

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090540 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.28

(51) Int. Cl. C12N 9/12 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/10 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.08.22

(54) ГЕН, ПРИДАЮЩИЙ УСТОЙЧИВОСТЬ К ПАТОГЕННОМУ ГРИБУ

(31) 17187309.4; 17206305.9

(32) 2017.08.22; 2017.12.08

(33) EP

(86) PCT/EP2018/072665

(87) WO 2019/038326 2019.02.28

(71) Заявитель:

КВС ЗААТ SE & КО. КГАА (DE);
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ЦЮРИХ (CH)

(72) Изобретатель:

Кессель Беттина, Оузунова Милена,
Престерль Томас, Шейерманн
Даниэла (DE), Херрен Герхард, Келлер
Бит, Краттингер Саймон, Викиер
Томас, Янг Пинг (CH)

(74) Представитель:

Зуйков С.А. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, придающий растению устойчивость к патогенному грибу, такому как, *Helminthosporium turcicum*. Настоящее изобретение также относится к растению (или его части), содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, и к способам, включающим молекулу нуклеиновой кислоты.

A1

202090540

202090540

A1

Ген, придающий устойчивость к патогенному грибу

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, придающий растению устойчивость к патогенному грибу, такому как, *Helminthosporium turcicum*. Настоящее изобретение также относится к растению (или его части), содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, и к способам, включающим молекулу нуклеиновой кислоты.

Предпосылки создания изобретения

У кукурузы (*Zea mays* L.) имеется много патогенных грибов, которые вызывают заболевания листьев. Гриб, который может причинить гораздо больше вреда в тропических, а также в умеренных климатических условиях, таких как, условия, имеющиеся на большей части Европы и Северной Америки, а также в Африке и Индии, известен под названием *Helminthosporium turcicum* или как синоним *Exserohilum turcicum* (телеоморф: *Setosphaeria turcica*). *H. turcicum* является причиной заболевания пятнистостью листьев, известной под названием «Северный гельминтоспориоз листьев кукурузы» (NCLB), который может возникать в эпидемических масштабах в период влажных лет, поражая уязвимые сорта кукурузы и причиняя большой ущерб, что приводит к значительным потерям урожая, которые могут составлять 30%, и он может поражать даже более обширные районы. По этой причине, с 1970-х годов люди пытались найти естественную устойчивость в генетическом материале. В настоящее время, известна, пусть и не полная, количественная и качественная устойчивость. В то время как олигогенетически или полигенетически передаваемая по наследству количественная устойчивость является неполной и неспецифической в отношении расы в фенотипе и подвергается воздействию дополнительных и частично доминантных генов, качественная устойчивость, в свою очередь, является, как правило, расово-специфической и может передаваться по наследству посредством отдельных, в основном доминантных генов в таких локусах, как *HT1*, *HT2*, *HT3*, *Htm1* или *HTN1* (Липпе и др., 1997, «Взаимодействие *Ht* и частичной устойчивости к *Exserohilum turcicum* у кукурузы». *Plant Disease* 81: 277-282; Вельц и Гейгер, 2000, «Гены устойчивости к Северному гельминтоспориозу листьев кукурузы в различных популяциях кукурузы». *Plant Breeding* 119: 1-14). Возвратные скрещивания во многих часто используемых линиях инбредной кукурузы, таких как, W22, A619, B37 или B73, успешно привели к интрогрессии локусов HT, где они демонстрируют частичное доминирование и экспрессию в качестве функции соответствующего генетического фона (Вельц, 1998, «Генетика и эпидемиология патосистемы *Zea mays* / *Setosphaeria turcica*» Habilitationsschrift, Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Population-genetik, Universität Hohenheim).

Несмотря на такую сложную генетическую архитектуру устойчивости к NCLB у кукурузы, до настоящего времени, главным образом, использование гена *HT1*, расположенного на длинном плече хромосомы 2, вместе с частичной количественной устойчивостью было достаточно для борьбы с

гельминтоспориозом у кукурузы (Вельц, 1998). Основанием для этого является то, что во всем мире расы 0 и 1 *H. turcicum* являются наиболее распространенными (приблизительно 55%) (Липпс и др., 1997), в то время как другие расы, такие как, 2N и 23N, являются редкими даже в географически ограниченных районах (Вельц, 1998). Эта раса 0 является авирулентной по отношению к растению кукуруза с геном *HT1* (см. также Таблицу 1), таким образом, будучи наделенной подходящей количественной устойчивостью, она демонстрирует достаточную общую устойчивость к NCLB. Однако во многих исследованиях сообщалось о растущей диссеминации менее распространенных рас (Джордан и др., 1983, «Возникновение расы 2 *Exserohilum turcicum* у кукурузы в центральной и восточной части Соединенных Штатов». *Plant Disease* 67: 1163-1165; Вельц, 1998). Причины этого кроются в популяционной динамике патогена, которая обеспечивает изменения вирулентности патогенов за счет новых мутаций в генах авирулентности и новых комбинаций доступных генов вирулентности. Это может привести к возникновению новых, иногда более агрессивных патогенных рас. В Бразилии, например, популяция *H. turcicum* уже, по-видимому, значительно более разнообразна в отношении расового состава, чем, например, в Северной Америке. Уже в 1990-х годах сообщалось, что расы *H. turcicum* преодолели устойчивость, придаваемую геном *HT1*. Кроме того, существует нестабильность генов устойчивости к определенным факторам окружающей среды, таким как, температура и интенсивность освещенности в некоторых климатических зонах (Тхакур и др., 1989, «Влияние температуры и освещенности на вирулентность *Exserohilum turcicum* у кукурузы». *Phytopathology* 1989, 79: 631–635). Как следствие, возрастает значение использования новых генов устойчивости *HT* для производства коммерческих растений кукурузы с нацеливанием на более полную и более длительную устойчивость к *H. turcicum* у кукурузы.

Таблица 1: Обзор устойчивости (R) и чувствительности (S) локусов устойчивости к различным расам *Helminthosporium turcicum*:

Патоген	Реакция хозяина (Ht) на каждую расу			
Обозначение расы Ht	Локус HT1	Локус HT2	Локус HT3	Ген HTN1
0	R	R	R	R
1	S	R	R	R
2	R	S	R	R
3	R	R	S	R
N	R	R	R	S
12	S	S	R	R
23	R	S	S	R
2N	R	S	R	S
12N	S	S	R	S
23N	R	S	S	S
123N	S	S	S	S

Одним из источников моногенной устойчивости гена *HTN1* является мексиканская свинья породы Ландрас «Pepitilla» (Геверс, 1975, «Новый основной ген устойчивости к Гельминтоспориозной

пятнистости листьев кукурузы». *Plant Disease Rep* 59: 296-300). Линии интрогрессии гена *HTN1* демонстрируют картирование гена на длинном плече хромосомы 8. В отличие от обычных генов устойчивости НТ, ген *HTN1* придает устойчивость, задерживая начало споруляции, и таким образом борется с развитием поражений. В результате, образуется меньше поражений, а также уменьшается количество зон споруляции (Симкокс и Беннетзен, 1993, «Использование молекулярных маркеров для изучения устойчивости к *Setosphaeria turcica* у кукурузы». *Phytopathology* 83: 1326-1330). Хлоротически-некротические поражения, такие как, поражения, обусловленные устойчивостью, придаваемой *HT1*, *HT2* или *HT3*, не образуются (Геверс, 1975). Документ WO 2015/032494 раскрывает идентификацию гена-возбудителя, *RLK1*, придающего фенотип устойчивости «Pepitilla» 8,06 пар оснований у кукурузы, и описывает молекулярные маркеры, подходящие для использования этого локуса устойчивости без тесно сцепленного нежелательного сцепленного груза, приводящего к отрицательному воздействию на максимально потенциальный урожай.

В документе WO 2011/163590 были раскрыты генотипы PH99N и PH26N в качестве альтернативных источников для устойчивости к NCLB пар оснований 5 на хромосоме 8.

С целью идентификации гена устойчивости к NCLB из гибрида кукурузы DK888, в 2010 году, Чанг и др. опубликовали исследование, посвященное точному картированию локуса устойчивости из 8,06 пар оснований (Чанг и др. 2010 «Характеристика и точное картирование локуса устойчивости к Северному гельминтоспориозу листьев кукурузы для 8,06 пар оснований» *Theoretical and Applied Genetics* 121 (2): 205-227). Исследования специфичности расы *Helminthosporium* первоначально показали, что функционально локус устойчивости тесно сцеплен с генами *HT2* и *HTN1*. Аннотации геномов фрагмента хромосомы размером 0,46 Мб с использованием ссылки B73 намекали на несколько предполагаемых открытых рамок считывания; однако, ген-возбудитель не был идентифицирован, и функциональная проверка не была описана.

Таким образом, целью настоящего изобретения является идентификация и/или дополнительная характеристика генов устойчивости растений, кодирующих полипептиды, придающие или увеличивающие устойчивость к патогенному грибу, такому как, *Helminthosporium turcicum*.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение предлагает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из нуклеотидной последовательности, имеющей нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. Также предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3.

Также предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 96%-ую идентичность с нуклеотидной

последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и молекула нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 92%-ую идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3.

Также предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности, гибридизующейся с комплементарной цепью нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или гибридизующейся с комплементарной цепью нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, в жестких условиях гибридизации.

Кроме того, предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, причем указанный белок получен из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты.

Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует полипептид, который представляет собой рецептор-подобные киназы 1 (WAK RLK1), ассоциированные со стенкой, или функционально принадлежит к семейству рецептор-подобных киназ, ассоциированных со стенкой.

Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует полипептид, способный придавать (или повышать) устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в частности, *Helminthosporium turcicum*, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N у растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – у растения вида *Zea mays*, в котором экспрессируется полипептид.

В другом аспекте, предложен вектор или экспрессионная кассета, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в векторе или экспрессионной кассете, нуклеотидная последовательность по настоящему изобретению функционально сцеплена с регуляторным элементом, обеспечивающим экспрессию нуклеотидной последовательности в растительной клетке.

Также предложена клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или вектор, или экспрессионную кассету по настоящему изобретению.

В другом аспекте, предложен полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Полипептид представляет собой рецептор-подобные киназы 1 (WAK RLK1), ассоциированные со стенкой, или функционально принадлежит к семейству рецептор-подобных киназ 1, ассоциированных со стенкой. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, полипептид способен придавать (или повышать) устойчивость к

заболеванию растений, вызываемому *Helminthosporium turcicum*, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N у растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – у растения вида *Zea mays*, в котором экспрессируется полипептид.

Кроме того, полипептид может быть способен придавать или повышать устойчивость к заболеванию растений, вызываемому *Helminthosporium turcicum* рас 2 и/или 3 у растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – у растения вида *Zea mays*, в котором экспрессируется полипептид. Растение может показывать чувствительный ответ на инфицирование *Helminthosporium turcicum* рас 2 и/или 3.

Кроме того, предложено растение, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – растение вида *Zea mays*, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению трансгенно (как трансген) или эндогенно (как эндогенный ген), вектор по настоящему изобретению, экспрессионную кассету по настоящему изобретению или полипептид по настоящему изобретению. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растение устойчиво к заболеванию растений, вызываемому *Helminthosporium turcicum*, в частности, *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N. Растение может показывать чувствительный ответ на инфицирование *Helminthosporium turcicum* рас 2 и/или 3. Растение может представлять собой трансгенное растение или генетически отредактированное растение. Растение может представлять собой растение, эндогенно содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, при этом, фланкирующие области генома не содержат интервал, полученный из A619HT2 или A619HT3, расположенный между аллелями маркера SYN14136 и маркера MA0021, или интервал, полученный из A619HT2 или A619HT3, расположенный между аллелями маркера MA0022 и маркера SYN4196. Также предложена часть растения по настоящему изобретению, растительная клетка растения по настоящему изобретению и семя растения по настоящему изобретению, при этом, семя содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению трансгенно (как трансген) или эндогенно (как эндогенный ген), вектор по настоящему изобретению, экспрессионную кассету по настоящему изобретению или полипептид по настоящему изобретению.

Согласно другому аспекту, предложен способ или метод идентификации, или выбора растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – растения вида *Zea mays*, обладающего повышенной устойчивостью к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N, или его части, клетки или семени, содержащий следующие этапы: (а) определение в растении или его части, клетке или семени (или в образце растения, или его части, клетки или семени), присутствия молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, как описано выше, или молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей

или состоящей из нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: (i) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60%-ую идентичность с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, (ii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 60%-ую идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, (iii) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 85%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 1-920 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 (Экзон 1; SEQ ID NO: 6), или имеющей, по меньшей мере, 60%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 23252-23288 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 (Экзон 2; SEQ ID NO: 7), или с положениями нуклеотидов 921-957 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2 (Экзон 2; SEQ ID NO: 7), и/или имеющей, по меньшей мере, 98%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 23586-24632 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 (Экзон 3; SEQ ID NO: 8), или с положениями нуклеотидов 958-2004 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2 (Экзон 3; SEQ ID NO: 8), (iv) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%-ую идентичность с положениями 1-306 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, и/или имеющую, по меньшей мере, 60%-ую идентичность с положениями 307-319 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, и/или имеющую, по меньшей мере, 98%-ую идентичность с положениями 320-668 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, при этом, молекула нуклеиновой кислоты по любому из пунктов (i)-(iv) кодирует полипептид, способный придавать или повышать устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N, у растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – у растения вида *Zea mays*, в котором экспрессируется полипептид, и, при этом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты по любому из пунктов (i)-(iv) кодирует полипептид, который является или функционально принадлежит к семейству рецептор-подобных киназ 1 (WAK RLK1), ассоциированных со стенкой; и (b) идентификацию или выбор растения, в котором или в части, клетке или семени которого присутствует молекула нуклеиновой кислоты, как определено в пункте (a), как обладающая устойчивостью или повышенной устойчивостью к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N.

Также предложен способ или метод идентификации растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – растения вида *Zea mays*, которое устойчиво к

заболеванию растений, вызываемому *Helminthosporium turcicum*, в частности, *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N, и оно содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению эндогенно, причем способ или метод содержит определение в аллелях растения, по меньшей мере, двух маркеров, при этом, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на или в пределах хромосомного интервала между SYN14136 и молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на или в пределах хромосомного интервала между молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и SYN4196.

В другом аспекте, предложено растение, идентифицированное или выбранное способом или методом идентификации или выбора согласно настоящему изобретению, или его потомство.

В другом аспекте, предложен способ идентификации аллеля гена устойчивости, придающего или повышающего устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, у *Zea mays* и в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – кодирующего полипептид, который является или функционально принадлежит к семейству рецептор-подобных киназ 1 (WAK RLK1), ассоциированных со стенкой, при этом, способ содержит следующие этапы: (a) проведение сравнения последовательностей с использованием (i), по меньшей мере, одной кодирующей нуклеотидной последовательности, происходящей или полученной из генотипа *Zea mays*, при этом, нуклеотидная последовательность, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, соответствует локусу устойчивости из 8,05 пар оснований или локусу устойчивости из 8,06 пар оснований, и (ii), в качестве эталонной последовательности, нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, или ее части, или консенсусной последовательности, полученной из набора, по меньшей мере, двух нуклеотидных последовательностей, при этом, одна нуклеотидная последовательность представляет собой нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, или ее части, и, при этом, каждая нуклеотидная последовательность набора, по меньшей мере, двух нуклеотидных последовательностей кодирует полипептид, способный придавать или повышать устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном

варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 или N, у *Zea mays*, в котором экспрессируется полипептид, и, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, соответствует локусу устойчивости из 8,05 пар оснований или локусу устойчивости из 8,06 пар оснований, и, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, кодирует полипептид, который является или функционально принадлежит к семейству рецептор-подобных киназ 1 (WAK RLK1), ассоциированных со стенкой, и (b) идентификацию аллеля, если сравнение последовательностей выявляет (i) идентичность последовательности на уровне нуклеотидов, составляющую, по меньшей мере, 85%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 1-920 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и/или составляющую, по меньшей мере, 60%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 23252-23288 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, или с положениями нуклеотидов 921-957 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, и/или составляющую, по меньшей мере, 98%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 23586-24632 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, или с положениями нуклеотидов 958-2004 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, и/или (ii) идентичность последовательности уровня кодируемой аминокислоты, составляющую, по меньшей мере, 75%-ую идентичность с положениями 1-306 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, и/или составляющую, по меньшей мере, 60%-ую идентичность с положениями 307-319 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, и/или составляющую, по меньшей мере, 98%-ую идентичность с положениями 320-668 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3.

Также предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности аллеля гена устойчивости, идентифицированного способом идентификации аллеля гена устойчивости.

В другом аспекте, предложен способ придания или повышения устойчивости к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, у растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – у растения вида *Zea mays*, содержащий следующие этапы: (a) введение в, по меньшей мере, одну клетку растения молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, включая, например, молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из нуклеотидной последовательности идентифицированного аллеля, экспрессионной кассеты по настоящему изобретению или вектора по настоящему изобретению, (b) регенерацию растения из, по меньшей мере, одной клетки и (c) вызывание экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты у растения.

В другом аспекте, предложен способ придания или повышения устойчивости к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, у растения по настоящему изобретению, содержащий этап уменьшения уровня экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, включая, например, молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из нуклеотидной последовательности идентифицированного аллеля, экспрессионной кассеты по настоящему изобретению или вектора по настоящему изобретению, у растения или у, по меньшей мере, одной клетки растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по сравнению с уровнем экспрессии эндогенного гена в устойчивом растении дикого типа.

В другом аспекте, предложен способ получения растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – растения вида *Zea mays*, имеющего (повышенную) устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, или его части, клетки или семени, содержащий следующие этапы: (а) введение в растение или, по меньшей мере, в одну клетку растения молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, включая, например, молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из нуклеотидной последовательности идентифицированного аллеля, экспрессионной кассеты по настоящему изобретению или вектора по настоящему изобретению, (b) необязательную регенерацию растения из, по меньшей мере, одной клетки и (с) вызывание экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты у растения.

В другом аспекте, предложено растение, полученное способами получения растения по настоящему изобретению, или его потомство.

Также предложен способ борьбы с инфицированием патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, у популяции растений, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – растений вида *Zea mays*, содержащий следующие этапы: (а) выращивание растений по настоящему изобретению на сельскохозяйственных и садовых участках и (b) вызывание экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, включая, например, молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из нуклеотидной последовательности идентифицированного аллеля, экспрессионной кассеты по настоящему изобретению или вектора по настоящему изобретению, у растений.

Другим аспектом настоящего изобретения является олигонуклеотид, имеющий в длину, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по меньшей мере, 21, 22, 23, 24 или 25, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по меньшей мере, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200, 300 или 500 нуклеотидов, при этом, олигонуклеотид способен гибридизоваться или отжигаться с (i) молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, (ii) молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, или с (iii) молекулой нуклеиновой кислоты, комплементарной (i) или (ii).

Также предложена пара олигонуклеотидов или набор, содержащий указанные олигонуклеотиды, при этом, олигонуклеотиды подходят для отжига в качестве прямого праймера и обратного праймера для области в геноме растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – в геноме *Zea mays*, который проявляет косегрегацию, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – идеальную косегрегацию, с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

В другом аспекте, предложено использование, по меньшей мере, одного олигонуклеотида в качестве молекулярного маркера или его части в способе идентификации или выбора растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – растения вида *Zea mays*, имеющего повышенную устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N, или его части, клетки или семени, или в способе идентификации аллеля гена устойчивости, придающего или повышающего устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N, у *Zea mays*, при этом, молекулярный маркер способен определять, по меньшей мере, один однонуклеотидный полиморфизм, проводить диагностику делеции или вставки для молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и/или содержит олигонуклеотид, как описано выше, и/или представляет собой пару олигонуклеотидов или набор, как описано выше.

В одном аспекте, предложено использование, по меньшей мере, одного олигонуклеотида или, по меньшей мере, двух олигонуклеотидов в качестве молекулярного маркера или его части в способе или методе идентификации растения, как описано выше, или в способе или методе элиминации сцепленного груза, тесно сцепленного с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, для определения присутствия или отсутствия интервала, полученного из A619HT2 или A619HT3, расположенного между аллелями маркера SYN14136 и маркера MA0021, или интервала, полученного из A619HT2 или A619HT3, расположенного между аллелями маркера MA0022 и маркера SYN4196.

В другом аспекте, предложен способ определения присутствия или отсутствия молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, включая, например, молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из нуклеотидной последовательности идентифицированного аллеля, у растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – у растения вида *Zea mays*, содержащий следующие этапы: (а) выделение ДНК из, по меньшей мере, одной клетки растения и (b) использование молекулярного маркера для определения присутствия или отсутствия молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, при этом, молекулярный маркер способен определять, по меньшей мере, один однонуклеотидный полиморфизм, проводить диагностику делеции или вставки для молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и/или содержит олигонуклеотид, как описано выше, и/или представляет собой пару олигонуклеотидов или набор, как описано выше.

Краткое описание чертежей

На ФИГУРЕ 1: показан вектор p7U-нативныйHT2_CDS_2, который можно использовать для трансформации растений *Zea mays*. Экспрессионную кассету, содержащую сДНК гена HT2 (SEQ ID NO: 2) под контролем нативного промотора (SEQ ID NO: 4) и терминатора (SEQ ID NO: 5), трансформировали в бинарный вектор, содержащий, например, ген устойчивости к гербицидам (например: устойчивости к BASTA, устойчивости к глифосату или устойчивости к ингибиторам ALS) для последующей трансформации в *Agrobacterium tumefaciens* для Agrobacterium-опосредованной трансформации растения в генотип кукурузы (*Zea mays*) A188.

На ФИГУРЕ 2 A-D: показано множественное выравнивание последовательностей CLUSTAL O (1.2.4) аллелей RLK1 HT2 (SEQ ID NO: 2), HTN1 (SEQ ID NO: 9), PH99N (SEQ ID NO: 11) и PH26N (SEQ ID NO: 13). Положение с различиями в последовательностях обозначено отсутствующей звездочкой в нижней строке каждого блока.

На ФИГУРЕ 3 A и B: показано множественное выравнивание последовательностей ClustalV (PAM250) полипептидов RLK1. RLK1_A619HT2_CDS.seq (SEQ ID NO: 3), RLK1_A619HT3_CDS.seq (идентичная SEQ ID NO: 3), RLK1_B37HTN_CDS.seq (SEQ ID NO: 10), RLK1_A619HT2_Экзон1.seq (SEQ ID NO: 6), RLK1_A619HT2_Экзон2.seq (SEQ ID NO: 7), и RLK1_A619HT2_Экзон3.seq (SEQ ID NO: 8).

На ФИГУРЕ 4 A-C: показано выравнивание последовательностей сДНК гена HT2 (SEQ ID NO: 2) и сДНК аллеля RLK1, полученного из генотипа A188. В позиции 1458–1459 аллеля A188 была идентифицирована вставка «АС» 2-х пар оснований (белые буквы на черном фоне), которая вызывает ранний стоп-кодон (выделен жирным шрифтом и подчеркнут).

На ФИГУРЕ 5: показано выравнивание последовательностей аминокислот A619HT2 и модифицированного A188 RLK1. Модифицированный A188 RLK на 99,1% идентичен A619HT2.

На ФИГУРЕ 6: показана карта положений маркеров со ссылкой на положения маркеров AGPv02.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение основано на идентификации гена *HT2*, который кодирует полипептид, придающий (или повышающий) растению устойчивость к патогенному грибу, такому как, *Helminthosporium turcicum*.

Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения, предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности, кодирующей указанный ген *HT2*. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, имеющей нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 (геномная ДНК гена *HT2*) или SEQ ID NO: 2 (сДНК гена *HT2*). Также предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 (белок HT2).

Также предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 96%-ую идентичность с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, нуклеотидная последовательность, имеющая, по меньшей мере, 97%-ую, 98%-ую, 99%-ую или 99,5%-ую идентичность с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине. Также предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 92%-ую идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 93%-ую, 94%-ую, 95%-ую, 96%-ую, 97%-ую, 98%-ую, 99%-ую или 99,5%-ую идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности, гибридизующейся с комплементарной цепью нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или

SEQ ID NO: 2, или нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, в жестких условиях гибридизации.

Кроме того, предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из белка, кодируемого нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или полученный из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты.

Делеция, замещение или добавление аминокислоты (аминокислот) может быть осуществлено методом, известным в данной области техники. Мутагенез в нуклеотидной последовательности может быть вызван посредством известного метода, такого как, метод Кункеля, метод дуплексирования с гэпом или метод, подобный такому известному способу. Например, мутагенез может быть вызван с помощью использования набора для мутагенеза (например, Mutant-K или Mutant-G (название продуктов компании TAKARA Bio)), основанного на способе сайт-направленного мутагенеза, набора для проведения мутагенеза последовательностей *in vitro* LA PCR (название продукта компании TAKARA Bio) или тому подобных. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, способ мутагенеза может представлять собой способ, при котором используется химический мутаген, представленный EMS (этилметансульфонатом), 5-бромурацилом, 2-аминопурином, гидроксиламином, N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином или другим канцерогенным соединением, способ, содержащий лучевую обработку с использованием радиоактивных лучей, таких как, рентгеновские лучи, альфа-лучи, бета-лучи, гамма-лучи или пучок ионов, или способ, содержащий обработку ультрафиолетом.

Когда аминокислотный остаток изменен, то аминокислота является, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, мутированной для другой аминокислоты (аминокислот), которая сохраняет свойства аминокислоты. Примерами свойств аминокислот являются: гидрофобные аминокислоты (A, I, L, M, F, P, W, Y и V), гидрофильные аминокислоты (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S и T), аминокислоты, содержащие алифатические боковые цепи (G, A, V, L, I и P), аминокислоты, содержащие гидроксильные группы в боковых цепях (S, T и Y), аминокислоты, содержащие серосодержащие боковые цепи (C и M), аминокислоты, содержащие карбоновые кислоты и амиды в боковых цепях (D, N, E и Q), аминокислоты, содержащие основные боковые цепи (R, K и H), и аминокислоты, содержащие ароматические боковые цепи (H, F, Y и W) (аминокислоты представлены однобуквенными кодами в скобках). Аминокислотные замещения внутри каждой группы называются консервативными замещениями. Консервативные замещения являются предпочтительными.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует полипептид, способный придавать (или повышать) устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом у растения, в котором экспрессируется полипептид.

Кроме того, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует полипептид, который может быть не способен придавать устойчивость к заболеванию растений, вызываемому *Helminthosporium turcicum* рас 2 и/или 3 у растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – у растения вида *Zea mays*, в котором экспрессируется полипептид. Растение может показывать чувствительный ответ на инфицирование *Helminthosporium turcicum* рас 2 и/или 3.

Другим примером молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может быть молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, или молекула нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, патогенный грибок принадлежит к отделу Ascomycota или Basidiomycota. Патогенный грибок может принадлежать к семейству Pleosporaceae, Pucciniaceae или Botryosphaeriaceae. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, патогенный грибок принадлежит к роду *Setosphaeria*, *Bipolaris*, *Puccinia* или *Diplodia*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, это вид *Helminthosporium turcicum*, *Setosphaeria rostrata*, *Setosphaeria glycinea*, *Setosphaeria holmii*, *Setosphaeria khartoumensis*, *Setosphaeria minor*, *Setosphaeria monoceras*, *Setosphaeria pedicellata*, *Setosphaeria prolata*, *Bipolaris australis*, *Bipolaris brizae*, *Bipolaris buchloës*, *Bipolaris cactivora*, *Bipolaris clavata*, *Bipolaris coicis*, *Bipolaris colocasiae*, *Bipolaris crotonis*, *Bipolaris crustacean*, *Bipolaris cylindrical*, *Bipolaris euchlaenae*, *Bipolaris halepensis*, *Bipolaris heveae*, *Bipolaris incurvata*, *Bipolaris indica*, *Bipolaris iridis*, *Bipolaris leersiae*, *Bipolaris micropus*, *Bipolaris miyakei*, *Bipolaris multiformis*, *Bipolaris nicotiae*, *Bipolaris novae-zelandiae*, *Bipolaris ovariicola*, *Bipolaris panicum-miliacei*, *Bipolaris papendorfii*, *Bipolaris sacchari*, *Bipolaris salkadehensis*, *Bipolaris sorghicola*, *Bipolaris subpapendorfii*, *Bipolaris tropicalis*, *Bipolaris urochloae*, *Bipolaris zaeae*, *Puccinia asparagi*, *Puccinia graminis*, *Puccinia horiana*, *Puccinia mariae-wilsoniae*, *Puccinia poarum*, *Puccinia psidii*, *Puccinia recondite*, *Puccinia sessilis*, *Puccinia sorghi*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia triticina*, *Diplodia maydis*, *Diplodia seriata* или *Stenocarpella (Diplodia) macrospora*, в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, это *Helminthosporium turcicum*, *Puccinia sorghi*, *Diplodia macrospora* или *Bipolaris maydis*.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, заболевание растений представляет собой грибковое заболевание. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, заболевание растений выбрано из группы, состоящей из Северного гельминтоспориоза листьев кукурузы (вызванного *Helminthosporium turcicum*), Южного гельминтоспориоза листьев кукурузы (вызванного *Bipolaris maydis*), Бурой ржавчины (вызванной *Puccinia sorghi*) и Диплодиоза (полосатость листьев) (вызванного *Diplodia macrospora*, также называемого *Stenocarpella macrospora*). В самом предпочтительном варианте осуществления

настоящего изобретения, заболевание растений представляет собой Северный гельминтоспориоз листьев кукурузы (NCLB).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует полипептид, способный придавать растению (или повышать у растения) устойчивость к Северному гельминтоспориозу листьев кукурузы (NCLB), то есть, устойчивость к *Helminthosporium turcicum*, в частности, устойчивость к *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, или устойчивость к *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение представляет собой *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosom*, *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinarium*, *Zea mays*, *Setaria italica*, *Oryza minuta*, *Oriza sativa*, *Oryza australiensis*, *Oryza alta*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Secale cereale*, *Triticale*, *Malus domestica*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum marinum*, *Aegilops tauschii*, *Daucus glochidiatus*, *Beta vulgaris*, *Daucus pusillus*, *Daucus muricatus*, *Daucus carota*, *Eucalyptus grandis*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Coffea canephora*, *Vitis vinifera*, *Erythrante guttata*, *Genlisea aurea*, *Cucumis sativus*, *Morus notabilis*, *Arabidopsis arenosa*, *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis thaliana*, *Crucihimalaya himalaica*, *Crucihimalaya wallichii*, *Cardamine flexuosa*, *Lepidium virginicum*, *Capsella bursa pastoris*, *Olmaraibidopsis pumila*, *Arabis hirsute*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Eruca vesicaria* subsp. *sativa*, *Citrus sinensis*, *Jatropha curcas*, *Populus trichocarpa*, *Medicago truncatula*, *Cicer yamashitae*, *Cicer bijugum*, *Cicer arietinum*, *Cicer reticulatum*, *Cicer judaicum*, *Cajanus cajanifolius*, *Cajanus scarabaeoides*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Gossypium sp.*, *Astragalus sinicus*, *Lotus japonicas*, *Torenia fournieri*, *Allium cepa*, *Allium fistulosum*, *Allium sativum*, *Helianthus annuus*, *Helianthus tuberosus* и *Allium tuberosum*, или любой сорт или подвид, принадлежащий к одному из вышеупомянутых растений, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosom*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Setaria italica*, *Oryza minuta*, *Oriza sativa*, *Oryza australiensis*, *Oryza alta*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Secale cereale*, *Triticale*, *Hordeum marinum*, *Aegilops tauschii*, или любой сорт или подвид, принадлежащий к одному из вышеупомянутых растений, или в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Secale cereale*, или любой сорт или подвид, принадлежащий к одному из вышеупомянутых растений.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растение по настоящему изобретению представляет собой *Zea mays*.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует полипептид, который представляет собой рецептор-подобные киназы 1 (WAK RLK1), ассоциированные со стенкой, или функционально принадлежит к семейству рецептор-подобных киназ 1, ассоциированных со стенкой.

В другом аспекте, предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Вектор может представлять собой плазмиду, космиду, бактериофаг или экспрессионный вектор, вектор для трансформации, бифункциональный вектор или клонирующий вектор, он может быть двухцепочечным или одноцепочечным, линейным или кольцевым, или он может представлять собой прокариотического или эукариотического хозяина, в геном которого он внесен либо посредством интеграции, либо посредством трансформации экстрахромосомно.

Также предложена экспрессионная кассета, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в векторе или экспрессионной кассете, нуклеотидная последовательность по настоящему изобретению функционально сцеплена с регуляторным элементом, обеспечивающим экспрессию нуклеотидной последовательности в растительной клетке. Растительная клетка может быть подвержена инфицированию патогенным грибом или быть инфицированной патогенным грибом. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растительная клетка расположена в листе или в ткани листа. Регуляторный элемент может представлять собой промотор (нативный, синтетический, основной промотор или химерный промотор), терминатор, энхансер или цис-действующий элемент. Кроме того, регуляторный элемент может быть гетерологичным по отношению к нуклеотидной последовательности, функционально сцепленной с регуляторным элементом.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению функционально сцеплена в экспрессионном векторе с, по меньшей мере, одной регуляторной последовательностью, которая обеспечивает осуществление транскрипции и необязательную экспрессию в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. В качестве примера, нуклеотидная последовательность может находиться под контролем подходящего промотора или терминатора. Подходящие промоторы могут представлять собой промоторы, которые являются конститутивно индуцированными (см., например, промотор 35S из «вируса мозаики цветной капусты» (Оделл Дж.Т., Нэги Ф., Чуа Н.Х. (1985) «Идентификация последовательностей ДНК, необходимых для активности промотора 35S вируса мозаики цветной капусты». *Nature* 313, 810-812, 1985); другие примеры - Актиновый промотор *Oryza sativa* (SEQ ID NO: 43) или промотор EF1 *Brachypodium distachyon* (SEQ ID NO: 44). Особенно подходящими промоторами являются такие промоторы, которые являются патоген-индуцируемыми (см., например, промотор PR1 из петрушки (Раштон П.Дж., Торрес Дж.Т., Парниске М., Вернерт П., Халброк К. и Сомсич И.Е. (1996) Взаимодействие элиситор-индуцированных ДНК-связывающих белков с элементами ответа элиситора в промоторах генов петрушки PR1. *EMBO J.* 15(20): 5690–5700). Особенно подходящими патоген-индуцируемыми промоторами являются синтетические или химерные промоторы, которые не встречаются в природе, которые состоят из нескольких элементов, а также содержат минимальный промотор, и выше минимального промотора у них имеется, по меньшей мере, один цис-регуляторный элемент, который действует в качестве сайта связывания для

специфичных факторов транскрипции. Химерные промоторы являются специально сконструированными и индуцированными различными факторами или повторно примированными. Примеры таких промоторов можно найти в документах WO 2000/29592 и WO 2007/147395. Примером подходящего терминатора является терминатор нопалин-синтазы (Депикер А., Штахель С., Дхезе П., Замбриски П., Гудмен Х.М. (1982) Нопалин-синтаза: картирование транскрипта и последовательности ДНК. J Mol Appl Genet. 1(6): 561-73).

Также предложена клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или вектор по настоящему изобретению, или экспрессионную кассету по настоящему изобретению.

Вектор или экспрессионная кассета может, например, быть введен в клетку-хозяина посредством конъюгации, мобилизации, биолистической трансформации, *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, трансфекции, трансдукции, вакуумной инфильтрации или электропорации. Способы этого типа, а также способы получения описанных векторов известны специалисту в данной области техники (Сэмбрук и др., Молекулярное клонирование, Cold Spring Harbor Laboratory, 3-е издание, 2001).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку (например, бактериальную клетку). В одном варианте осуществления настоящего изобретения, клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку (например, растительную клетку или дрожжевую клетку). Особенно предпочтительными бактериальными клетками-хозяевами являются *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* и *E. coli*.

В другом аспекте, предложен белок, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

В еще одном аспекте, предложено растение, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, экспрессионную кассету по настоящему изобретению или белок по настоящему изобретению. Растение может представлять собой трансгенное растение или генетически отредактированное растение. Также предложены: часть растения по настоящему изобретению, растительная клетка растения по настоящему изобретению и семя растения по настоящему изобретению, при этом, семя содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению трансгенно или эндогенно, вектор по настоящему изобретению, экспрессионную кассету по настоящему изобретению или полипептид по настоящему изобретению.

Из документа WO 2015/032494, в котором исследованы и использованы линии интрогрессии с *Htn1* из *Pepitilla*; известно, что этот локус устойчивости тесно сцеплен с геномными областями, несущими сцепленный груз, что приводит к отрицательным эффектам по одному или нескольким агрономическим признакам. Первое исследование фланкирующей области HT2 показало, что этот или аналогичный сцепленный груз присутствует не только у донора *Pepitilla* для интрогрессии

HtN1, но также и у других доноров для такого локуса устойчивости к *Helminthosporium*, как A619. В частности, сцепленный груз, как часть интрогрессии HT2, может влиять на разницу во времени цветения, что является важной агрономической характеристикой. Это может непосредственно и существенным образом влиять на потенциальный урожай растения *Zea mays*. Задержка времени цветения обычно приводит к снижению урожайности. Кроме того, сцепленный груз, влияющий на потенциал урожайности, в частности, потенциал урожайности силоса, может оказаться на дистальном и/или проксимальном расстоянии от локуса устойчивости к *Helminthosporium* у 8,06 пар оснований у *Zea mays*. Фланкирующие области, тесно сцепленные с этим локусом устойчивости, могут быть носителями известного сцепленного груза, однако эти области могут быть ограничены интервалом, расположенным между аллелями маркера SYN14136 и маркера MA0021, и/или интервалом, расположенным между аллелями маркера MA0022 и маркера SYN4196 (ФИГУРА 6). Таким образом, растение по настоящему изобретению может представлять собой растение вида *Zea mays*, эндогенно содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, при этом, фланкирующие области в геноме не содержат интервал, полученный из A619HT2 или A619HT3, расположенный между аллелями маркера SYN14136 и маркера MA0021, или интервал, полученный из A619HT2 или A619HT3, расположенный между аллелями маркера MA0022 и маркера SYN4196. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растение представляет собой растение вида *Zea mays*, эндогенно содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, при этом, фланкирующие области в геноме не содержат интервал, полученный из A619HT2 или A619HT3, расположенный между аллелями маркера SYN14136 и маркера PZE108077560, или интервал, полученный из A619HT2 или A619HT3, расположенный между аллелями маркера PZE108093423 и маркера MA0021, или интервал, полученный из A619HT2 или A619HT3, расположенный между аллелями маркера MA0022 и маркера SYN4196.

Таблица 2: Последовательности праймеров маркеров KASP и их передача донорским аллелям (аллель X и аллель Y: описывают биаллельные значения SNP)

Маркер SNP	Положение маркера AGPv02 [пар оснований]	Аллели праймера X(5'-3') [SEQ ID NO]	Аллели праймера Y(5'-3') [SEQ ID NO]	Обычный праймер (5'-3') [SEQ ID NO]	Донорские аллели A619HT2 (SNP)
SYN14136	131681497	25	26	27	A
PZE-108077560	133189880	28	29	30	A
PZE-108093423	150279048	31	32	33	A
MA0021	151907173	34	35	36	G
MA0022	152046529	37	38	39	A

SYN4196	161766769	40	41	42	C
---------	-----------	----	----	----	---

Например, удаление сцепленного груза может быть осуществлено путем генетической рекомбинации во время процесса скрещивания между двумя растениями кукурузы, при этом, одно родительское растение кукурузы несет locus устойчивости HT2. В дополнение к использованию традиционных методов селекции, для получения генетической рекомбинации, в результате которой происходит замена, по меньшей мере, одного из донорских интервалов с помощью указанного выше сцепленного груза на геномные последовательности рекуррентного родителя, которые, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, не содержат нежелательных генов, современная биотехнология предлагает специалисту в данной области техники множество инструментов, которые могут позволить осуществить точную генную инженерию. Примерами известных инструментов являются мегануклеазы (Силва и др., 2011), хоуминг-эндонуклеазы (Шевалье 2002), цинк-пальцевые нуклеазы, нуклеазы TALE (WO 2010/079430; WO 2011/072246) или системы CRISPR (Гай и др., 2013). Это – белки слияния искусственных нуклеаз, которые способны расщеплять двухцепочечные молекулы нуклеиновой кислоты, такие как, ДНК растения, и, таким образом, производить двухцепочечные разрывы в желаемых положениях в геноме. Используя собственные клеточные механизмы для репарации индуцированных двухцепочечных разрывов, можно осуществить гомологичную рекомбинацию или «негомологичное соединение концов», что может привести к удалению интервалов сцепленного груза, несущего донора. Подходящие последовательности-мишени в геноме для распознавания доменных нуклеаз могут быть взяты, например, из информации о последовательностях маркеров SNP (Таблица 2). Однако специалист в данной области техники также способен идентифицировать другие последовательности, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – в пределах определенных фланкирующих областей, описанных выше, которые подходят в качестве последовательностей-мишеней для доменов распознавания нуклеаз.

В другом аспекте, предложено генетически отредактированное или трансгенное растение, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению или экспрессионную кассету по настоящему изобретению. Молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой трансгенный или модифицированный/отредактированный эндогенный ген. Промотор может быть функционально сцеплен с молекулой нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательностью для экспрессии.

Также предложена часть или семя растения по настоящему изобретению, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению или экспрессионную кассету по настоящему изобретению, при этом, семя содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению,

экспрессионную кассету по настоящему изобретению. Молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой трансгенный или модифицированный/отредактированный эндогенный ген.

Согласно другому аспекту, предложен способ идентификации или выбора растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – растения вида *Zea mays*, обладающего повышенной устойчивостью к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N, или его части, клетки или семени, содержащий следующие этапы: (а) определение в растении или его части, клетке или семени (или в образце растения, или его части, клетки или семени), присутствия молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, как описано выше, или нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: (i) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60%-ую, 65%-ую, 70%-ую, 75%-ую, 80%-ую, 85%-ую, 90%-ую, 92%-ую, 94%-ую, 96%-ую, 98%-ую, 99%-ую или 99,5%-ую идентичность с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине, (ii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 60%-ую, 65%-ую, 70%-ую, 75%-ую, 80%-ую, 85%-ую, 90%-ую, 92%-ую, 94%-ую, 96%-ую, 98%-ую, 99%-ую или 99,5%-ую идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине, (iii) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 85%-ую, 90%-ую, 92%-ую, 94%-ую, 96%-ую, 98%-ую, 99%-ую или 99,5%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 1-920 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 (Экзон 1; SEQ ID NO: 6), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине, и/или имеющей, по меньшей мере, 60%-ую, 65%-ую, 70%-ую, 75%-ую, 80%-ую, 85%-ую, 90%-ую, 92%-ую, 94%-ую, 96%-ую, 98%-ую, 99%-ую или 99,5%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 23252-23288 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 (Экзон 2; SEQ ID NO: 7), или с положениями нуклеотидов 921-957 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2 (Экзон 2; SEQ ID NO: 7), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине, и/или имеющей, по меньшей мере, 98%-ую, 98,5%-ую, 99%-ую, 99,5%-ую, 23586-24632%-ую, 85%-ую, 90%-ую, 92%-ую, 94%-ую, 96%-ую, 98%-ую, 99%-ую или 99,5%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 23252-23288 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 (Экзон 3; SEQ ID NO: 8), или с положениями нуклеотидов 958-2004 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2 (Экзон 3; SEQ ID NO: 8), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине, (iv) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%-ую, 80%-ую, 85%-ую, 90%-ую, 92%-ую, 94%-ую, 96%-ую, 98%-ую, 99%-

ую или 99,5%-ую идентичность с положениями 1-306 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине, и/или имеющей, по меньшей мере, 60%-ую, 65%-ую, 70%-ую, 75%-ую, 80%-ую, 85%-ую, 90%-ую, 92%-ую, 94%-ую, 96%-ую, 98%-ую, 99%-ую или 99,5%-ую идентичность с положениями 307-319 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине, и/или имеющей, по меньшей мере, 98%-ую, 98,5%-ую, 99%-ую или 99,5%-ую идентичность с положениями 320-668 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине, при этом, молекула нуклеиновой кислоты по любому из пунктов (i)-(iv) кодирует полипептид, способный придавать или повышать устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N, у растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – у растения вида *Zea mays*, в котором экспрессируется полипептид, и, при этом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты по любому из пунктов (i)-(iv) кодирует полипептид, который является или функционально принадлежит к семейству рецептор-подобных киназ 1 (WAK RLK1), ассоциированных со стенкой; или определение в растении, или его части, клетке или семени (или в образце растения, или его части, клетке или семени) присутствия полипептида, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, как описано выше, или нуклеотидной последовательности по любому из пунктов (i)-(iv), и (b) идентификацию или выбор растения, в котором или в части, клетке или семени которого присутствует молекула нуклеиновой кислоты, как определено в пункте (a), как обладающая устойчивостью или повышенной устойчивостью к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N.

Способ может содержать дополнительный этап получения образца нуклеиновой кислоты из растения или его части, клетки, или семени и определения последовательности в образце. Например, этап получения образца нуклеиновой кислоты из растения или его части, или семени может быть осуществлен до этапа определения (a).

Определение нуклеотидной последовательности может быть осуществлено способом гибридизации с использованием олигонуклеотидного зонда. Условия гибридизации могут быть подобраны соответствующим образом в зависимости от таких факторов, как значение Tm используемого зонда и содержание CG в ДНК-мишени. Известные способы гибридизации описаны, например, в работе Сэмбрук и др., 2001.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, определение гена может быть осуществлено посредством способа амплификации ДНК, такого как, PCR, с использованием соответствующих праймеров. Когда определение осуществляется способом PCR, то условия PCR могут быть соответствующим образом выбраны, в зависимости от таких факторов, как значение T_m используемого праймера и длина амплифицируемой области, подлежащей определению. Определение может быть осуществлено путем амплификации мишени посредством PCR и подтверждения присутствия или отсутствия PCR-амплифицированного продукта. Способ подтверждения присутствия или отсутствия продукта амплификации не особенно ограничен. Например, продукт амплификации может быть подтвержден путем подвергания электрофорезу в агарозном геле реакционной смеси для амплификации нуклеиновой кислоты; затем, путем окрашивания геля соответствующим реагентом для окрашивания нуклеиновых кислот, таким как, бромидистый этидий, SYBER Green I и т.п.; и путем определения присутствия или отсутствия полос, возникающих в результате облучения ультрафиолетовыми лучами. Полосы могут быть определены визуальным наблюдением, или они могут быть определены посредством использования, например, флуоресцентного анализатора изображения или тому подобного.

Также предложен способ или метод идентификации растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – растения вида *Zea mays*, имеющего повышенную устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N, или части, имеющей повышенную устойчивость к заболеванию растений, вызываемому *Helminthosporium turcicum*, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N, и она содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению эндогенно, его клетку или семя, способ или метод, содержащий определение в аллелях растения, по меньшей мере, двух маркеров, при этом, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на или в пределах хромосомного интервала между SYN14136 и молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на или в пределах хромосомного интервала между молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и SYN4196. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, способ или метод, содержащий определение в аллелях растения, по меньшей мере, двух маркеров, при этом, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на или в пределах хромосомного интервала между PZE108093423 и молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, и по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на или в пределах хромосомного интервала между молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и SYN4196.

В другом аспекте, предложен способ идентификации аллеля гена устойчивости, придающего или повышающего устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*,

в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, у *Zea mays* и в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – кодирующего полипептид, который является или функционально принадлежит к семейству рецептор-подобных киназ 1 (WAK RLK1), ассоциированных со стенкой, при этом, способ содержит следующие этапы: (a) проведение сравнения последовательностей с использованием (i), по меньшей мере, одной кодирующей нуклеотидной последовательности, выделенной из генотипа *Zea mays*, при этом, нуклеотидная последовательность, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, соответствует локусу устойчивости из 8,05 пар оснований или локусу устойчивости из 8,06 пар оснований, и (ii), в качестве эталонной последовательности, нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, или ее части, или консенсусной последовательности, полученной из набора, по меньшей мере, двух нуклеотидных последовательностей, при этом, одна нуклеотидная последовательность представляет собой нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, или ее части, и, при этом, каждая нуклеотидная последовательность набора, по меньшей мере, двух нуклеотидных последовательностей кодирует полипептид, способный придавать или повышать устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 или N, у *Zea mays*, в котором экспрессируется полипептид, и, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, соответствует локусу устойчивости из 8,05 пар оснований или локусу устойчивости из 8,06 пар оснований, и, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, кодирующая полипептид, который является или функционально принадлежит к семейству рецептор-подобных киназ 1 (WAK RLK1), ассоциированных со стенкой, и (b) идентификацию аллеля, если сравнение последовательностей выявляет (i) идентичность последовательности на уровне нуклеотидов, составляющую, по меньшей мере, 85%-ую, 90%-ую, 92%-ую, 94%-ую, 96%-ую, 98%-ую, 99%-ую или 99,5%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 1-920 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине, и/или составляющую, по меньшей мере, 60%-ую, 65%-ую, 70%-ую, 75%-ую, 80%-ую, 85%-ую, 90%-ую, 92%-ую, 94%-ую, 96%-ую, 98%-ую, 99%-ую или 99,5%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 23252-23288 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, или

с положениями нуклеотидов 921-957 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине, и/или составляющую, по меньшей мере, 98%-ую, 98,5%-ую, 99%-ую или 99,5%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 23586-24632 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, или с положениями нуклеотидов 958-2004 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине, и/или (ii) идентичность последовательности на уровне кодируемой аминокислоты, составляющую, по меньшей мере, 75%-ую, 80%-ую, 85%-ую, 90%-ую, 92%-ую, 94%-ую, 96%-ую, 98%-ую, 99%-ую или 99,5%-ую идентичность с положениями 1-306 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине, и/или составляющую, по меньшей мере, 60%-ую, 65%-ую, 70%-ую, 75%-ую, 80%-ую, 85%-ую, 90%-ую, 92%-ую, 94%-ую, 96%-ую, 98%-ую, 99%-ую или 99,5%-ую идентичность с положениями 307-319 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине, и/или составляющую, по меньшей мере, 98%-ую, 98,5%-ую, 99%-ую или 99,5%-ую идентичность с положениями 320-668 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по всей длине.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, консенсусная последовательность получена из набора, по меньшей мере, двух нуклеотидных последовательностей, при этом, одна нуклеотидная последовательность представляет собой нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, или ее часть, и, при этом, другая нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, или ее части, нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11, или ее части, нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13, или ее части, нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, или ее части, нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, или ее части, нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее части, нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или ее части, или нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24 или ее части.

По меньшей мере, одна кодирующая нуклеотидная последовательность, выделенная из генотипа *Zea mays* этапа (a) (i), может быть получена из базы данных последовательностей растений или из банка генов, в котором хранятся образцы различных генотипов *Zea mays*. Базы данных последовательностей растений или банки генов известны в этой области техники.

Способ идентификации (нового) аллеля гена устойчивости (или потенциального нового аллеля гена устойчивости), придающего устойчивость или повышенную устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, может дополнительно содержать, например, в качестве этапа (c), этап определения уровня устойчивости растения к патогенному грибу, вызванной идентифицированным аллелем.

Также предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности, кодирующей аллель гена устойчивости (или потенциальный новый аллель), идентифицированный вышеописанным способом идентификации. Указанный аллель может быть использован в способе получения растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – растения вида *Zea mays*, или в способе придания/повышения устойчивости к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, таким как, *Helminthosporium turcicum*, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, способ по настоящему изобретению получения растения или способ по настоящему изобретению придания/повышения устойчивости к заболеванию растений дополнительно содержит на этапе (a) введение, по меньшей мере, одной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из нуклеотидной последовательности, кодирующей новый ген устойчивости, в, по меньшей мере, одной клетке растения.

В другом аспекте, предложен способ придания или повышения устойчивости к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, у растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – у растения вида *Zea mays*, содержащий следующие этапы: (a) введение в, по меньшей мере, одну клетку растения молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, включая, например, молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из нуклеотидной последовательности идентифицированного аллеля, экспрессионной кассеты по настоящему изобретению или вектора по настоящему изобретению, (b) регенерацию растения из, по меньшей мере, одной клетки и (c) вызывание экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты у растения.

В предпочтительном варианте осуществления способа придания или повышения устойчивости к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, этап (a) приводит к модификации эндогенной молекулы нуклеиновой кислоты, придающей чувствительность к заболеванию

растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, соответствующей локусу устойчивости из 8,05 пар оснований или локусу устойчивости из 8,06 пар оснований на хромосоме 8 *Zea mays*, и, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, кодирующей полипептид, который является или функционально принадлежит к семейству рецептор-подобных киназ 1 (WAK RLK1), ассоциированных со стенкой, при этом, модификация преобразует эндогенную молекулу нуклеиновой кислоты в молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, придающую устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, при условии ее экспрессии.

В другом предпочтительном варианте осуществления способа придания или повышения устойчивости к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, этап (а) приводит к модификации эндогенной молекулы нуклеиновой кислоты, придающей чувствительность к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, соответствующей локусу устойчивости из 8,05 пар оснований или локусу устойчивости из 8,06 пар оснований на хромосоме 8 *Zea mays*, и, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, кодирующей полипептид, который является или функционально принадлежит к семейству рецептор-подобных киназ 1 (WAK RLK1), ассоциированных со стенкой, при этом, модификация преобразует эндогенную молекулу нуклеиновой кислоты в молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, придающую повышенную устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, при условии ее экспрессии.

Также предложен способ повышения устойчивости к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, у растения по настоящему изобретению, содержащий этапы уменьшения уровня экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, включая, например, молекулу

нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из нуклеотидной последовательности идентифицированного аллеля, экспрессионной кассеты по настоящему изобретению или вектора по настоящему изобретению, у растения или в, по меньшей мере, одной клетке растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по сравнению с уровнем экспрессии эндогенного гена у устойчивого растения дикого типа. Такое устойчивое растение дикого типа, например, выбрано из линий А619НТ2, В37НТ2 или В73НТ2. Уменьшение может проводиться транзистентно или длительно, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – в качестве превентивной меры, если ожидается инфицирование патогенным грибом, например, из-за особых условий окружающей среды, которые влияют на распространение патогенного гриба. Специалисту в данной области техники очень хорошо известны различные методологии уменьшения экспрессии гена у растения. Длительное уменьшение уровня экспрессии может быть достигнуто, например, путем модуляции промотора или других регуляторных элементов посредством случайного или целенаправленного мутагенеза или путем стабильной интеграции экспрессионной кассеты, что позволяет экспрессировать двухцепочечную РНК, одноцепочечную антисмысловую РНК или шпилечную ДНК, которые способны подавлять, как интерферирующую РНК, mРНК, кодируемую молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Такая ингибирующая молекула РНК, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – в виде молекул siРНК, может также использоваться для транзистентного уменьшения уровня экспрессии, если она наносится на растения в виде спрея и активно или пассивно поглощается растительными клетками, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – клетками листьев.

В другом аспекте, предложен способ получения растения (или его части, клетки или семени), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – растения вида *Zea mays*, имеющего (повышенную) устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, или его части, клетки или семени, содержащий следующие этапы: (а) введение в растение или, по меньшей мере, в одну клетку растения молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, включая, например, молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из нуклеотидной последовательности идентифицированного аллеля, экспрессионной кассеты по настоящему изобретению или вектора по настоящему изобретению, (b) необязательную регенерацию растения из, по меньшей мере, одной клетки и (с) вызывание экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты у растения или его части.

В предпочтительном варианте осуществления способа по настоящему изобретению получения растения (или его части, клетки или семени) вида *Zea mays*, этап (а) приводит к модификации эндогенной молекулы нуклеиновой кислоты, придающей чувствительность к заболеванию

растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, соответствующей локусу устойчивости из 8,05 пар оснований или локусу устойчивости из 8,06 пар оснований на хромосоме 8 *Zea mays*, и, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, кодирующей полипептид, который является или функционально принадлежит к семейству рецептор-подобных киназ 1 (WAK RLK1), ассоциированных со стенкой, при этом, модификация преобразует эндогенную молекулу нуклеиновой кислоты в молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, придающую устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, при условии ее экспрессии.

В другом предпочтительном варианте осуществления способа по настоящему изобретению получения растения (или его части, клетки или семени) вида *Zea mays*, этап (а) приводит к модификации эндогенной молекулы нуклеиновой кислоты, придающей устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, соответствующей локусу устойчивости из 8,05 пар оснований или локусу устойчивости из 8,06 пар оснований на хромосоме 8 *Zea mays*, и, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, кодирующей полипептид, который является или функционально принадлежит к семейству рецептор-подобных киназ 1 (WAK RLK1), ассоциированных со стенкой, при этом, модификация преобразует эндогенную молекулу нуклеиновой кислоты в молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, придающую повышенную устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, при условии ее экспрессии.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, способ заключается в получении растения (или его части, клетки или семени), имеющего повышенную устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, таким как, *Helminthosporium turcicum*, предпочтительно *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N. Соответственно, этот способ может содержать дополнительный этап (d) выбора растения, имеющего повышенную устойчивость, по сравнению с эталонным растением. В

предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, эталонное растение представляет собой растение того же вида, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, эталонное растение представляет собой растение дикого типа того же вида или растение, являющееся изогенным по отношению к растению, выбранному на этапе (d), ожидаемое для молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая была введена на этапе (a) или модифицирована на этапе (a), как описано выше.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в способах по настоящему изобретению, молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению экспрессируют у растения или его части в количестве и/или в течение периода, достаточного для повышения или придания устойчивости к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом у растения.

В другом аспекте, предложено растение, полученное способами по настоящему изобретению, или его потомство, плод или семя. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растение или его потомство, плод или семя содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или вектор по настоящему изобретению, или белок по настоящему изобретению, и/или клетку по настоящему изобретению.

В другом аспекте, предложено использование, по меньшей мере, одной молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, включая, например, молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из нуклеотидной последовательности идентифицированного нового аллеля гена устойчивости, для получения растения, имеющего повышенную устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* расы 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N. Полученное растение может представлять собой генетически отредактированное или трансгенное растение.

Также предложен способ борьбы с инфицированием патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1, 2, 3, N, 12, 23, 2N, 12N, 23N и/или 123N, содержащий следующие этапы: (a) выращивание растений по настоящему изобретению на сельскохозяйственных и садовых участках и (b) вызывание экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, включая, например, молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из нуклеотидной последовательности идентифицированного аллеля, экспрессионной кассеты по настоящему изобретению или вектора по настоящему изобретению, у растений.

Другим аспектом настоящего изобретения является олигонуклеотид, имеющий в длину, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по меньшей мере, 21, 22, 23, 24 или 25, в более предпочтительном варианте

осуществления настоящего изобретения – по меньшей мере, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200, 300 или 500 нуклеотидов, при этом, олигонуклеотид способен гибридизоваться или отжигаться с (i) молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, (ii) молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, или (iii) молекулой нуклеиновой кислоты, комплементарной (i) или (ii). В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, олигонуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%-ую, 92%-ую, 94%-ую, 95%-ую, 96%-ую, 97%-ую, 98%-ую, 98,5%-ую, 99%-ую, 99,5%-ую или 100%-ую идентичность с нуклеотидной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты из пунктов (i), (ii) или (iii), с которой олигонуклеотид способен гибридизоваться или отжигаться.

Также предложена пара олигонуклеотидов или набор, содержащий указанные олигонуклеотиды, при этом, олигонуклеотиды подходят для отжига в качестве прямого праймера и обратного праймера для области в геноме растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – в геноме *Zea mays*, который проявляет косегрегацию, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – идеальную косегрегацию, с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, пара содержит один или два олигонуклеотида по настоящему изобретению. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, набор содержит один или, по меньшей мере, два олигонуклеотида по настоящему изобретению.

В другом аспекте, предложено использование, по меньшей мере, одного олигонуклеотида в качестве молекулярного маркера или его части в способе идентификации или выбора растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – растения вида *Zea mays*, имеющего повышенную устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N, или его части, клетки или семени, или в способе идентификации аллеля гена устойчивости, придающего или повышающего устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum*, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – *Helminthosporium turcicum* рас 0, 1 и/или N, в *Zea mays*, при этом, молекулярный маркер способен определять, по меньшей мере, один однонуклеотидный полиморфизм, проводить диагностику делеции или вставки для молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и/или содержит олигонуклеотид, как описано выше, и/или представляет собой пару олигонуклеотидов или набор, как описано выше. Такой однонуклеотидный полиморфизм, делеция или вставка могут быть непосредственно получены из выравнивания последовательностей, показанного на ФИГУРЕ 2. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один однонуклеотидный

полиморфизм, делеция или вставка приводит к обмену, делеции или вставке, по меньшей мере, одной аминокислоты. В Таблице 2 показаны характерные аминокислотные обмены, делеция или вставки из сравнения полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, с полипептидом RLK 1 (SEQ ID NO: 10), придающим фенотип устойчивости «Pepitilla», раскрытый в документе WO 2015/032494.

В другом аспекте, предложен способ определения присутствия или отсутствия молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, включая, например, молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из нуклеотидной последовательности идентифицированного аллеля, у растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – у растения вида *Zea mays*, содержащий следующие этапы: (a) выделение ДНК из, по меньшей мере, одной клетки растения и (b) использование молекулярного маркера для определения присутствия или отсутствия молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, при этом, молекулярный маркер способен определять, по меньшей мере, один однонуклеотидный полиморфизм, проводить диагностику делеции или вставки для молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и/или содержит олигонуклеотид, как описано выше, и/или представляет собой пару олигонуклеотидов или набор, как описано выше.

В одном аспекте, предложено использование, по меньшей мере, одного олигонуклеотида или, по меньшей мере, двух олигонуклеотидов в качестве молекулярного маркера или его части в способе или методе идентификации растения, как описано выше, в способе или методе элиминации сцепленного груза, тесно сцепленного с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, для определения присутствия или отсутствия интервала, полученного из A619HT2 или A619HT3, расположенного между аллелями маркера SYN14136 и маркера MA0021, или интервала, полученного из A619HT2 или A619HT3, расположенного между аллелями маркера MA0022 и маркера SYN4196. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один олигонуклеотид используется в качестве молекулярного маркера или его части в способе или методе элиминации сцепленного груза, тесно сцепленного с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, для определения присутствия или отсутствия интервала, полученного из A619HT2 или A619HT3, расположенного между аллелями маркера SYN14136 и маркера PZE108077560, интервала, полученного из A619HT2 или A619HT3, расположенного между аллелями маркера PZE108093423 и маркера MA0021, и/или интервала, полученного из A619HT2 или A619HT3, расположенного между аллелями маркера MA0022 и маркера SYN4196.

В другом аспекте, предложен способ определения присутствия молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, включая, например, молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из нуклеотидной последовательности идентифицированного аллеля, у растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – у растения вида *Zea mays*, содержащий следующие этапы: (a) выделение ДНК из, по меньшей мере, одной клетки растения и

(b) использование молекулярного маркера для определения присутствия или отсутствия молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, при этом, молекулярный маркер способен определять, по меньшей мере, один однонуклеотидный полиморфизм, проводить диагностику делеции или вставки для молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и/или содержит олигонуклеотид, как описано выше, и/или представляет собой пару олигонуклеотидов или набор, как описано выше. Такой однонуклеотидный полиморфизм, делеция или вставка могут быть непосредственно получены из выравнивания последовательностей, показанного на ФИГУРЕ 2. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один однонуклеотидный полиморфизм, делеция или вставка приводит к обмену, делеции или вставке, по меньшей мере, одной аминокислоты. В Таблице 3 показаны характерные аминокислотные обмены, делеция или вставки из сравнения полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, с полипептидом RLK 1, придающим фенотип устойчивости «Pepitilla» (SEQ ID NO: 10), раскрытый в документе WO 2015/032494.

Таблица 3: Характерные аминокислотные обмены, делеция или вставки из сравнения полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, с полипептидом RLK 1 (SEQ ID NO: 10), придающим фенотип устойчивости «Pepitilla», раскрытый в документе WO 2015/032494 (см. также ФИГУРУ 3).

Положение	HTN	HT2	эффект	Экзон
5	Q	L	сильный	Экзон 1
7	H	R	слабый	Экзон 1
9	S	P	слабый	Экзон 1
27	G	A	слабый	Экзон 1
36	N	S	слабый	Экзон 1
51	A	V	сильный	Экзон 1
56		E		Экзон 1
75	I	T	сильный	Экзон 1
95	E	K	слабый	Экзон 1
101	S	P	слабый	Экзон 1
102	P	T	слабый	Экзон 1
114	G	D	сильный	Экзон 1
115	D	N	слабый	Экзон 1
122	S			Экзон 1
123	Y			Экзон 1
127	Q	Y	слабый	Экзон 1
128	Q	H	умеренный	Экзон 1
135	R	S	умеренный	Экзон 1
142	G	E	сильный	Экзон 1
147	R	H	умеренный	Экзон 1
157	L			Экзон 1
158	H			Экзон 1
162	A	P	умеренный	Экзон 1
180	N	D	слабый	Экзон 1
182	P	L	сильный	Экзон 1
187	D	G	сильный	Экзон 1
188	Y	N	слабый	Экзон 1
196	N	S	слабый	Экзон 1
199	T	A	умеренный	Экзон 1

204	R	G	сильный	Экзон 1
210	T	P	слабый	Экзон 1
211	G	E	умеренный	Экзон 1
216	Q	H	слабый	Экзон 1
217	E	A	сильный	Экзон 1
223	L	S	сильный	Экзон 1
235	R	S	слабый	Экзон 1
236	D	E	слабый	Экзон 1
239		Q		Экзон 1
246	F	L	слабый	Экзон 1
249	T	G	умеренный	Экзон 1
250	R			Экзон 1
256	V	L	умеренный	Экзон 1
261	F	I	сильный	Экзон 1
266	N	K	слабый	Экзон 1
275	R	Q	слабый	Экзон 1
278	G	E	умеренный	Экзон 1
284	W	R	сильный	Экзон 1
297	L	F	слабый	Экзон 1
303	V	A	сильный	Экзон 1
305	S	N	слабый	Экзон 1
314		T		Экзон 2
315		K		Экзон 2
316	K	R	слабый	Экзон 2
318	K	E	слабый	Экзон 2
319	E	A	сильный	Экзон 2
320	G	A	слабый	Экзон 2
321	P	S	слабый	Экзон 2
345	G	C	сильный	Экзон 3
352	E	K	слабый	Экзон 3
368		S		Экзон 3
566	I	T	сильный	Экзон 3

Определения

Термин «устойчивость» или «устойчивый», применяемый в отношении патогена, следует понимать как способность растения, растительной ткани или растительной клетки противостоять повреждающему воздействию патогена и включает манифестацию эффектов от задержки развития заболевания до полного подавления развития заболевания. Устойчивость может быть полной или частичной и может быть специфичной или неспецифичной для расы патогена. Приданная устойчивость может быть вновь переданной по наследству устойчивостью или повышением уже существующей частичной устойчивости.

Устойчивость может быть количественно определена способами, известными в данной области техники. Например, устойчивость к *Helminthosporium turcicum* может быть количественно определена путем определения классификационных баллов с помощью экспериментов по фенотипированию в соответствии со схемой, показанной в Таблице 4 ниже. Например, растение кукурузы, устойчивое к *Helminthosporium turcicum*, по смыслу настоящего изобретения, демонстрирует «повышенную устойчивость» к *H. turcicum* на, по меньшей мере, 1

классификационный балл, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, на, по меньшей мере, 2 классификационных балла или на, по меньшей мере, 3 классификационных балла, и в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения на, по меньшей мере, 4 классификационных балла. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растение кукурузы, в соответствии с настоящим изобретением, демонстрирует устойчивость к, по меньшей мере, одной расе *Helminthosporium turcicum*, которая не соответствует известной расовой специфичности, известной из уровня техники. В особо предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растение кукурузы по настоящему изобретению устойчиво ко всем известным расам *Helminthosporium turcicum*, то есть, приданная устойчивость не является расоспецифичной и может обладать особым преимуществом при формировании широкой устойчивости к *Helminthosporium turcicum*.

Таблица 4: Схема классификационных баллов в экспериментах по фенотипированию в опытно-методических испытаниях, проведенных в различных местоположениях с естественной и искусственной инокуляцией *H. turcicum* (на основании материалов Немецкого кукурузного комитета (Deutsche Maiskomitee, DMK); разновидность AG от 27.02.02; (DMK, Дж. Рат; Управление округа Фрайбурга Х.Дж. Имграбен)

Классификационный балл	Фенотип
1	Растения не демонстрируют симптомов заболевания, 0%
2	Начало инфицирования, сначала видны небольшие пятна (менее 2 см). Поражено менее 5% поверхности листа.
3	Некоторые пятна развились на стадии листа. Поражено 5-10% поверхности листа.
4	Поражено 10-20% поверхности листа. Отчетливо видны пятна на нескольких стадиях листа.
5	Поражено 20-40% поверхности листа. Пятна начинают коалесцироваться.
6	Поражено 40-60% поверхности листа. Заметно системное инфицирование на листьях.
7	Поражено 60-80% поверхности листа. Примерно половина листьев испорчены или засохли из-за инфицирования грибом.
8	Поражено 80-90% поверхности листа. Более половины листьев испорчены или засохли из-за инфицирования грибом.
9	Поражено 90-100% поверхности листа. Растения почти полностью засохли.

Термин «гибридизироваться» или «гибридизация» следует понимать как процедуру, при которой молекула одноцепочечной нуклеиновой кислоты агломерируется с цепью нуклеиновой кислоты, которая является максимально комплементарной, то есть, образует с ней комплементарную пару оснований. Примеры стандартных способов гибридизации были описаны в 2001 году в работе Сэмбрук и др. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения,

подразумевается, что, по меньшей мере, 60%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по меньшей мере, 65%, 70%, 75%, 80% или 85%, в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% оснований молекулы нуклеиновой кислоты подвергаются спариванию оснований с цепью нуклеиновой кислоты, являющейся максимально комплементарной. Возможность такой агломерации зависит от жесткости условий гибридизации. Термин «жесткость» относится к условиям гибридизации. О высокой жесткости говорят, когда спаривание оснований происходит труднее, а о низкой жесткости говорят, когда спаривание оснований происходит легче. Жесткость условий гибридизации зависит, например, от концентрации соли или ионной силы и температуры. Как правило, жесткость может быть повышена путем повышения температуры и/или снижения содержания соли. Под термином «жесткие условия гибридизации» следует понимать такие условия, при которых гибридизация происходит преимущественно только между гомологичными молекулами нуклеиновой кислоты. Термин «условия гибридизации» в этом аспекте относится не только к фактическим условиям, преобладающим во время фактической агломерации нуклеиновых кислот, но также и к условиям, преобладающим во время последующих этапов промывки. Примерами крайне жестких условий гибридизации являются условия, при которых гибридизации подвергаются преимущественно только те молекулы нуклеиновой кислоты, которые имеют, по меньшей мере, 90%-ую или, по меньшей мере, 95%-ую идентичность последовательностей. Такими крайне жесткими условиями гибридизации являются, например: гибридизация в 4-х кратном SSC при 65° С с последующими многократными промывками в 0,1-кратном SSC при 65° С в течение, приблизительно, 1 часа. Используемый в настоящем документе термин «крайне жесткие условия гибридизации» также может означать: гибридизацию при 68° С в 0,25 М фосфата натрия, pH 7,2, 7% SDS, 1 mM EDTA и 1% BSA в течение 16 часов с последующей двукратной промывкой 2-кратным SSC и 0,1% SDS при 68° С. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, гибридизация происходит в жестких условиях. Менее жесткими условиями гибридизации являются, например: гибридизация в 4-кратном SSC при 37° С с последующими многократными промывками в 1-кратном SSC при комнатной температуре.

Настоящее изобретение охватывает молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие или состоящие из нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, причем указанный белок получен из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты. В настоящем документе термин «по меньшей мере, одна аминокислота» включает, например, от 1 до 50, от 1 до 40, от 1 до 30 или от 1 до 20, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – от 1 до 10, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – от 1 до 7, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – от 1 до 5 и в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – 1, 2 или 3 аминокислоты.

«Функционально сцепленный» означает сцепленный в общую молекулу нуклеиновой кислоты таким образом, что сцепленные элементы расположены и ориентированы друг к другу таким образом, что может произойти транскрипция молекулы нуклеиновой кислоты. ДНК, которая функционально сцеплена с промотором, регулируется этим промотором на уровне транскрипции.

Значение термина «введение», употребляемого в настоящем изобретении, включает стабильную интеграцию посредством трансформации, включая *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию, трансфекцию, микроинъекцию, биолистическую бомбардировку, вставку с использованием технологии редактирования генов, такой как, системы CRISPR (например, CRISPR/Cas, в частности, CRISPR/Cas9 или CRISPR/Cpf1), CRISPR/CasX или CRISPR/CasY), TALEN, цинк-пальцевые нуклеазы или мегануклеазы, гомологичную рекомбинацию необязательно посредством одной из вышеупомянутых технологий редактирования генов, включая, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, матрицу для репарации, модификацию эндогенного гена с использованием случайного или целенаправленного мутагенеза, такого как, TILLING или вышеупомянутая технология редактирования генов и тому подобное. Термин «введение» может или не может охватывать интрогрессию с использованием традиционной селекции.

Термин «трансгенный» или «трансген» означает, что соответствующий ген представляет собой экзогенный ген, который был введен в растение. Экзогенный ген может быть получен из вида, отличного от вида растения, в которое он введен. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, соответствующий ген может представлять собой ген, уже присутствующий в виде растения, в которое он введен, таким образом, в результате введения трансгена присутствует, по меньшей мере, одна дополнительная копия указанного гена. Термин «трансгенное растение» представляет собой растение, в геном которого был интегрирован, по меньшей мере, один полинуклеотид, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – гетерологичный полинуклеотид. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, полинуклеотид был интегрирован стабильным образом, а это означает, что интегрированный полинуклеотид стабильно поддерживается в растении, экспрессируется и также может стабильно передаваться по наследству потомству. Термин «гетерологичный» означает, что введенный полинуклеотид происходит, например, из одной клетки или организма, имеющего другой генетический фон одного и того же вида или другого вида, или он гомологичен прокариотической или эукариотической клетке-хозяину, но затем размещается в другой генетической среде и, таким образом, он отличается от любого возможного соответствующего полинуклеотида природного происхождения. Гетерологичный полинуклеотид может присутствовать в дополнение к соответствующему эндогенному гену.

«Органы» растения – это листья, стебли растений, соплодия, корни, вегетативные почки, меристемы, зародыши, пыльники, оплодотворенные яйцеклетки или плоды. Термин «части» растения может означать слияние нескольких органов, например, цветка или семени, или часть органа, например,

поперечный сегмент из стебля. Примерами «тканей» растений являются каллусная ткань, запасающая ткань, меристематическая ткань, эмбрионная ткань, листовая ткань, ткань почки, ткань корня, опухольная ткань растения или репродуктивная ткань. Под термином «клетки» растения понимают, например, выделенные растительные клетки, имеющие клеточную стенку, или их агрегаты, или протопласты.

Термин «генетически модифицированный» означает, что эндогенный ген модифицирован, например, посредством случайного мутагенеза, TILLING или технологии редактирования генов. Например, согласно настоящему изобретению, эндогенный ген растения может быть модифицирован для придания устойчивости (или повышенной устойчивости) к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом. Генетическая модификация может быть достигнута, например, с использованием способов случайного или целенаправленного мутагенеза (такого как, редактирование генов) или гомологичной рекомбинации (необязательно, с использованием инструментов редактирования генов) или их комбинаций.

Используемый в настоящем документе термин «модификация» означает, что генетическая последовательность изменилась на, по меньшей мере, один нуклеотид. Это может происходить путем замены, по меньшей мере, одного нуклеотида и/или делеции, по меньшей мере, одного нуклеотида, и/или вставки, по меньшей мере, одного нуклеотида до тех пор, пока не будет достигнуто полное изменение, по меньшей мере, одного нуклеотида, по сравнению с нуклеотидной последовательностью до модификации, что позволяет идентифицировать модификацию, например, с помощью таких методов, как секвенирование или PCR-анализ и тому подобных, о которых специалист в данной области техники хорошо осведомлен.

Термин «аллель» относится к одной или, по меньшей мере, двум последовательностям нуклеотидов в определенном локусе в геноме. Первый аллель находится на одной хромосоме, второй аллель – на сестринской хромосоме в том же самом положении. Если эти два аллеля различны, то они – гетерозиготны, а если они одинаковы, то они – гомозиготны. Различные аллели гена (генные аллели) отличаются, по меньшей мере, одним SNP. Различные аллели гена устойчивости могут либо придавать растению устойчивость, возможно, устойчивость разного уровня, к патогенному грибу, то есть, вызывать различные типы фенотипов растения в ответ на инфицирование патогенным грибом, либо конструировать вариант гена, который не способен придавать устойчивость, то есть, полученный фенотип растения чувствителен к патогенному грибу.

Согласно настоящему изобретению, термин «регуляторная последовательность» означает нуклеотидную последовательность, которая влияет на специфичность и/или уровень экспрессии, например, в той мере, в какой регуляторная последовательность придает определенную тканеспецифичность. Регуляторная последовательность этого типа может размещаться выше точки инициации транскрипции минимального промотора, но также и ниже нее, например, в транскрибируемой, но нетранслируемой лидерной последовательности или в интроне.

«Молекулярный маркер» или «маркер» – это нуклеотидная последовательность, которая используется в качестве исходной или ориентирующей точки. Маркер для распознавания события рекомбинации должен подходить для мониторинга различий или полиморфизмов у популяции растений. Для маркеров, эти различия существуют на уровне ДНК, и они представляют собой, например, различия в полинуклеотидных последовательностях, таких как, например, SSR (простые повторяющиеся последовательности), RFLP (полиморфизмы длин рестрикционных фрагментов), FLP (полиморфизмы длин фрагментов) или SNP (одонуклеотидные полиморфизмы). Маркеры могут быть получены из геномных или экспрессируемых нуклеиновых кислот, таких как, сплайсированные РНК, сДНК или EST, и они могут быть основаны на нуклеиновых кислотах, которые используются в качестве зондов или пар праймеров и, как таковые, подходят для амплификации фрагмента последовательности с использованием способов на основе PCR. Маркеры, которые относятся к генетическим полиморфизмам между частями популяции, могут быть определены с использованием известных способов из известного уровня техники (Введение в генетический анализ. 7-е издание, Гриффитс, Миллер, Сузуки и др., 2000). К ним относятся, например: Секвенирование ДНК, сиквенс-специфичная амплификация на основе PCR, количественный анализ RFLP, количественный анализ KASP, количественный анализ полинуклеотидных полиморфизмов с использованием аллель-специфической гибридизации (ASH), определение SSR, SNP или AFLP. Известны также способы определения EST (маркеры экспрессируемой последовательности) и RAPD (случайно амплифицированная полиморфная ДНК). В зависимости от контекста, термин «маркер» в описании настоящего изобретения может также означать специфичное положение хромосомы в геноме того вида, у которого может быть выявлен специфичный маркер (например, SNP).

Термины «дистальный» и «проксимальный» описывают положение хромосомного интервала или генетического сегмента относительно конкретной исходной точки (например, конкретного полинуклеотида, другого хромосомного интервала или гена) на всей хромосоме; «дистальный» означает, что интервал или сегмент расположен на стороне исходной точки, удаленной от центромеры хромосомы, а «проксимальный» означает, что интервал или сегмент расположен на стороне исходной точки, близкой к центромере хромосомы.

Термин «тесно сцепленный» означает два локуса, два интервала, два генетических сегмента (например, ген устойчивости и фланкирующие области) или два маркера (маркерные локусы), которые находятся на расстоянии менее 15 см, менее 12 см, менее 10 см, менее 8 см, менее 7 см, менее 6 см, менее 5 см, менее 4 см, менее 3 см, менее 2 см, менее 1 см, менее 0,5 см, менее 0,2 см, менее 0,1 см друг от друга, установленные с использованием генетической карты IBM2 ближайшие соседи 4, которая находится в открытом доступе на веб-сайте Maize GDB, или которые находятся друг от друга на расстоянии, составляющем менее 50 мега пар оснований, менее 40 мега пар оснований, менее 30 мега пар оснований, менее 25 мега пар оснований, менее 20 мега пар оснований, менее 15 мега пар оснований или менее 10 мега пар оснований.

Термин «интервал» или «хромосомный интервал» означает непрерывный линейный сегмент на геномной ДНК, который присутствует в отдельной хромосоме у растения или на фрагменте хромосомы, и который обычно определяется посредством двух маркеров, которые представляют собой конечные точки интервала на дистальной и проксимальной стороне. В этом отношении, маркеры, определяющие концы интервала, сами также могут быть частью интервала. Кроме того, два разных интервала могут перекрываться. В настоящем описании, интервал характеризуется выражением «между маркером А и маркером В». Конечный маркер интервала также может быть расположен в определенной маркерной области с одной стороны интервала. Маркерную область затем определяют путем предоставления двух фланкирующих маркеров, и она представляет собой хромосомный сегмент, на котором может быть расположено больше маркеров, в дополнение к фланкирующим маркерам. Фланкирующие маркеры определяют конечные точки маркерной области и сами по-прежнему являются частью области маркера. Если оба конечных маркера интервала представляют собой маркеры, находящиеся в различных маркерных областях по обе стороны интервала, то в настоящем описании интервал характеризуется выражением «между маркером в маркерной области X, которая фланкирована маркерами C и D, и маркером в маркерной области Y, которая фланкирована маркерами E и F». Маркерная область может охватывать до 500 000 пар оснований, и, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, ее размер может составлять от 100 000 до 400 000 пар оснований, или, в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, она может составлять от 140 000 до 315 000 пар оснований.

Термин «интрогрессия», используемый в связи с настоящим изобретением, означает перенос, по меньшей мере, одного желаемого генного аллеля в генетическом локусе генетического фона в другой. Например, интрогрессия желаемого генного аллеля в определенном локусе может быть перенесена потомку путем полового скрещивания между двумя родителями одного и того же вида. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, например, перенос генного аллеля может также происходить путем рекомбинации между двумя донорскими геномами в слитом протопласте, при этом, по меньшей мере, один донорский протопласт несет в своем геноме желаемую генную аллель. В каждом случае, потомки, которые затем содержат желаемую генную аллель, могут быть снова возвратно скрещены с линией, которая содержит предпочтительный генетический фон и могут быть выбраны для желаемого генного аллеля. Результатом является фиксация желаемого генного аллеля в выбранном генетическом фоне.

Термин «локус» означает положение на хромосоме, где выявлен, по меньшей мере, один ген, который вызывает агрономический признак или влияет на него. В частности, термин «локус», используемый в настоящем документе, означает локус устойчивости НТ2, который придает устойчивость к патогену *Helminthosporium turcicum* или, по меньшей мере, к расе *Helminthosporium turcicum*.

Термин «аллель» относится к одной или к, по меньшей мере, двум последовательностям нуклеотидов в определенном локусе в геноме. Первый аллель находится на одной хромосоме, второй аллель – на второй хромосоме в том же самом положении. Если эти два аллеля различны, то они – гетерозиготны, а если они одинаковы, то они – гомозиготны. Различные аллели гена (генные аллели) отличаются, по меньшей мере, одним SNP. В зависимости от контекста настоящего описания, аллель также означает один SNP, который, например, позволяет провести различие между донором устойчивости и рекуррентным родителем.

Примеры

Приведенные ниже примеры, включая проведенные эксперименты и достигнутые результаты; они приведены только в иллюстративных целях и не рассматриваются как ограничивающие настоящее изобретение.

1. Клонирование и функциональная валидация генов устойчивости HT2 и HT3

а. Картирование QTL (локус количественного признака) и разработка рекомбинантов

Донорскую линию A619HT2 скрестили и обратно скрестили с линией RP1, чтобы создать почти изогенную линию (NIL, RP1HT2A) с основным фрагментом исходного донора A619HT2 на хромосоме 8 и очень небольшим количеством других малых донорских областей. Эту линию NIL RP1HT2A скрестили с ее рекуррентным родителем RP1 для создания популяции F2. То же самое было сделано в отношении RP2 x RP2HT3A (исходным донором в данном случае был A619HT3). Рекуррентные родители RP1 и RP2 были чувствительны к NCLB (баллы 7-9; см. Таблицу 4), в то время как линии доноров A619HT2 и A619HT3 являются устойчивыми (баллы 1-3). Баллы линий NIL RP1HT2A и RP2HT3A составляют 2-3 и 1-2 соответственно.

Популяции F2 были высажены в поле в виде 720 индивидуумов в месте, расположенном в Поккинге, Германия. Картирование QTL привело к пику (значение LOD для популяции с RP2HT3A = 168,77; значение LOD для популяции с RP1HT2A = 44,02) в обеих популяциях на хромосоме 8 (рамка размером 1,1 см из 3,5 мега пар оснований). Других значимых пиков определено не было. Рекомбинантные растения (всего ~ 2000) были разработаны в нескольких поколениях до статуса F11. Картирование QTL в F2 и дальнейшее точное картирование с рекомбинантами сузили хромосомную область до физического интервала из 490 тысяч пар оснований (генетический интервал = 0,2 см). Этот интервал включает ген RLK1.

б. Молекулярный анализ области-мишени

Из линий RP1HT2A и RP2HT3A были разработаны неразграфленные библиотеки ВАС (искусственных бактериальных хромосом), которые были подвергнуты скринингу посредством 7 зондов из локуса-мишени. Для области гена-кандидата RLK1 можно было бы разработать непрерывный контиг ВАС для обеих линий доноров. Анализ последовательности показал, что линии доноров A619HT2 и A619HT3 идентичны для области-мишени (из 1 мега пар оснований).

Последовательность сДНК гена-кандидата *PLK1* показывает 97 полиморфизмов (на уровне ДНК; включает SNP и Вставки/Делеции) и 61 изменение аминокислот (на уровне белка) между линиями, содержащими *HTM1* из документа WO 2015/032494 A2, и аллель *HT2*. Из 97 полиморфизмов, только 14 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) приводят к молчащим аминокислотным обменам, которые, вероятно, не влияют на активность гена резистентности. Все другие полиморфизмы существенно изменяют структуру белка путем замещения, добавления или делеции. В Таблице 3 показаны 15 аминокислотных обменов, в отношении которых прогнозируется сильное воздействие на структуру белка. Среди них были идентифицированы множественные, специфичные для генотипа, дополнительные аминокислоты. В сравнении с последовательностями сДНК гена *RLK1*, указанными в SEQ ID NO: 11 и 13 из линии доноров, раскрытой в документе WO 2011/163590 A1, линии доноров A619HT2 и A619HT3 отличаются 31 нуклеотидами и 12 аминокислотами.

с. Функциональная валидация аллеля *HT2* гена *RLK 1*

(i) Функциональная валидация с использованием EMS-мутагенеза:

Была разработана популяция, подвергнутая EMS-мутагенезу, из RP2HT3A. Экзонные области 1 и 3 из *RLK1* подвергли скринингу и выявили 3 положительных мутанта, несущих изменение аминокислоты (SEQ ID NO: 16, 18, 20, 46, 48, 50, 52, 54, 56 и 58). В сДНК гена *RLK* Мутанта WVE16-92125-001 G в положении 1625 произведена замена на A (см. также SEQ ID NO: 15), ведущая к аминокислотному обмену с Глицина на Аспарагиновую кислоту в положении 542 (см. также SEQ ID NO: 16); в сДНК гена *RLK* Мутанта WVE16-92149-012 C в положении 95 произведена замена на T (см. также SEQ ID NO: 17), ведущая к аминокислотному обмену с Пролина на Лейцин в положении 32 (см. также SEQ ID NO: 18); в сДНК гена *RLK* Мутанта WVE16-92168-005 G в положении 115 произведена замена на A (см. также SEQ ID NO: 19), ведущая к аминокислотному обмену с Аланина на Треонин в положении 39 (см. также SEQ ID NO: 20); в сДНК гена *RLK* Мутанта WVE16-92168-024_WVE17-68687-013 G в положении 73 произведена замена на A (см. также SEQ ID NO: 45), ведущая к аминокислотному обмену с Аланина на Треонин в положении 25 (см. также SEQ ID NO: 46); в сДНК гена *RLK* Мутанта WVE17-68655-008 C в положении 301 произведена замена на T (см. также SEQ ID NO: 47), ведущая к аминокислотному обмену с Пролина на Серин в положении 101 (см. также SEQ ID NO: 48); в сДНК гена *RLK* Мутанта WVE17-68625-014 G в положении 715 произведена замена на A (см. также SEQ ID NO: 49), ведущая к аминокислотному обмену с Валина на Изолейцин в положении 239 (см. также SEQ ID NO: 50); в сДНК гена *RLK* Мутанта WVE17-68611-006 T в положении 862 произведена замена на A (см. также SEQ ID NO: 51), ведущая к аминокислотному обмену с Фенилаланина на Изолейцин в положении 288 (см. также SEQ ID NO: 52); в сДНК гена *RLK* Мутанта WVE17-68696-002 A в положении 929 произведена замена на G (см. также SEQ ID NO: 53), ведущая к аминокислотному обмену с Лизина на Аргинин в положении 310 (см. также SEQ ID NO: 54); в сДНК гена *RLK* Мутанта WVE17-68656-011 C в

положении 1289 произведена заменена на Т (см. также SEQ ID NO: 55), ведущая к аминокислотному обмену с Треонина на Изолейцин в положении 430 (см. также SEQ ID NO: 56); в сДНК гена RLK Мутанта WVE17-68630-001 G в положении 1826 произведена заменена на А (см. также SEQ ID NO: 57), ведущая к аминокислотному обмену с Цистеина на Тирозин в положении 609 (см. также SEQ ID NO: 58). После самоопыления этих мутантов, их оценивали в поле и теплице.

d. Анализ экспрессии гена:

Анализ экспрессии гена PLK1 в RP1, RP1HT2A, RP2 и RP2HT3A в неинфицированном и инфицированном листовом материале показал аналогичную экспрессию гена в линиях NIL RP1HT2A и RP2HT3A. Экспрессия гена подавляется в инфицированном листовом материале. Этот ответ на инфекцию также мог бы быть показан и для аллеля *HTN1* гена RLK 1.

2. Аллельная последовательность гена RLK 1 и идентификация релевантной области для реакции устойчивости

С целью выявления релевантной области для реакции устойчивости к патогену *Helminthosporium turcicum*, проводят следующий анализ: Биоинформационный анализ ресеквенирования гена RLK1 в различных линиях доноров и рекуррентных родителей выявляет аминокислотную область, релевантную для реакции устойчивости. Таким образом, были разработаны пары праймеров геномной последовательности для гена RLK1 с тем, чтобы охватить экзонные области. Экзон 1 мог быть охвачен только частично, а Экзон 2 и 3 – полностью. Разработанные ампликоны были амплифицированы и секвенированы в 96 генотипах с помощью метода PACBio-секвенирования. Последовательности были собраны в консенсусные последовательности для каждого генотипа. Для некоторых генотипов были получены множественные консенсусные последовательности. Для сборки всех 96 генотипов была выбрана консенсусная последовательность с наибольшим количеством прочтений секвенирования. Гаплотипы определяли в соответствии с экзонной областью/частями. Для Экзона 1 были определены 12 различных гаплотипов, для Экзона 2 – 7 различных гаплотипов, а для Экзона 3 – 9 различных гаплотипов. Генетическое расстояние рассчитывали с помощью программного обеспечения Lasergene MegAlign (DNASTAR, Inc.). Различные гаплотипы собирали на уровне последовательности ДНК и Белка (см. Таблицу 5). В результате, области Экзона 1 и 2 являются, по-видимому, высоковариабельными для гена и содержат WAK-ассоциированные домены. Эта часть белка расположена в межклеточном пространстве и могла бы взаимодействовать с белками гриба. Вариансы в этих двух экзонах представляют собой интересующие пары оснований-кандидатов для этого взаимодействия. На основании этого, возможно идентифицировать гаплотипы Экзона 1 и 2 в новых аллелях гена RLK1, которые способны придавать или повышать устойчивость к, по меньшей мере, патогену *Helminthosporium turcicum*.

Кроме того, проводят фенотипирование различных линий доноров, почти изогенных линий и рекуррентных родителей и анализ гаплотипа локуса гена RLK1, а также анализ экспрессии гена RLK1 в различных линиях доноров, почти изогенных линиях и рекуррентных родителях в сочетании с фенотипическим анализом для идентификации релевантной области для реакции устойчивости и, наконец, для идентификации новых аллельных вариантов гена устойчивости. Оценка всех описанных наборов данных должна сузить релевантную область для реакции устойчивости.

Таблица 5: Генетические расстояния [%] между различными гаплотипами на основе экзонов

Гомология на уровне ДНК	Гомология на уровне белка
Итоговая последовательность: > 60%	Итоговая последовательность: > 60%
Экзон 1: > 85%	Экзон 1: > 75%
Экзон 2: > 60%	Экзон 2: > 60%
Экзон 3: > 98%	Экзон 3: > 98%

3. Реакция устойчивости к другим патогенам

Набор генотипов, содержащих различные аллели гена RLK 1, был инокулирован другими патогенами растений, такими как Южный гельминтоспориоз листьев кукурузы (*Bipolaris maydis*), Ржавчина кукурузы (*Puccinia sorghi*) и *Diplodia macrospora* (*Stenocarpella macrospora*). Общей особенностью этих патогенов является то, что инфекция обусловлена очень схожей биологией грибов и тем, что они проникают в организм хозяина через ткань листа. Первый эксперимент с Южным гельминтоспориозом листьев кукурузы (*Bipolaris maydis*) также указывает на реакцию устойчивости аллелей HT2 и HTN гена RLK1.

4. Введение устойчивости к NCLB, вызываемому *Helminthosporium turcicum*, в чувствительный генотип посредством *Agrobacterium*-опосредованной трансформации

Три различных конструкции с последовательностью сДНК HT2 (SEQ ID NO: 2) под действием промоторов с различной активностью были трансформированы в чувствительный генотип кукурузы A188: Конструкция А с последовательностью сДНК HT2 (SEQ ID NO: 2), область нативного промотора из ~ 1980 пар оснований (SEQ ID NO: 4) и область терминатора (SEQ ID NO: 5) (вектор p7U, см. Фигуру 1), конструкция В с последовательностью сДНК HT2 (SEQ ID NO: 2), Актиновый промотор *Oryza sativa* (SEQ ID NO: 43) и область терминатора (SEQ ID NO: 5), и конструкция С с последовательностью сДНК HT2 (SEQ ID NO: 2), промотор EF1 *Brachypodium distachyon* (SEQ ID NO: 44) и область терминатора (SEQ ID NO: 5). Для получения, например, вектора p7U-нативныйHT2_CDS_2, экспрессионную кассету, содержащую ген HT2 под контролем

нативного промотора и терминатора, трансформировали в бинарный вектор, содержащий ген гербицида (например: устойчивости к BASTA, устойчивости к глифосату или устойчивости к ингибиторам ALS) для последующей трансформации в *Agrobacterium tumefaciens* для Agrobacterium-опосредованной трансформации растения, в генотип кукурузы (*Zea mays*) A188. Растения T₀, стабильно трансформированные различными конструкциями, размножили, а потомков, выращенных в теплице, протестировали на устойчивость к NCLB. Трансгенные растения со всеми различными конструкциями показали повышение устойчивости к NCLB, однако, в разной степени, в зависимости от места интеграции и силы промотора.

5. Введение устойчивости к NCLB, вызываемому *Helminthosporium turcicum*, в чувствительный генотип посредством редактирования генов

Аллель гена PLK1 в чувствительном генотипе кукурузы A188 идентифицировали, секвенировали, и была предсказана сДНК (SEQ ID NO: 21). Сравнение сДНК этого аллеля A188 с сДНК гена HT2 показывает, что последовательности показывают идентичность последовательностей, составляющую 99% (ФИГУРА 4). Однако в положении 1458-1459 аллеля A188 имеется вставка «АС», длиной 2 пары оснований, которая вызывает ранний стоп-кодон после Цистеина в положении 513 (SEQ ID NO: 22). Посредством элиминации этой вставки, длиной 2 пары оснований, с использованием редактирования генов на основе систем TALEN или CRISPR, устойчивость гена HT2 могла бы быть восстановлена в генотипе A188. На Фигуре 5 показано выравнивание между белком гена RLK1, полученным из модифицированного аллеля гена RLK1 генотипа A188 (SEQ ID NO: 24), и аллелем гена HT2 с высоким уровнем идентичности по аминокислотной последовательности. сДНК модифицированного аллеля гена RLK1 из генотипа A188 показана в SEQ ID NO: 23.

Формула изобретения

1. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из
 - (a) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2;
 - (b) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3;
 - (c) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 96%-ую идентичность с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2;
 - (d) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 92%-ую идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3;
 - (e) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с комплементарной цепью нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (a) или (b), в жестких условиях гибридизации; и
 - (f) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (a) или (b) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (a) или (b);

отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептид, способный придавать или повышать устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом у растения, в котором экспрессируется полипептид.

2. Способ идентификации аллеля гена устойчивости, отличающийся тем, что аллель придает повышенную устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом у *Zea mays*, содержащий следующие этапы
 - (a) проведение сравнений последовательностей, используя, (i) по меньшей мере, одну кодирующую нуклеотидную последовательность, происходящую из генотипа *Zea mays*, при этом, нуклеотидная последовательность, предпочтительно, соответствует локусу устойчивости из 8,05 пар оснований или локусу устойчивости из 8,06 пар оснований, и, (ii) в качестве эталонной последовательности, нуклеотидную последовательность молекулы нуклеиновой кислоты по пункту 1 или ее часть, или консенсусную последовательность, полученную из набора, по меньшей мере, двух нуклеотидных последовательностей, при этом, одна нуклеотидная последовательность

- представляет собой нуклеотидную последовательность молекулы нуклеиновой кислоты по пункту 1 или ее часть, и, при этом, каждая нуклеотидная последовательность из набора, по меньшей мере, двух нуклеотидных последовательностей кодирует полипептид, способный придавать или повышать устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, у *Zea mays*, в котором полипептид экспрессируется, и, предпочтительно, соответствует локусу устойчивости из 8,05 пар оснований или локусу устойчивости из 8,06 пар оснований; и
- (b) идентификацию аллеля, если сравнение последовательностей выявляет
- i. идентичность последовательностей на уровне нуклеотидов, составляющую, по меньшей мере, 85%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 1-920 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и/или составляющую, по меньшей мере, 60%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 23252-23288 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, или с положениями нуклеотидов 921-957 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, и/или составляющую, по меньшей мере, 98%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 23586-24632 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, или с положениями нуклеотидов 958-2004 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, и/или
 - ii. идентичность последовательностей на уровне аминокислот, составляющую, по меньшей мере, 75%-ую идентичность с положениями 1-306 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, и/или составляющую, по меньшей мере, 60%-ую идентичность с положениями 307-319 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, и/или составляющую, по меньшей мере, 98%-ую идентичность с положениями 320-668 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3.
3. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из нуклеотидной последовательности аллеля, идентифицированного способом по пункту 2.
4. Вектор или экспрессионная кассета, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по пункту 1 или 3, предпочтительно, функционально сцепленная с промотором, обеспечивающим экспрессию нуклеотидной последовательности в растительной клетке.
5. Полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по пункту 1 или 3.

6. Растение или его часть, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по пункту 1 или 3, вектор или экспрессионную кассету по пункту 4, или полипептид по пункту 5.
7. Растение по пункту 6, отличающееся тем, что растение является генетически модифицированным растением или трансгенным растением.
8. Растение или его часть по пункту 6, отличающееся тем, что растение или его часть, эндогенно содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по пункту 1 и фланкирующие области генома, тесно сцепленные с молекулой нуклеиновой кислоты, не содержит интервал, полученный из A619HT2 или A619HT3, расположенный между аллелями маркера SYN14136 и маркера MA0021, или интервал, полученный из A619HT2 или A619HT3, расположенный между аллелями маркера MA0022 и маркера SYN4196.
9. Растение или его часть по пункту 6, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по пункту 1 или 3, вектор или экспрессионную кассету по пункту 4, или белок по пункту 6.
10. Способ идентификации или выбора растения, обладающего повышенной устойчивостью к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом, или его части, клетки или семени, содержащий следующие этапы:
 - (a) определение у растения или его части, клетки или семени присутствия молекулы нуклеиновой кислоты по пункту 1 или молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из
 - i. нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60%-ую идентичность с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2;
 - ii. нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 60%-ую идентичность с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, при этом, молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептид, способный придавать или повышать устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом у растения, в котором экспрессируется полипептид;
 - iii. положений нуклеотидов 1-920 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 (Экзон 1; SEQ ID NO: 6), или имеющей, по меньшей мере, 60%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 23252-23288 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 (Экзон 2; SEQ ID NO: 7), или положений нуклеотидов 921-957 нуклеотидной последовательности,

представленной в SEQ ID NO: 2 (Экзон 2; SEQ ID NO: 7), и/или имеющей, по меньшей мере, 98%-ую идентичность с положениями нуклеотидов 23586-24632 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 (Экзон 3; SEQ ID NO: 8), или положений нуклеотидов 958-2004 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2;

- iv. нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%-ую идентичность с положениями 1-306 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, и/или имеющую, по меньшей мере, 60%-ую идентичность с положениями 307-319 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, и/или имеющую, по меньшей мере, 98%-ую идентичность с положениями 320-668 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3;

отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты по любому из пунктов (i)-(iv) кодирует полипептид, способный придавать или повышать устойчивость к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом у растения, в котором экспрессируется полипептид.

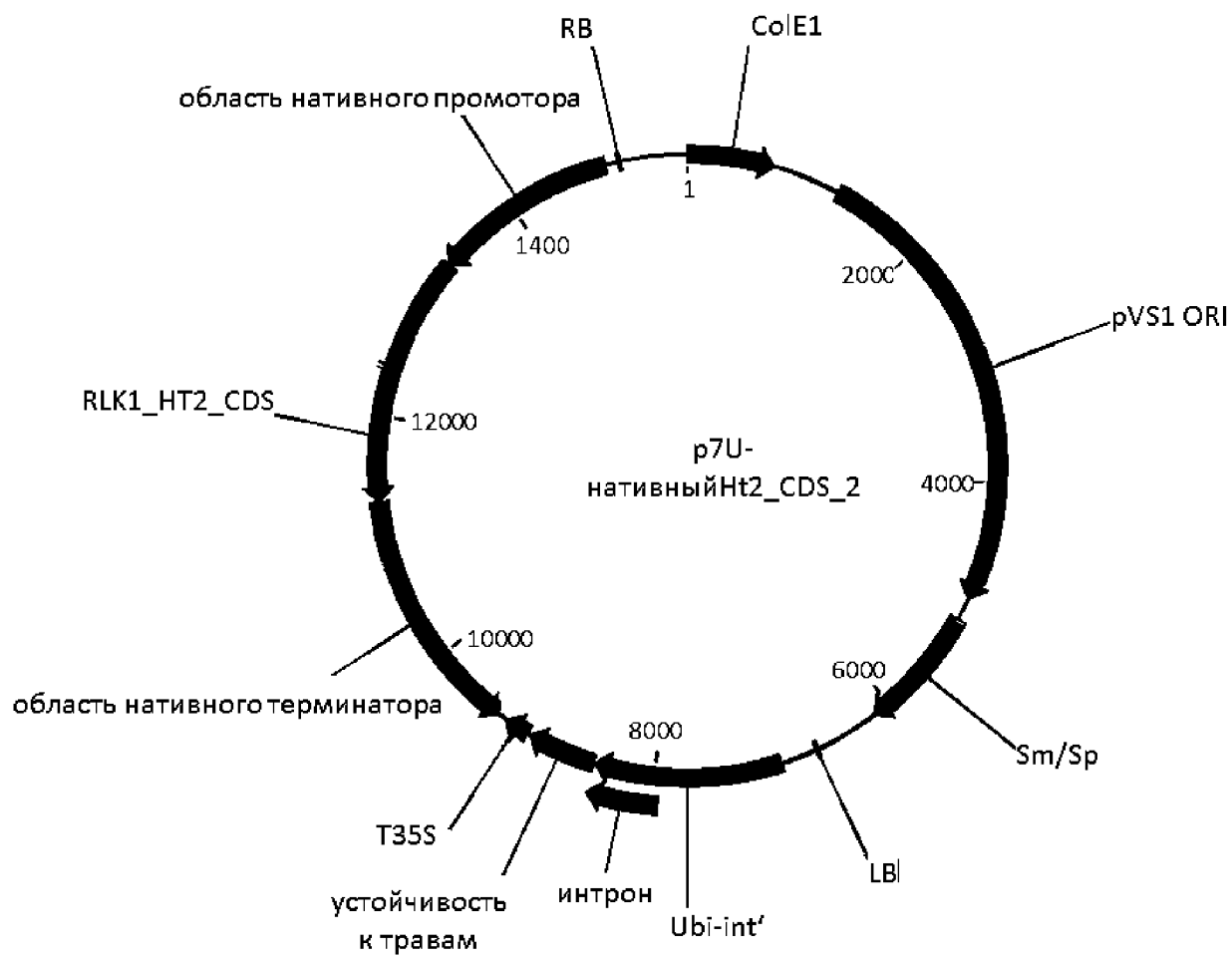
- (b) идентификацию или выбор растения, в котором или в части, клетке или семени которого присутствует молекула нуклеиновой кислоты, определенная в пункте (a), как обладающая устойчивостью или повышенной устойчивостью к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом.

11. Способ повышения устойчивости к заболеванию растений, вызываемому патогенным грибом у растения, содержащий следующие этапы:

- (a) введение в, по меньшей мере, одну клетку растения молекулы нуклеиновой кислоты по пункту 1 или 3, или вектора, или экспрессионной кассеты по пункту 4,
- (b) регенерирование растения из, по меньшей мере, одной клетки, и
- (c) вызывание экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты у растения.

12. Олигонуклеотид, имеющий в длину, по меньшей мере, 15 нуклеотидов, отличающийся тем, что олигонуклеотид способен гибридизироваться или отжигаться с (i) молекулой нуклеиновой кислоты по пункту 1 или 3, (ii) молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, или (iii) молекулой нуклеиновой кислоты, комплементарной молекуле по пункту (i) или пункту (ii).

13. Пара олигонуклеотидов или набор, содержащий указанные олигонуклеотиды, отличающийся тем, что олигонуклеотиды подходят для отжига в качестве прямого праймера и обратного праймера для области в геноме растения, предпочтительно, в геноме *Zea mays*, который показывает косегрегацию с молекулой нуклеиновой кислоты по пункту 1 или 3.
14. Способ определения присутствия или отсутствия молекулы нуклеиновой кислоты по пункту 1 или 3 у растения, содержащий следующие этапы:
- (a) выделение ДНК из, по меньшей мере, одной клетки растения, и
 - (b) использование молекулярного маркера для определения присутствия или отсутствия молекулы нуклеиновой кислоты по пункту 1 или 3, отличающийся тем, что молекулярный маркер способен определять, по меньшей мере, один однонуклеотидный полиморфизм, проводить диагностику делеции или вставки для молекулы нуклеиновой кислоты и/или содержит олигонуклеотид по пункту 13, и/или представляет собой пару олигонуклеотидов, или набор по пункту 14.
15. Способ идентификации растения, обладающего повышенной устойчивостью к заболеванию растений, вызываемому *Helminthosporium turcicum*, которое эндогенно содержит молекулу нуклеиновой кислоты по пункту 1, способ или метод, содержащий определение в аллелях растения, по меньшей мере, двух маркеров, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на или в пределах хромосомного интервала между SYN14136 и молекулой нуклеиновой кислоты по пункту 1, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на или в пределах хромосомного интервала между молекулой нуклеиновой кислоты по пункту 1 и SYN4196.



Фиг. 1

SEQ_ID_NO: 2	atggctgctcacctaccacgcctccccgctcctcctcctcgtcctcctcgtgcccattgtc
SEQ_ID_NO: 9	atggctgctcaccagcctcacctctccgctcctcctcctcgtcctcctcgtgcccattgtc
SEQ_ID_NO: 11	atggctgctcacctaccacgcctccccgctcctcctcctcgtcctcctcgtgcccattgtc
SEQ_ID_NO: 13	atggctgctcacctaccacgcctccccgctcctcctcctcgtcctcctcgtgcccattgtc
	***** ** * **** *****
SEQ_ID_NO: 2	gtctccacctccgcccattgcccagcctcctcttccgagcccttacagcacctccgcccatt
SEQ_ID_NO: 9	gtctccacctccgcccattggcgagcctcctcttccgagcccttacacacctccgcccatt
SEQ_ID_NO: 11	gtctccacctccgcccattggcgagcctcctcttccgagcccttacacacctccgcccatt
SEQ_ID_NO: 13	gtctccacctccgcccattgcccagcctcctcttccgagcccttacagcacctccgcccatt

SEQ_ID_NO: 2	ggcgagcctcctcttccgagcacttacaaacgtctccatgtgctcggaatcgttctgggtgc
SEQ_ID_NO: 9	ggcgagcctcctcttccgagcacttacaaacgcctccatgtgctcgt---cgttctgggtgc
SEQ_ID_NO: 11	ggcgagcctcctcttccgagcacttacaaacgcctccatgtgctcgt---cgttctgggtgc
SEQ_ID_NO: 13	ggcgagcctcctcttccgagcacttacaaacgtctccatgtgctcggaatcgttctgggtgc
	***** *****
SEQ_ID_NO: 2	ggcggcgctcgaaatccgctacccggttctatcttggccaacgcaaccgcccactacagcggg
SEQ_ID_NO: 9	ggcggcgctcgagatccgctacccggttctatcttggccaacgcaatcgcccactacagcggg
SEQ_ID_NO: 11	ggcggcgctcgagatccgctacccggttctatcttggccaacgcaatcgcccactacagcggg
SEQ_ID_NO: 13	ggcggcgctcgaaatccgctacccggttctatcttggccaacgcaaccgcccactacagcggg
	***** *****
SEQ_ID_NO: 2	agctactactcctcgcggtacacccgacttgagcggttctctgcaaactcgaggtcgagggg
SEQ_ID_NO: 9	agctactactcctcgcggtacacccgacttgagcggttctctgcaaactcgaggtcgagggg
SEQ_ID_NO: 11	agctactactcctcgcggtacacccgacttgagcggttctctgcaaactcgaggtcgagggg
SEQ_ID_NO: 13	agctactactcctcgcggtacacccgacttgagcggttctctgcaaactcgaggtcgagggg

SEQ_ID_NO: 2	ccgacgacgacatggaccctaccatccgtctcggcggcgacaactacaccgtcaagaac
SEQ_ID_NO: 9	tcgccgacgacctggaccctaccatccgtctcggcggcgagactacaccgtcaagaac
SEQ_ID_NO: 11	tcgccgacgacctggaccctaccatccgtctcggcggcgagactacaccgtcaagaac
SEQ_ID_NO: 13	ccgacgacgacatggaccctaccatccgtctcggcggcgacaactacaccgtcaagaac
	** ***** *
SEQ_ID_NO: 2	atcttgta-----cgactatcataccatctcactggcggacagcgatgtgctcggaggc
SEQ_ID_NO: 9	atctcctacctctacgaccagcagaccatctcactggcggacagagatgtgctcggaggc
SEQ_ID_NO: 11	atctcctacctctacgaccagcagaccatctcactggcggacagagatgtgctcggaggc
SEQ_ID_NO: 13	atcttgta-----cgactatcataccatctcactggcggacagcgatgtgctcggaggc
	**** ** *****
SEQ_ID_NO: 2	ggcgagtgcgccgctcgtccaccacaacgtcagcttcgacgagacgtggctgca-----c
SEQ_ID_NO: 9	ggcggtgcgccgctcgtccgccacaacgtcagcttcgacgagacgtggctgcacctgcac
SEQ_ID_NO: 11	ggcggtgcgccgctcgtccgccacaacgtcagcttcgacgagacgtggctgcacctgcac
SEQ_ID_NO: 13	ggcgagtgcgccgctcgtccaccacaacgtcagcttcgacgagacgtggctgca-----c
	**** ***** *
SEQ_ID_NO: 2	aaccccgagcgcttcgacaacctcaccttcttcttcggatgccactggggggccacgcgat
SEQ_ID_NO: 9	aacggcagcgcttcgacaacctcaccttcttcttcggatgccactggggggccacggaat
SEQ_ID_NO: 11	aacggcagcgcttcgacaacctcaccttcttcttcggatgccactggggggccacggaat
SEQ_ID_NO: 13	aaccccgagcgcttcgacaacctcaccttcttcttcggatgccactggggggccacgcgat
	*** ***** **
SEQ_ID_NO: 2	acactgcctgaatttgccggcaacaacatcagctgcgcggggttcagtactccagctatc
SEQ_ID_NO: 9	acaccgctgaatttgccgactacaacatcagctgcgcggggttcataactccaactatc
SEQ_ID_NO: 11	acaccgctgaatttgccgactacaacatcagctgcgcggggttcataactccaactatc
SEQ_ID_NO: 13	acactgcctgaatttgccggcaacaacatcagctgcgcggggttcagtactccagctatc
	**** *****

Фиг. 2А

SEQ_ID_NO:_2	agcgggtggaggctccttcgtgttcaagcctgaagatcttgacgaacatgcgaggcaggag
SEQ_ID_NO:_9	agcgggtggaaggctccttcgtgttcaagactggagatcttgacgaacaaggaggcaggag
SEQ_ID_NO:_11	agcgggtggaaggctccttcgtgttcaagactggagatcttgacgaacaaggaggcaggag
SEQ_ID_NO:_13	agcgggtggaggctccttcgtgttcaagcctgaagatcttgacgaacatgcgaggcaggag ***** * *****
SEQ_ID_NO:_2	ttggcttcacactgcgacgagggttttctccgtgccagtgagaagcgaggctctgcagcag
SEQ_ID_NO:_9	ttggctttacactgcgacgagggttttctccgtgccagtgagaagagatgctctgcaggcg
SEQ_ID_NO:_11	ttggctttacactgcgacgagggttttctccgtgccagtgagaagagatgctctgcaggcg
SEQ_ID_NO:_13	ttggcttcacactgcgacgagggttttctccgtgccagtgagaagcgaggctctgcagcag ***** ***** *
SEQ_ID_NO:_2	gcgatcgtcagcaacctcagcctcggggacgggtacggcgagctgcttaggcaggggatc
SEQ_ID_NO:_9	atcgtcagcaacctcagcctcacacggggacgggtacggcgaggtgcttaggcaggggttc
SEQ_ID_NO:_11	atcgtcagcaacctcagcctcacacggggacgggtacggcgaggtgcttaggcaggggttc
SEQ_ID_NO:_13	gcgatcgtcagcaacctcagcctcggggacgggtacggcgagctgcttaggcaggggatc * * * * * ***** *
SEQ_ID_NO:_2	gagttggaatggaacggacatcggaggatcagtgtggccagtgcgaggaatcgggctcc
SEQ_ID_NO:_9	gagttggaatggaatcggacatcggaggatcagtgtggccggtgcgagggatcgggctcc
SEQ_ID_NO:_11	gagttggaatggaatcggacatcggaggatcagtgtggccggtgcgagggatcgggctcc
SEQ_ID_NO:_13	gagttggaatggaacggacatcggaggatcagtgtggccagtgcgaggaatcgggctcc ***** *****
SEQ_ID_NO:_2	ggcggacggtgcgccctacagccagaagagagaattccttggtgcttctgcagcggaggg
SEQ_ID_NO:_9	ggcggatggtgcgccctacagccagaagagagagaattcctgggtgcttctgcagcggaggg
SEQ_ID_NO:_11	ggcggatggtgcgccctacagccagaagagagagaattcctgggtgcttctgcagcggaggg
SEQ_ID_NO:_13	ggcggacggtgcgccctacagccagaagagagagaattccttggtgcttctgcagcggaggg ***** *****
SEQ_ID_NO:_2	aaggcgggcaaccgcgttctgcaaaccatcaagatcaacaaaaaggagagaagcagcatct
SEQ_ID_NO:_9	aagggtgggcagccgcgttctgcaaaccatcgagatcaaaaa-----ggaaagaaggacct
SEQ_ID_NO:_11	aagggtgggcagccgcgttctgcaaaccatcgagatcaaaaa-----ggaaagaaggacct
SEQ_ID_NO:_13	aaggcgggcaaccgcgttctgcaaaccatcaagatcaaaaa-----ggaaagaagcatct **** *
SEQ_ID_NO:_2	attgttggtgctgttgccgttgcatctctgtgtctagtcattctcacatgcttcttggct
SEQ_ID_NO:_9	attgttggtgctgttgccgttgcatctctgtgtctagtcattctcacatgcttcttggct
SEQ_ID_NO:_11	attgttggtgctgttgccgttgcatctctgtgtctagtcattctcacatgcttcttggct
SEQ_ID_NO:_13	attgttggtgctgttgccgttgcatctctgtgtctagtcattctcacatgcttcttggct *****
SEQ_ID_NO:_2	tgtagacattgttcgctgcccttcaaatacgagaacaaaccagggacaaggattgagtcc
SEQ_ID_NO:_9	tgtagacatggttcgctgcccttcaaatacggagaacaaaccagggacaaggattgagtcc
SEQ_ID_NO:_11	tgtagacatggttcgctgcccttcaaatacggagaacaaaccagggacaaggattgagtcc
SEQ_ID_NO:_13	tgtagacatggttcgctgcccttcaaatacggagaacaaaccagggacaaggattgagtcc *****
SEQ_ID_NO:_2	ttcctacagaagaacgagagtagtatcatccgaaaagatacacctacgcgacgtgaaa
SEQ_ID_NO:_9	ttcctacagaagaacgaga---gtatacatccgaaaagatacacctacgcgacgtgaaa
SEQ_ID_NO:_11	ttcctacagaagaacgaga---gtatacatccgaaaagatacacctacgcgacgtgaaa
SEQ_ID_NO:_13	ttcctacagaagaacgaga---gtatacatccgaaaagatacacctacgcgacgtgaaa *****
SEQ_ID_NO:_2	agaatgacaaaatccttcgctgtgaagctaggccaagggtgggtttggtgctgtatacaaa
SEQ_ID_NO:_9	agaatgacaaaatccttcgctgtgaagctaggccaagggtgggtttggtgctgtatacaaa
SEQ_ID_NO:_11	agaatgacaaaatccttcgctgtgaagctaggccaagggtgggtttggtgctgtatacaaa
SEQ_ID_NO:_13	agaatgacaaaatccttcgctgtgaagctaggccaagggtgggtttggtgctgtatacaaa *****

Фиг. 2В

SEQ_ID_NO: _2	ggcagcctccacgatggccgacaggttagcagtcgaagatgctgaaggacacccaaggtgac
SEQ_ID_NO: _9	ggcagcctccacgatggccgacaggttagcagtcgaagatgctgaaggacacccaaggtgac
SEQ_ID_NO: _11	ggcagcctccacgatggccgacaggttagcagtcgaagatgctgaaggacacccaaggtgac
SEQ_ID_NO: _13	ggcagcctccacgatggccgacaggttagcagtcgaagatgctgaaggacacccaaggtgac

SEQ_ID_NO: _2	ggcgaggaattcatgaacgaggtggctagcatcagcaggacttctcatgtcaacgtcgtg
SEQ_ID_NO: _9	ggcgaggaattcatgaacgaggtggctagcatcagcaggacttctcatgtcaacgtcgtg
SEQ_ID_NO: _11	ggcgaggaattcatgaacgaggtggctagcatcagcaggacttctcatgtcaacgtcgtg
SEQ_ID_NO: _13	ggcgaggaattcatgaacgaggtggctagcatcagcaggacttctcatgtcaacgtcgtg

SEQ_ID_NO: _2	acacttctagggttttgcttgcaagggtcgaaaagagcactgatctacgagtacatgcc
SEQ_ID_NO: _9	acacttctagggttttgcttgcaagggtcgaaaagagcactgatctacgagtacatgcc
SEQ_ID_NO: _11	acacttctagggttttgcttgcaagggtcgaaaagagcactgatctacgagtacatgcc
SEQ_ID_NO: _13	acacttctagggttttgcttgcaagggtcgaaaagagcactgatctacgagtacatgcc

SEQ_ID_NO: _2	aatggttcgctcgaaaggtatgccttcaccggtgacatgaacagtgagaatttgctaacc
SEQ_ID_NO: _9	aatggttcgctcgaaaggtatgccttcaccggtgacatgaacagtgagaatttgctaacc
SEQ_ID_NO: _11	aatggttcgctcgaaaggtatgccttcaccggtgacatgaacagtgagaatttgctaacc
SEQ_ID_NO: _13	aatggttcgctcgaaaggtatgccttcaccggtgacatgaacagtgagaatttgctaacc

SEQ_ID_NO: _2	tgggaaagactatttgacatagcgattggcacggccagagggctcgaatacctacaccgg
SEQ_ID_NO: _9	tgggaaaggctatttgacatagcaattggcacggccagagggctcgaatacctacaccgg
SEQ_ID_NO: _11	tgggaaaggctatttgacatagcaattggcacggccagagggctcgaatacctacaccgg
SEQ_ID_NO: _13	tgggaaaggctatttgacatagcaattggcacggccagagggctcgaatacctacaccgg

SEQ_ID_NO: _2	ggatgcaacactcggatcgtgcattttgacatcaagccacacacacatcctgtagaccag
SEQ_ID_NO: _9	ggatgcaacactcggatcgtgcattttgacatcaagccacacacacatcctgtagaccag
SEQ_ID_NO: _11	ggatgcaacactcggatcgtgcattttgacatcaagccacacacacatcctgtagaccag
SEQ_ID_NO: _13	ggatgcaacactcggatcgtgcattttgacatcaagccacacacacatcctgtagaccag

SEQ_ID_NO: _2	gatttctgcctaagatctctgactttggactggccaagctatgtctgaacaaagagagc
SEQ_ID_NO: _9	gatttctgtcctaagatctctgactttggactggccaagctatgtctgaacaaagagagc
SEQ_ID_NO: _11	gatttctgtcctaagatctctgactttggactggccaagctatgtctgaacaaagagagc
SEQ_ID_NO: _13	gatttctgtcctaagatctctgactttggactggccaagctatgtctgaacaaagagagc

SEQ_ID_NO: _2	gctatctccattgctggcgcaagagggacgatagggatatatcgccccggaggtctactca
SEQ_ID_NO: _9	gctatctccattgctggcgcaagagggacgatagggatatatcgccccggaggtctactca
SEQ_ID_NO: _11	gctatctccattgctggcgcaagagggacgatagggatatatcgccccggaggtctactca
SEQ_ID_NO: _13	gctatctccattgctggcgcaagagggacgatagggatatatcgccccggaggtctactca

SEQ_ID_NO: _2	aagcaatttggaacgatcagcagcaagtctgatgtctatagctatgggatgatggtcctt
SEQ_ID_NO: _9	aagcaatttggaataataagcagcaagtctgatgtctatagctatgggatgatggtcctt
SEQ_ID_NO: _11	aagcaatttggaataataagcagcaagtctgatgtctatagctatgggatgatggtcctt
SEQ_ID_NO: _13	aagcaatttggaacaatcagcagcaagtctgatgtctatagctatgggatgatggtcctt

SEQ_ID_NO: _2	gagatggttgagcaagggacaggaataca-----agcgagatagtgaccatagcagc
SEQ_ID_NO: _9	gagatggttgagcaagggacaggaataca-----agcgagatagtgaccatagcagc
SEQ_ID_NO: _11	gagatggttgagcaagggacaggaataca-----agcgagatagtgaccatagcagc
SEQ_ID_NO: _13	gagatggttgagcaagggaaaggaatacaagcgcaagcgagatagtgaccatagcagc

Фиг. 2С

SEQ_ID_NO: _2	caatatttccctcagtggttttatgaacatttggacgactattgtgttggtgcttccgag
SEQ_ID_NO: _9	caatatttccctcagtggttttatgaacatttggacgactattgtgttggtgcttccgag
SEQ_ID_NO: _11	caatatttccctcagtggttttatgaacatttggacgactattgtgttggtgcttccgag
SEQ_ID_NO: _13	caatatttccctcagtggttttatgaacatttggacgactattgtgttggtgcttccgag

SEQ_ID_NO: _2	attaatggtgagaccacagagctcgtgaggaagatgatagttgtaggtctgtggtgcata
SEQ_ID_NO: _9	attaatggtgagaccacagagctcgtgaggaagatgatagttgtaggtctgtggtgcata
SEQ_ID_NO: _11	attaatggtgagaccacagagctcgtgaggaagatgatagttgtaggtctgtggtgcata
SEQ_ID_NO: _13	attaatggtgagaccacagagctcgtgaggaagatgatagttgtaggtctgtggtgcata

SEQ_ID_NO: _2	caagtgattccgactgatcgaccaacaatgacgagagtcgtcgagatggttgggaaggaagc
SEQ_ID_NO: _9	caagtgattccgactgatcgaccaacaatgacgagagtcgtcgagatggttgggaagggagc
SEQ_ID_NO: _11	caagtgattccgactgatcgaccaacaatgacgagagtcgtcgagatggttgggaagggagc
SEQ_ID_NO: _13	caagtgattccgactgatcgaccaacaatgacgagagtcgtcgagatggttgggaagggagc

SEQ_ID_NO: _2	acaagtaatctagagttgccacccagagttctcttgagctga
SEQ_ID_NO: _9	acaagtaatctagagttgccacccagagttctcttgagctga
SEQ_ID_NO: _11	acaagtaatctagagttgccacccagagttctcttgagctga
SEQ_ID_NO: _13	acgagtaatctagagttgccacccagagttctcttgagctga
	** *****

Фиг. 2D

Преобладает	MAAHLPRLPVLLLVLLAAHVVSTSAHAEPPLPSPYSTSAHGEPLPSTYNVSMCSESFWC GGV EIRYFFYLANATADYSG -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10 20 30 40 50 60 70 80 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
RLK1_A619HT2_CDS	MAAHLPRLPVLLLVLLAAHVVSTSAHAEPPLPSPYSTSAHGEPLPSTYNVSMCSESFWC GGV EIRYFFYLANATADYSG
RLK1_A619HT3_CDS	MAAHLPRLPVLLLVLLAAHVVSTSAHAEPPLPSPYSTSAHGEPLPSTYNVSMCSESFWC GGV EIRYFFYLANATADYSG
RLK1_B37HTN_CDS	MAAHQPHLSVLLLVLLAAHVVSTSAHGEPLPSPYNTSAHGEPLPSTYNASMCS-SFWC GGV EIRYFFYLANATADYSG
RLK1_A619HT2_Экзон1	MAAHLPRLPVLLLVLLAAHVVSTSAHAEPPLPSPYSTSAHGEPLPSTYNVSMCSESFWC GGV EIRYFFYLANATADYSG
RLK1_A619HT2_Экзон2	
RLK1_A619HT2_Экзон3	
Преобладает	SYSCGYTDL SVSCKLEVEGPTTTWTPTIRLGGDNYTVKNI---YDYHTISLADSDVLGGGECFVVHNVSFDETWLH-- -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 90 100 110 120 130 140 150 160 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
RLK1_A619HT2_CDS	SYSCGYTDL SVSCKLEVEGPTTTWTPTIRLGGDNYTVKNI---YDYHTISLADSDVLGGGECFVVHNVSFDETWLH--
RLK1_A619HT3_CDS	SYSCGYTDL SVSCKLEVEGPTTTWTPTIRLGGDNYTVKNI---YDYHTISLADSDVLGGGECFVVHNVSFDETWLH--
RLK1_B37HTN_CDS	SYSCGYTDL SVSCKLEVEGPTTTWTPTIRLGGDNYTVKNI---YDYHTISLADSDVLGGGECFVVHNVSFDETWLH--
RLK1_A619HT2_Экзон1	SYSCGYTDL SVSCKLEVEGPTTTWTPTIRLGGDNYTVKNI---YDYHTISLADSDVLGGGECFVVHNVSFDETWLH--
RLK1_A619HT2_Экзон2	
RLK1_A619HT2_Экзон3	
Преобладает	NPSAFDNL TFFFGCHWGPRDTLPEFAGNNISCAGFSTPAISGGGSFVFKPEDLDEHAEQELASHCDEVFSVPVRSEALQQ -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 170 180 190 200 210 220 230 240 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
RLK1_A619HT2_CDS	NPSAFDNL TFFFGCHWGPRDTLPEFAGNNISCAGFSTPAISGGGSFVFKPEDLDEHAEQELASHCDEVFSVPVRSEALQQ
RLK1_A619HT3_CDS	NPSAFDNL TFFFGCHWGPRDTLPEFAGNNISCAGFSTPAISGGGSFVFKPEDLDEHAEQELASHCDEVFSVPVRSEALQQ
RLK1_B37HTN_CDS	NPSAFDNL TFFFGCHWGPRDTLPEFAGNNISCAGFSTPAISGGGSFVFKPEDLDEHAEQELASHCDEVFSVPVRSEALQQ
RLK1_A619HT2_Экзон1	NPSAFDNL TFFFGCHWGPRDTLPEFAGNNISCAGFSTPAISGGGSFVFKPEDLDEHAEQELASHCDEVFSVPVRSEALQQ
RLK1_A619HT2_Экзон2	
RLK1_A619HT2_Экзон3	
Преобладает	AIVSNLSL--DGYGELLRQGI ELEWKRTSEDQCGQCEESGSGGRCAYSQKREFLGCFCSGGKAGNPFCKPSRSTKRREAA -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 250 260 270 280 290 300 310 320 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
RLK1_A619HT2_CDS	AIVSNLSL--DGYGELLRQGI ELEWKRTSEDQCGQCEESGSGGRCAYSQKREFLGCFCSGGKAGNPFCKPSRSTKRREAA
RLK1_A619HT3_CDS	AIVSNLSL--DGYGELLRQGI ELEWKRTSEDQCGQCEESGSGGRCAYSQKREFLGCFCSGGKAGNPFCKPSRSTKRREAA
RLK1_B37HTN_CDS	AIVSNFSLTRDGYGEVLRQGF ELEWNRTSEDQCGRCESGSGGWCAYSQKREFLGCLCSGGKVGSPFCKPSRS--KRKEG-
RLK1_A619HT2_Экзон1	AIVSNLSL--DGYGELLRQGI ELEWKRTSEDQCGQCEESGSGGRCAYSQKREFLGCFCSGGKAGNPFCKPSR
RLK1_A619HT2_Экзон2	STKRREAA
RLK1_A619HT2_Экзон3	
Преобладает	SIVGAVAVAFCLCLVILTCFLACRHCSLPFKSKNKPGETRIESFLQKNESIHPKRYTYADV KRM TKSF AVKL GQG GFGAVY -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 330 340 350 360 370 380 390 400 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
RLK1_A619HT2_CDS	SIVGAVAVAFCLCLVILTCFLACRHCSLPFKSKNKPGETRIESFLQKNESIHPKRYTYADV KRM TKSF AVKL GQG GFGAVY
RLK1_A619HT3_CDS	SIVGAVAVAFCLCLVILTCFLACRHCSLPFKSKNKPGETRIESFLQKNESIHPKRYTYADV KRM TKSF AVKL GQG GFGAVY
RLK1_B37HTN_CDS	PIVGAVAVAFCLCLVILTCFLACRHGSLPFKSENKPGETRIESFLQKNES--HPKRYTYADV KRM TKSF AVKL GQG GFGAVY
RLK1_A619HT2_Экзон1	
RLK1_A619HT2_Экзон2	SIVG
RLK1_A619HT2_Экзон3	AVAVAFCLCLVILTCFLACRHCSLPFKSKNKPGETRIESFLQKNESIHPKRYTYADV KRM TKSF AVKL GQG GFGAVY
Преобладает	KGSLHDGRQVAVKMLKDTQGDGEFFMNEVASISRTSHVNVVTTLLGFCLQGSKRALIYEYMPNGSLERYAFTGDMNSENLL -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 410 420 430 440 450 460 470 480 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
RLK1_A619HT2_CDS	KGSLHDGRQVAVKMLKDTQGDGEFFMNEVASISRTSHVNVVTTLLGFCLQGSKRALIYEYMPNGSLERYAFTGDMNSENLL
RLK1_A619HT3_CDS	KGSLHDGRQVAVKMLKDTQGDGEFFMNEVASISRTSHVNVVTTLLGFCLQGSKRALIYEYMPNGSLERYAFTGDMNSENLL
RLK1_B37HTN_CDS	KGSLHDGRQVAVKMLKDTQGDGEFFMNEVASISRTSHVNVVTTLLGFCLQGSKRALIYEYMPNGSLERYAFTGDMNSENLL
RLK1_A619HT2_Экзон1	
RLK1_A619HT2_Экзон2	
RLK1_A619HT2_Экзон3	KGSLHDGRQVAVKMLKDTQGDGEFFMNEVASISRTSHVNVVTTLLGFCLQGSKRALIYEYMPNGSLERYAFTGDMNSENLL

Фиг. 3А

Преобладает	TWERLFDIAIGTARGLEYLHRCNTRIVHFDIKPHNILLDQDFCPKISDFGLAKLCLNKESAISIAGARGTIGYIAPEVY -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 490 500 510 520 530 540 550 560 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
RLK1_A619HT2_CDS	TWERLFDIAIGTARGLEYLHRCNTRIVHFDIKPHNILLDQDFCPKISDFGLAKLCLNKESAISIAGARGTIGYIAPEVY
RLK1_A619HT3_CDS	TWERLFDIAIGTARGLEYLHRCNTRIVHFDIKPHNILLDQDFCPKISDFGLAKLCLNKESAISIAGARGTIGYIAPEVY
RLK1_B37HTN_CDS	TWERLFDIAIGTARGLEYLHRCNTRIVHFDIKPHNILLDQDFCPKISDFGLAKLCLNKESAISIAGARGTIGYIAPEVY
RLK1_A619HT2_Экзон1	
RLK1_A619ht2_Экзон2	
RLK1_A619ht2_Экзон3	TWERLFDIAIGTARGLEYLHRCNTRIVHFDIKPHNILLDQDFCPKISDFGLAKLCLNKESAISIAGARGTIGYIAPEVY
Преобладает	SKQFGTISSEKSDVYSYGMVLEMVGARDRNTSADSDHSSQYFPQWLYEHLDDYCVGASEINGETTELVRKMIVVGLWCIQ -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 570 580 590 600 610 620 630 640 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
RLK1_A619HT2_CDS	SKQFGTISSEKSDVYSYGMVLEMVGARDRNTSADSDHSSQYFPQWLYEHLDDYCVGASEINGETTELVRKMIVVGLWCIQ
RLK1_A619HT3_CDS	SKQFGTISSEKSDVYSYGMVLEMVGARDRNTSADSDHSSQYFPQWLYEHLDDYCVGASEINGETTELVRKMIVVGLWCIQ
RLK1_B37HTN_CDS	SKQFGTISSEKSDVYSYGMVLEMVGARDRNTSADSDHSSQYFPQWLYEHLDDYCVGASEINGETTELVRKMIVVGLWCIQ
RLK1_A619HT2_Экзон1	
RLK1_A619ht2_Экзон2	
RLK1_A619ht2_Экзон3	SKQFGTISSEKSDVYSYGMVLEMVGARDRNTSADSDHSSQYFPQWLYEHLDDYCVGASEINGETTELVRKMIVVGLWCIQ
Преобладает	VIPTDRPTMTRVVEMLEGSTSNLELPFRVLLS- -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 650 660 670 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
RLK1_A619HT2_CDS	VIPTDRPTMTRVVEMLEGSTSNLELPFRVLLS.
RLK1_A619HT3_CDS	VIPTDRPTMTRVVEMLEGSTSNLELPFRVLLS.
RLK1_B37HTN_CDS	VIPTDRPTMTRVVEMLEGSTSNLELPFRVLLS.
RLK1_A619HT2_Экзон1	
RLK1_A619ht2_Экзон2	
RLK1_A619ht2_Экзон3	VIPTDRPTMTRVVEMLEGSTSNLELPFRVLLS.

Фиг. 3В

SEQ ID NO: 2	1 atggctgctcaacctaccacgcctccccgtcctcctcctcgctcctcctgc	50
SEQ ID NO: 21	1 atggctgctcaacctaccacgcctccccgtcctcctcctcgctcctcctgc	50
SEQ ID NO: 2	51 tgcccatgtcgctctccacctccgcccattgcccagcctcctcttccgagcc	100
SEQ ID NO: 21	51 tgcccatgtcgctctccacctccgcccattgcccagcctcctcttccgagcc	100
SEQ ID NO: 2	101 cttacagcacctccgcccattggcgagcctcctcttccgagcacttacaac	150
SEQ ID NO: 21	101 cttacagcacctccgcccattggcgagcctcctcttccgagcacttacaac	150
SEQ ID NO: 2	151 gtctccatgtgctcggaatcgttctgggtgcggcggtcgaaatccgcta	200
SEQ ID NO: 21	151 gtctccatgtgctcggaatcgttctgggtgcggcggtcnaaatccgcta	200
SEQ ID NO: 2	201 cccgttctatcttggcaacgcacccgcgactacagcgggagctactact	250
SEQ ID NO: 21	201 cccgttctatcttggcaacgcacccgcgactacagcgggagctactact	250
SEQ ID NO: 2	251 cctgcgggtacaccgacttgagcggttccctgcaaaactcgaggtcgagggg	300
SEQ ID NO: 21	251 cctgcgggtacnccgacttgagcggttccctgcaaaactcgaggtcgagggg	300
SEQ ID NO: 2	301 ccgacgacgacatggacccctaccatccgtctcggcgggcgacaactacac	350
SEQ ID NO: 21	301 ccgacgacgacatggacccctaccatccgtctcggcgggcgacaactacac	350
SEQ ID NO: 2	351 cgtcaagaacatcttgtagcactatcataccatctcactggcgggacagcg	400
SEQ ID NO: 21	351 cgtcaagaacatcttgtagcactatcataccatctcactggcgggacagcg	400
SEQ ID NO: 2	401 atgtgctcggaggcggcgagtgcctccgtcgccaccacaacgtcagcttc	450
SEQ ID NO: 21	401 atgtgctcggaggcggcgagtgcctccgtcgccaccacaacgtcagcttc	450
SEQ ID NO: 2	451 gacgagacgtggctgcacaaccccagcgccttcgacaacctcaccttctt	500
SEQ ID NO: 21	451 gacgagacgtggctgcacaaccccagcgccttcgacaacctcaccttctt	500
SEQ ID NO: 2	501 cttcggatgccactgggggcccacgcgatacactgcctgaatttgcgggca	550
SEQ ID NO: 21	501 cttcggatgccactgggggcccacgcgatacactgcctgaatttgcgggca	550
SEQ ID NO: 2	551 acaacatcagctgcgcgggttcagtactccagctatcagcgggtggaggc	600
SEQ ID NO: 21	551 acaacatcagctgcgcgggttcagtactccagctatcagcgggtggaggc	600
SEQ ID NO: 2	601 tccttcgtgttcaagcctgaagatcttgacgaacatgcggagcaggagtt	650
SEQ ID NO: 21	601 tccttcgtgttcaagcctgaagatcttgacgaacatgcggagcaggagtt	650
SEQ ID NO: 2	651 ggcttcacactgcgacgaggttttctccgtgcagtgagaagcgaggctc	700
SEQ ID NO: 21	651 ggcttcacactgcgacgaggttttctccgtgcagtgagaagcgaggctc	700
SEQ ID NO: 2	701 tgcagcaggcgatcgtcagcaacctcagcctcggggacgggtacggcgag	750
SEQ ID NO: 21	701 tgcagcaggcgatcgtcagcaacctcagcctcggggacgggtacggcgag	750
SEQ ID NO: 2	751 ctgcttaggcaggggatcgagttggaatggaacggacatcggaggatca	800
SEQ ID NO: 21	751 ctgcttaggcaggggatcgagttggaatggaacggacatcggaggatca	800
SEQ ID NO: 2	801 gtgtggccagtgcgaggaatcgggctccggcggacggtgcgcctacagcc	850
SEQ ID NO: 21	801 gtgtggccagtgcgaggaatcgggctccggcggacggtgcgcctacagcc	850
SEQ ID NO: 2	851 agaagagagaattccttggtgcttctgcagcggagggaaggcgggcaac	900
SEQ ID NO: 21	851 agaagagagaattccttggtgcttctgcagcggagggaaggcgggcaac	900

Фиг. 4А

SEQ ID NO: 2	901	ccgttctgcaaaccatcaagatcaacaaaaaggagagaagcagcatctat	950
SEQ ID NO: 21	901	ccgttctgcaaaccatcaagatcaacaaaaaggagagaagcagcatctat	950
SEQ ID NO: 2	951	tgttgggtgctgttgccgttgcaattcctgtgtctagtcattctcacatgct	1000
SEQ ID NO: 21	951	tgttgggtgctgttgccgttgcaattcctgtgtctagtcattctcacatgct	1000
SEQ ID NO: 2	1001	tcttggcttgttagacattgttcgctgcccttcaaatacgaagaacaaacca	1050
SEQ ID NO: 21	1001	tcttggcttgttagacatggttcgctgcccttcaaatacggagaacaaacca	1050
SEQ ID NO: 2	1051	gggacaaggattgagtccttctctacagaagaacgagagtagtatacatcc	1100
SEQ ID NO: 21	1051	gggacaaggattgagtccttctctacagaagaacgagagtagtatacatcc	1097
SEQ ID NO: 2	1101	gaaaagatacacctacgcggacgtgaaaagaatgacaaaatccttcgctg	1150
SEQ ID NO: 21	1098	gaaaagatacacctacgcggacgtgaaaagaatgacaaaatccttcgctg	1147
SEQ ID NO: 2	1151	tgaagctaggccaaggtgggtttggtgctgtatacaaaggcagcctccac	1200
SEQ ID NO: 21	1148	tgaagctaggccaaggtgggtttggtgctgtatacaaaggcagcctccac	1197
SEQ ID NO: 2	1201	gatggccgacaggtagcagtcgaagatgctgaaggacaccaaggtagcgg	1250
SEQ ID NO: 21	1198	gatggccgacaggtagcagtcgaagatgctgaaggacaccaaggtagcgg	1247
SEQ ID NO: 2	1251	cgaggaattcatgaacgaggtggctagcatcagcaggacttctcatgtca	1300
SEQ ID NO: 21	1248	cgaggaattcatgaacgaggtggctagcatcagcaggacttctcatgtca	1297
SEQ ID NO: 2	1301	acgtcgtgacacttctagggttttgcttgcaagggtcgaaaagagcactg	1350
SEQ ID NO: 21	1298	acgtcgtgacacttctagggttttgcttgcaagggtcgaaaagagcactg	1347
SEQ ID NO: 2	1351	atctacgagtagcatgccaatggttcgctcgaaaggtagccttcaccgg	1400
SEQ ID NO: 21	1348	atctacgagtagcatgccaatggttcgctcgaaaggtagccttcaccgg	1397
SEQ ID NO: 2	1401	tgacatgaacagtgagaatttgctaacctgggaaagactatttgacatag	1450
SEQ ID NO: 21	1398	tgacatgaacagtgagaatttgctaacctgggaaagactatttgacatag	1447
SEQ ID NO: 2	1451	cgattggcac--ggccagagggctcgaaatacctacacgggggatgcaaca	1498
SEQ ID NO: 21	1448	caattggcacacggccagagggctcgaaatacctacacgggggatgcaaca	1497
SEQ ID NO: 2	1499	ctcggatcgtgcattttgacatcaagccacacaacatcctgttagaccag	1548
SEQ ID NO: 21	1498	ctcggatcgtgcattttgacatcaagccacacaacatcctgttagaccag	1547
SEQ ID NO: 2	1549	gatttctgccttaagatctctgactttggactggccaagctatgtctgaa	1598
SEQ ID NO: 21	1548	gatttctgccttaagatctctgactttggactggccaagctatgtctgaa	1597
SEQ ID NO: 2	1599	caaagagagcgctatctccattgctggcgcaagagggacgatagggtata	1648
SEQ ID NO: 21	1598	caaagagagcgctatctccattgctggcgcaagagggacgatagggtata	1647
SEQ ID NO: 2	1649	tgcgcccgaggtctactcaaagcaatttggaacgatcagcagcaagtct	1698
SEQ ID NO: 21	1648	tgcgcccgaggtctactcaaagcaatttggaacaataagcagcaagtct	1697
SEQ ID NO: 2	1699	gatgtctatagctatgggatgatggctccttgagatggttgagcaaggga	1748
SEQ ID NO: 21	1698	gatgtctatagctatgggatgatggctccttgagatggttgagcaaggga	1747
SEQ ID NO: 2	1749	caggaatacaagcgcagatagtgaccatagcagccaatatttcctcagt	1798
SEQ ID NO: 21	1748	caggaatacaagcgcagatagtgaccatagcagccaatatttcctcagt	1797

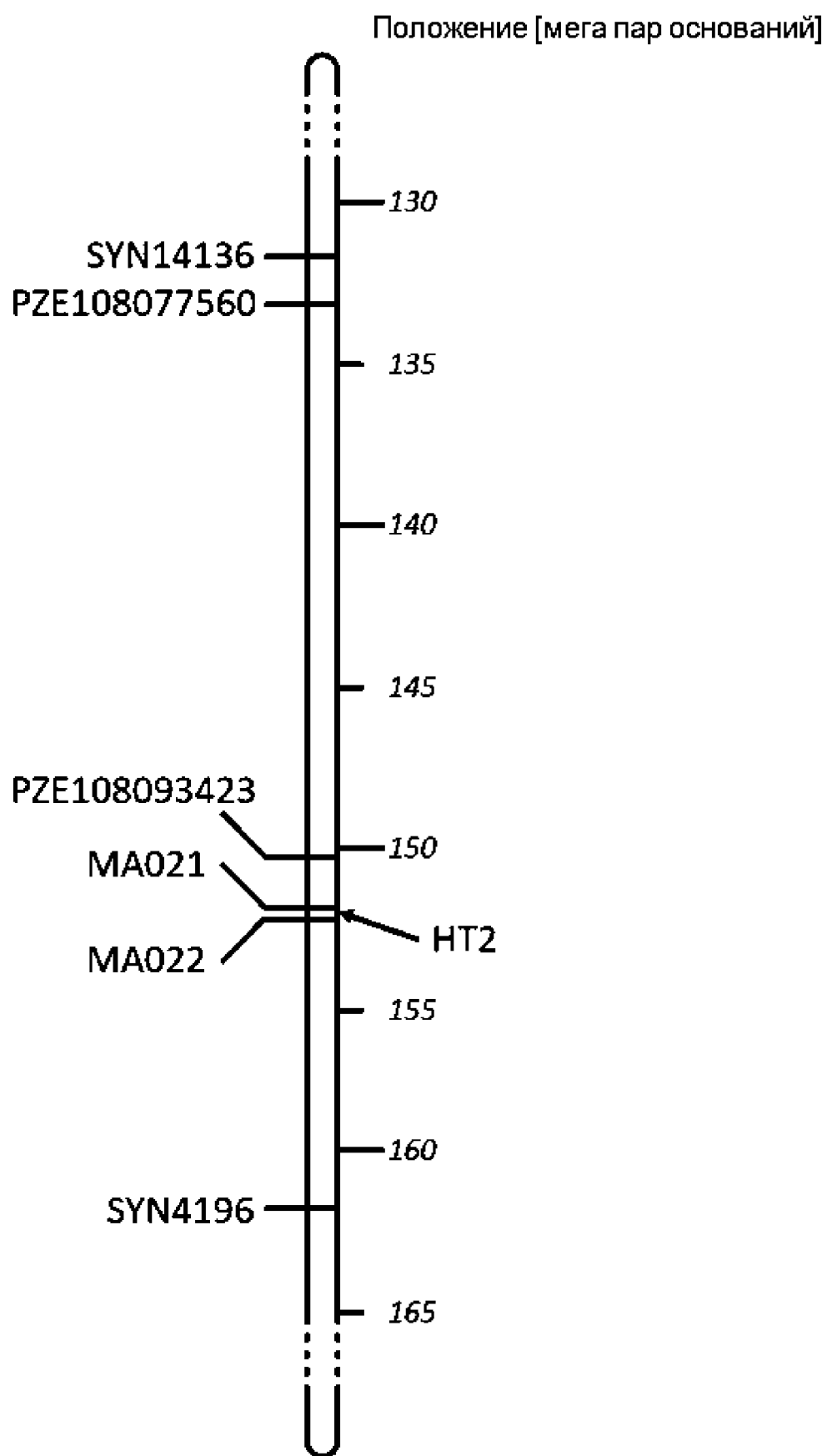
Фиг. 4В

SEQ ID NO: 2	1799	ggctttatgaacatttggacgactattgtgttggtgcttccgagattaat	1848
		.	
SEQ ID NO: 21	1798	ggctttatgagcatttggacgactattgtgttggtgcttccgagattaat	1847
SEQ ID NO: 2	1849	ggtgagaccacagagctcgtgaggaagatgatagttgtaggtctgtggtg	1898
SEQ ID NO: 21	1848	ggtgagaccacagagctcgtgaggaagatgatagttgtaggtctgtggtg	1897
SEQ ID NO: 2	1899	catacaagtgattccgactgatcgaccaacaatgacgagagtcgtcgaga	1948
SEQ ID NO: 21	1898	catacaagtgattccgactgatcgaccaacaatgacgagagtcgtcgaga	1947
SEQ ID NO: 2	1949	tgttggaaggaagcacaagtaatctagagttgccaccagagttctcttg	1998
SEQ ID NO: 21	1948	tgttggaaggaagcacaagtaatctagagttgccaccagagttctcttg	1997
SEQ ID NO: 2	1999	agctga	2004
SEQ ID NO: 21	1998	agctga	2003

Фиг. 4С

SEQ_ID_NO:_3	1	MAAHLPRLPVLLLVLAAHVVSTSAHAEPPLPSPYSTSAHGEPPLPSTYN	50
SEQ_ID_NO:_24	1	MAAHLPRLPVLLLVLAAHVVSTSAHAEPPLPSPYSTSAHGEPPLPSTYN	50
SEQ_ID_NO:_3	51	VSMCSESFWC GGVEIRYPFYLANATADYSGSYSCGYTDL SVSCKLEVEG	100
SEQ_ID_NO:_24	51	VSMCSESFWC GGVIIRYPFYLANATADYSGSYSCGYXDL SVSCKLEVEG	100
SEQ_ID_NO:_3	101	PTTTWTPTIRLGGDNYTVKNILYDYHTISLADSDVLGGGECPPVHHNVSF	150
SEQ_ID_NO:_24	101	PTTTWTPTIRLGGDNYTVKNILYDYHTISLADSDVLGGGECPPVHHNVSF	150
SEQ_ID_NO:_3	151	DETWLHNPSAFDNLTFFFGCHWGPRDTLPEFAGNNISCAGFSTPAISGGG	200
SEQ_ID_NO:_24	151	DETWLHNPSAFDNLTFFFGCHWGPRDTLPEFAGNNISCAGFSTPAISGGG	200
SEQ_ID_NO:_3	201	SFVFKPEDLDEHAEQELASHCDEVFSVPVRSEALQQAI VSNLSLGDGYGE	250
SEQ_ID_NO:_24	201	SFVFKPEDLDEHAEQELASHCDEVFSVPVRSEALQQAI VSNLSLGDGYGE	250
SEQ_ID_NO:_3	251	LLRQGIELEWKRTSEDQCGQCEESGSGGRCAYSQKREFLGCFCSGGKAGN	300
SEQ_ID_NO:_24	251	LLRQGIELEWKRTSEDQCGQCEESGSGGRCAYSQKREFLGCLCSGGKAGN	300
SEQ_ID_NO:_3	301	PFCKPSRSTKRREAASIVGAVAVAFCLVLTCFLACRHCSLPFKSKNKP	350
SEQ_ID_NO:_24	301	PFCKPSRSTKRREAASIVGAVAVAFCLVLTCFLACRHGSLPFKSENKP	350
SEQ_ID_NO:_3	351	GTRIESFLQKNESSIHPKRYTYADVCRMTKSFVAVKLQGGFGAVYKGLH	400
SEQ_ID_NO:_24	351	GTRIESFLQKNE-SIHPKRYTYADVCRMTKSFVAVKLQGGFGAVYKGLH	399
SEQ_ID_NO:_3	401	DGRQVAVKMLKDTQGDGEEFMNEVASISRTSHVNVVTLLGFCLQGSKRAL	450
SEQ_ID_NO:_24	400	DGRQVAVKMLKDTQGDGEEFMNEVASISRTSHVNVVTLLGFCLQGSKRAL	449
SEQ_ID_NO:_3	451	IYEYMPNGSLERYAFTGDMNSENLLTWERLFDIAIGTARGLEYLHRGCNT	500
SEQ_ID_NO:_24	450	IYEYMPNGSLERYAFTGDMNSENLLTWERLFDIAIGTARGLEYLHRGCNT	499
SEQ_ID_NO:_3	501	RIVHFDIKPHNILLDQDFCPKISDFGLAKLCLNKESAI SIAGARTIGYI	550
SEQ_ID_NO:_24	500	RIVHFDIKPHNILLDQDFCPKISDFGLAKLCLNKESAI SIAGARTIGYI	549
SEQ_ID_NO:_3	551	APEVYSKQFGTIS SKSDVYSYGMVLEMVGARDRNTSADSDHSSQYFPQW	600
SEQ_ID_NO:_24	550	APEVYSKQFGTIS SKSDVYSYGMVLEMVGARDRNTSADSDHSSQYFPQW	599
SEQ_ID_NO:_3	601	LYEHLDDYCVGASEINGETTELVRKMI VVGLWCIQVIPTDRPTMTRVVEM	650
SEQ_ID_NO:_24	600	LYEHLDDYCVGASEINGETTELVRKMI VVGLWCIQVIPTDRPTMTRVVEM	649
SEQ_ID_NO:_3	651	LEGSTSNLELPPRVLLS	667
SEQ_ID_NO:_24	650	LEGSTSNLELPPRVLLS	666

Фиг. 5



Фиг. 6