggggagcttt cctagttctg aagagtcggg ctttggtagc aaaaattaa tagtatagta	3720
taccaagtga atattaaatt caattgtcta aagcacggaa tctttttgac tactttagtt	3780
cctgcattct gggttgctc aacaacacc tttattgaat tattatagta atgttcaata	3840
taatatacaa ttagaaaaca ctctaagtgg tcactttata tggatctagt caatactatt	3900
tcttctaaac aacgtgccta attacttccc actttccagt acatgaccac cattaagttt	3960
aatttttgtc aattccttgt gcaattggcc cttcaaatga gcagaagtgt tacgtaggaa	4020
aactaacttc agctactatt ataggagtaa acctgttagg aaaagatgct cgaggaaactg	4080
acaaaacttg tagaataatt agccattgta ttgattgaaa tactgattgt gaacgtgtaa	4140
caaacaggcg gagggaaaaa agtaacgcga gtagaagtga cgttggatgg aggagaaaca	4200
tggcaagtta gcacactaga tcaccagag aagcccacca aatatggcaa gtactggtgt	4260
tgggtctttt ggtaactcga gggtgaggtg ttagacttgc tcagtgttaa agaaattgct	4320
gttcagactt gggtgagac cctcaatact caaccgcga agcttatttg gaacgtcatg	4380
gtacgttcac ttcttttttt acctttattt cttttaactt ctatatacta gcggtgtaaa	4440
gttattttac accataagtt aacttacaaa aatatgtaac tatttatact acgagtgatg	4500

agggcaagaa ggggtttaag tatttgacaa taaatgtaaa cctgcaatt ttgttcctaa	4560
ttttttatcc ttccaactct ttgtgattgc ttcatatct agattcacag agcacatgtg	4620
ttcacatgcc aaaacaaaaa actacaaaca aaaaaacttt tcactagctt tagtctaaga	4680
ttcccccttt tttttttggg aggtgtgtgg tccatactcc atagatcaat tccagccact	4740
gacgtaccaa accctgaaaa ttcttagtag ttatagcgac gtacaatcat ttcatattat	4800
gtaagcagag acgtgatcac atgaactaga tgtgaatacc acttgcccag tccaccaggt	4860
caattcatct agatgtgtaa atcttgacac cagcactggg tcacttttat aacactagca	4920
tttaacaaca ttcatcctt gaacattact tgggctaatt aataagtatt tttttttata	4980
tactctaaaa attgtaatta cataaatgaa tttaacttat acacgctgac aatgttacta	5040
attccacttt ttacggacgg ttatctatag aaatcattta ggtgaaacaa ttctcttaca	5100
ctatgatcag tgttagtaca taatggttat tacattttct aaatattgtg ctatgttgca	5160
atgttcaggg aatgatgaat aattgctggt tccgagtaaa gatgaatgtg tgcaagcctc	5220
acaagggaga gattggaata gtgtttgagc atccgactca acctggaaac caatcaggtg	5280
gatggatggc gaaggagaga catttggaaga tatcagcaga ggcacctcaa aactaaaga	5340
agagtatctc aactccatc ataaacacag ctccaagat gtactccatg tccgaggtca	5400
ggaaacacag ctctgctgac tctgcttgga tcatagtcca tggtcataac tatgacgcca	5460
cgcgtttctt gaaagatcac cctgggtggga ctgacagcat tctcatcaat gctggcactg	5520
attgcaactga ggaatttgat gcaattcatt ctgataaggc taagaagctc ttggaggatt	5580
tcaggattgg tgaactcata actactggtt acacctctga ctctcctggc aactccgtgc	5640
acggatcttc ttccctcagc agctttctag cacctattaa ggaacttggt ccagcgcaga	5700
ggagtgtggc cctaattcca agagagaaaa tcccatgcaa actcatcgac aagcaatcca	5760
tctcccatga tgttaggaaa ttctgatttg cattgccctc tgaggatcaa gtcttgggct	5820
tgcctgttgg aaaacatata ttctctgtg ccgttattga cgataagctc tgcagcgcg	5880
cttacacgcc tactagcacg atcgatgagg tggggactct cgagttgggt gtcaagatat	5940
acttcaaagg aattcaccct aaattcccca atggagggca aatgtcacag tatcttgatt	6000
ctatgccgtt agggtcattt ctgcacgtga aagggtccatt aggtcacatt gaataccaag	6060
gaaagggaaa tttcttagtt catggcaaac agaagtttgc caagaagttg gccatgatag	6120
cagggtggaac aggaataact ccagtgtatc aagtcatgca ggcaattctg aaagatccag	6180
aagatgacac agaaatgtat gtggtgtatg ctaacagaac agaggatgat attttactta	6240
aggaagagct tgattcatgg gctgagaaaa ttccagagag ggttaaagtt tggatatgtg	6300
ttcaggattc tattaaagaa ggatggaagt acagcattgg ttttattaca gaagccattt	6360
tgagagaaca tatccctgag ccattctaca caaactggc tttggttgtt ggaccacctc	6420

```

ctatgattca atttgcgtgt aatccaaact tggagaagat gggctatgac attaaggatt 6480
ccttattgggt gttctaattt taaaaacaaa acaatatctg caggaataaa tttttttttt 6540
ccccctatca gttgtacata ttgtatttgg tttatcacc ccatgtacta cgtagtgttt 6600
gtagtcttta cttttttatt ttttagaatt tttttaaac ttaggatata aaggttttct 6660
cttccaacaa agtgattctt tagggaagaa atgtactgta ctgtactagt atgtctaagc 6720
cgaaagttgt aatgtttacc atgacaaatt gtattcaatt cctcatggaa tagtaacatt 6780
gtgttcattgt gtcttcctgt aagcgatctt caaaatatca atgtatatat atagtaattg 6840
caaaccattg ttccttttcc cgatgtagtt aactactctt tcttttagctt ctagtctctg 6900
gtgaatattt ttttttctat aactctttaa ttaatacggc cttaaataag agaaaagttt 6960
aaaccacgaa tatcattatg cagacgtata ggtaattaat ctactttttg aaaaaaatc 7020
tattttcttt atgtggtcct tcaaaataat attctagaac cttttgtata ttccctttta 7080
acttctattt agtttt 7096

```

```

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

```

```

<220>
<221> РІЗНОМАН._ОСОБЛИВОСТІРІЗНОМАН._ОСОБЛИВОСТІ
<222> (3)..(3)
<223> Lys або Arg

```

```

<220>
<221> РІЗНОМАН._ОСОБЛИВОСТІРІЗНОМАН._ОСОБЛИВОСТІ
<222> (4)..(4)
<223> Ser або Thr

```

```

<220>
<221> РІЗНОМАН._ОСОБЛИВОСТІ
<222> (5)..(5)
<223> Ile або Val або Ala

```

```

<220>
<221> РІЗНОМАН._ОСОБЛИВОСТІ
<222> (7)..(7)
<223> Thr або Ser

```

```

<400> 5
Leu Lys Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Pro Phe Met
1 5 10

```

```

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

```

```

<220>
<221> РІЗНОМАН._ОСОБЛИВОСТІ
<222> (3)..(3)
<223> Lys або Arg

```

```

<220>
<221> РІЗНОМАН._ОСОБЛИВОСТІ
<222> (4)..(4)
<223> Ser або Thr

<220>
<221> РІЗНОМАН._ОСОБЛИВОСТІ
<222> (5)..(5)
<223> Ile або Val абоабо Ala

<220>
<221> РІЗНОМАН._ОСОБЛИВОСТІ
<222> (7)..(7)
<223> Thr або Ser

<400> 6

Leu Lys Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Pro Phe Ile
1 5 10

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

<400> 7

Leu Lys Lys Ser Ile Ser Thr Pro Phe Met
1 5 10

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

<400> 8

Leu Lys Lys Ser Ile Ser Thr Pro Phe Ile
1 5 10

<210> 9
<211> 10
<212> ДНК
<213> Nicotiana tabacum

<400> 9
ctccattcat 10

<210> 10
<211> 10
<212> ДНК
<213> Nicotiana tabacum

<400> 10
aacacagctt 10

<210> 11
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер

```

```

<400> 11
ccacttttta cggacgggta tct 23

<210> 12
<211> 25
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер

<400> 12
gcaaatcgaa atttcctaac atcat 25

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

<400> 13

Lys Ser Ile Ser Thr Pro
1 5

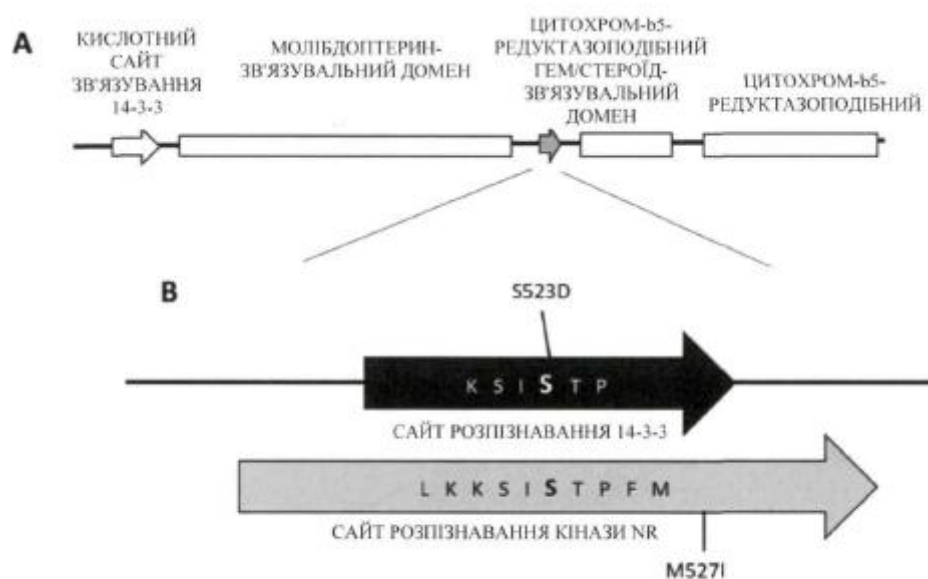
```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

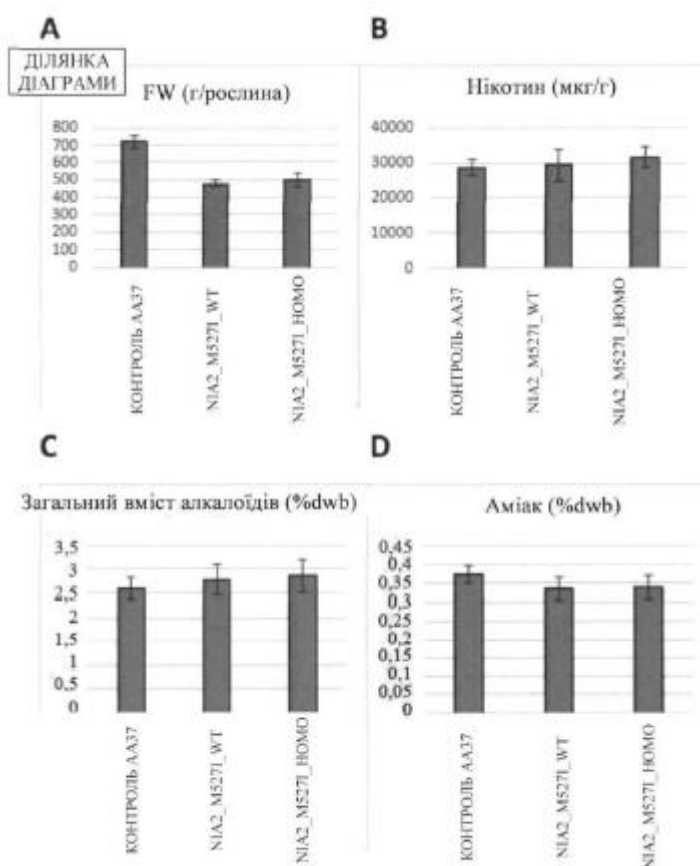
- 5 1. Висушене листя рослини *Nicotiana tabacum*, що не зустрічається в природі, що містить:
 - (a) полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид - нітратредуктазу, що містить безперервну поліпептидну послідовність SEQ ID NO: 3, де метіонін замінений ізолеїцином в положенні, відповідному до положення 527 послідовності, що характеризується послідовністю SEQ ID NO: 1, при цьому згадана заміна зменшує рівні нітратів у висушеному листі рослини
 - 10 *Nicotiana tabacum* у порівнянні з висушеним листям контрольної рослини *Nicotiana tabacum*, що не містить мутації;
 - (b) поліпептидну послідовність, що кодується полінуклеотидною послідовністю, представленою в (a); або
 - (c) конструкцію, вектор або вектор експресії, що містять полінуклеотидну послідовність,
 - 15 представлену в (a).
2. Висушене листя рослини *Nicotiana tabacum*, що не зустрічається в природі, за п. 1, де поліпептид містить безперервну поліпептидну послідовність SEQ ID NO: 8.
3. Висушене листя рослини *Nicotiana tabacum*, що не зустрічається в природі, за будь-яким із попередніх пунктів, де полінуклеотидна послідовність містить полінуклеотидну послідовність,
- 20 що характеризується щонайменше 80 % ідентичністю з послідовністю SEQ ID NO: 4.
4. Висушене листя рослини *Nicotiana tabacum*, що не зустрічається в природі, за будь-яким із попередніх пунктів, де полінуклеотидна послідовність містить полінуклеотидну послідовність, представлену під SEQ ID NO: 4.
5. Висушене листя рослини *Nicotiana tabacum*, що не зустрічається в природі, за будь-яким із попередніх пунктів, яке є листям від *Nicotiana tabacum* культивару AA37.
6. Висушене листя рослини *Nicotiana tabacum*, що не зустрічається в природі, за будь-яким із попередніх пунктів, яке являє собою листя, висушене повітряним сушінням або сонячним сушінням, або трубовогневим сушінням.
7. Тютюновий продукт, який містить висушене листя рослини *Nicotiana tabacum*, що не
- 30 зустрічається в природі, за будь-яким із пп. 1-6.
8. Спосіб одержання висушеного листя рослини *Nicotiana tabacum*, що не зустрічається в природі, за будь-яким із попередніх пунктів, який включає стадії:
 - (a) одержання клітини рослини *Nicotiana tabacum*, яка містить полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид - нітратредуктазу, що містить безперервну поліпептидну послідовність
 - 35 SEQ ID NO: 1;
 - (b) модифікація одержаної клітини рослини для модулювання експресії згаданого полінуклеотиду порівняно з клітиною контрольної рослини, що не зазнавала мутації, причому ця модифікація клітини рослини включає забезпечення принаймні заміни, що не зустрічається в природі, метіоніну ізолеїцином в положенні 527 послідовності SEQ ID NO: 1 згаданого
 - 40 поліпептиду;
 - (c) розмноження клітини рослини з одержанням рослини;
 - (d) збір з рослини листя; і

(е) сушіння листя.

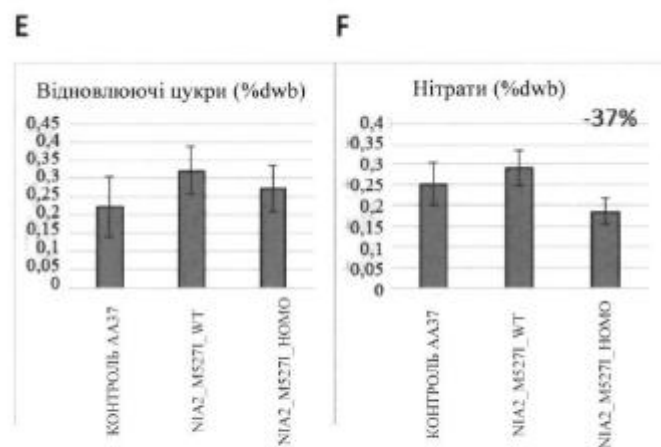
9. Спосіб за п. 8, де спосіб сушіння вибраний із групи, що складається з повітряного сушіння, вогневого сушіння, димового сушіння й трубового сушіння.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фіг. 2
продовження