



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.04.15**

**(51)** Int. Cl. *C12N 15/29* (2006.01)  
*C12Q 1/68* (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201891314**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.11.21**

**(54) ГЕН РЕЗИСТЕНТНОСТИ К СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЕ**

**(31)** 2015904976

**(32)** 2015.12.01

**(33)** AU

**(43)** 2019.03.29

**(86)** PCT/AU2016/051131

**(87)** WO 2017/091847 2017.06.08

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**КОММОНВЕЛТ САЙЕНТИФИК  
ЭНД ИНДАСТРИАЛ РИСЕРЧ  
ОРГАНИЗЕЙШН (AU)**

**(72)** Изобретатель:  
**Перияннан Самбасивам Куппусами,  
Доддс Питер Норман, Маго Рохит,  
Лагуда Эванс (AU)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** MAGO, R., et al., "The wheat Sr50 gene reveals rich diversity at a cereal disease resistance locus", Nature Plants, 2015 (ePub date 30 November 2015), vol. 1, article 15186. Abstract, Figures 2 and S4, Tables S1, S4 and S7, Pg. 1 cl. 1 para. 3 - cl. 2 para. 3, Pg. 3 cl. 1 para. 2 - cl. 2. para. 3

GenBank Accession No. KT725812, 22 November 2015. To be read with MAGO et al. as a single source of information

WO-A1-2014194371

PERIYANNAN, S., et al., "The gene Sr33, an ortholog of barley Mia genes, encodes resistance to

wheat stem rust race Ug99", Science, 2013, vol. 341, no. 6147, pages 786-788. Abstract, Tables S1 and S5, Figure 2, S3 and S5, Pg. 786 cl. 3 - Pg. 787 cl. 3, Supplementary Materials Pg. 2 "Plant Materials", Pg. 3 "Wheat Transformation", Pg. 5 "Yeast two-hybrid analysis"

GenBank Accession No. AGQ17379.1, 14 July 2013. To be read with PERIYANNAN et al. as a single source of information

GenBank Accession No. KF031283.1, 16 August 2013. To be read with PERIYANNAN et al. as a single source of information

ANUGRAHWATI, D., et al., "Isolation of wheat-rye IRS recombinants that break the linkage between the stem rust resistance gene SrR and secalin", Genome, 2008, vol. 51, no. 5, pages 341-349. Abstract, Figures 1-4, Pg. 343

SEEHOLZER, S., et al., "Diversity at the Mia powdery mildew resistance locus from cultivated barley reveals sites of positive selection", Molecular Plant-Microbe Interactions, 2010, vol. 23, no. 4, pages 497-509. Abstract, Tables 1 and S2, Figure 4, Pg. 504 cl. - Pg 505 cl. 1 para. 2

GenBank Accession No. GU245948.1, 05 May 2010. To be read with SEEHOLZER et al. as a single source of information.

CESARI, S., et al., "Cytosolic activation of cell death and stem rust resistance by cereal MLA-family CC-NLR proteins", Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, vol. 113, no. 36, pages 10204-10209. Abstract, Figures 1-5 and S2-S6, Table S3, SI Methods

**(57)** Изобретение относится к трансгенному растению, в геном которого встроен экзогенный полинуклеотид, кодирующий полипептид, придающий резистентность к одной или нескольким расам Puccinia graminis f. sp. tritici, таким как группа рас Ug99 Puccinia graminis f. sp. tritici.

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к трансгенному растению, в геном которого встроен экзогенный полинуклеотид, кодирующий полипептид, придающий резистентность к одной или нескольким расам *Puccinia graminis*, таким как группа рас Ug99 *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*.

### Предпосылки изобретения

Грибковый патоген *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* (Pgt), возбудитель стеблевой ржавчины пшеницы, является основной угрозой производству пшеницы, частично из-за уровня вреда, который он может приносить культурам пшеницы с почти полными потерями при тяжелых эпидемиях. Хотя резистентные к ржавчине культивары помогали контролировать заболевание в течение более 40 лет, появление в Уганде в 1999 году расы Pgt TTKSK, общеизвестной как Ug99, и последующее распространение ее производных в другие части Африки и на Ближнем Востоке подчеркнули сохраняющуюся опасность стеблевой ржавчины. Ug99 и штаммы-производные являются вирулентными для растений, содержащих ген резистентности к стеблевой ржавчине Sr31, ранее обеспечивавший эффективную резистентность в течение более 30 лет (Ellis et al., 2014), а также многие другие распространенные гены резистентности к стеблевой ржавчине (Sr) (Singh et al., 2011). Недавнее появление другой расы Pgt (отличающейся от линии Ug99) в Германии и Эфиопии в 2013-2014 гг., атакующей важные коммерческие сорта пшеницы, вызвало серьезную обеспокоенность в области производства пшеницы. Хотя с тех пор организация по международному сотрудничеству Borlaug Global Rust Initiative (BGRI) стала активно участвовать в разработке стратегий контроля стеблевой ржавчины, изменения глобального климата и глобальное потепление потенциально могут приводить к образованию дополнительных областей для эпидемий ржавчины, которые ранее считали безопасными от стеблевой ржавчины (Chakraborty et al., 2011).

Контроль бурой ржавчины пшеницы зависит от встраивания эффективных генов резистентности при разведении, и для обеспечения длительной резистентности ключевыми являются комбинации множества генов резистентности к стеблевой ржавчине, что делает необходимой идентификацию новых генов резистентности. Дикие и культивируемые родственные формы пшеницы представляют собой важную совокупность новых генов, эффективных против патогенов бурой ржавчины пшеницы. Рожь посевная (*Secale cereale*) является одним из таких источников, и несколько генов ржи используют в разведении резистентной к ржавчине пшеницы мягкой и тритикале. Фактически, ген резистентности Sr31 интрогрессировали из ржи в виде полной замены хромосомы пшеницы 1B или в виде транслокации короткого плеча хромосомы 1 (1RS) ржи из культивара ржи Petkus (Zeller, 1973) в длинное плечо хромосомы 1B (1BL) пшеницы, и он придавал резистентность к стеблевой ржавчине в полевых условиях в течение более 30 лет (Ellis et al., 2014). Sr50 (ранее известный как SrR) также интрогрессировали в пшеницу в виде транслокаций 1RS в длинные плечи хромосом 1B и 1D пшеницы, но получали их из культивара ржи Imperial (Shepherd 1973; Mago et al., 2004). Третий ген резистентности к стеблевой ржавчине, также известный как Sr1RS<sup>Amigo</sup>, интрогрессировали в виде транслокации 1RS из культивара ржи Insave в хромосому 1A пшеницы культивара Amigo (Zeller and Fuchs, 1983). Так как эти гены ржи придают резистентность ко всем известным штаммам Pgt, неясно, обеспечивают ли они разные специфичности резистентности. Sr31 и Sr50 ассоциированы с кластером генов на 1RS (Mago et al., 2004 и 2005), кодирующим биспиральные нуклеотид-связывающие белки с повторами, богатыми лейцином, (CC-NB-LRR) ортологичные кластеру генов ячменя Mla, обеспечивающему резистентность к *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (патогену настоящей мучнистой росы) (Wei et al., 1999 и 2002). Однако неизвестно, какой из этих белков, если это и имеет место, являлся продуктом самого гена Sr50. Недавно клонированный ген Sr33 из *Triticum tauschii* (Periyannan et al., 2013) является ортологом Mla и, подобно Sr50, обеспечивает резистентность к распространенным по всему миру изолятам Pgt, таким образом снова не позволяя разграничить эти две специфичности.

Локус Mla ячменя является одним из наиболее разнообразных классов генов резистентности злаков, кодирующим более 30 различных аллелей с разными специфичностями резистентности к настоящей мучнистой росе ячменя (Seeholzer et al., 2010). Этот локус также является потенциальным источником полезной резистентности к заболеваниям у других злаков, включая пшеницу. Например, ген TmMla1 пшеницы присутствует в диплоидном А-геноме вида пшеницы *Triticum monosocum*, является ортологом Mla и придает раса-специфичную резистентность к настоящей мучнистой росе пшеницы (Jordan et al., 2011). Недавно идентифицированный ген Sr33, перенесенный в пшеницу из диплоидного D-генома вида *Ae. tauschii*, является первым известным членом семейства Mla, обеспечивающим резистентность к Pgt (Periyannan et al., 2013).

Существует острая потребность в идентификации генов, придающих растениям, особенно пшенице, по меньшей мере, некоторый уровень резистентности к *Puccinia graminis*, таким как группа рас Ug99 *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*.

### Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения идентифицировали полипептиды, придающие растениям, особенно ржи и пшенице, по меньшей мере, некоторый уровень резистентности к *Puccinia graminis*, таким как группа рас Ug99 *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*.

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к трансгенному растению, в ге-

ном которого встроен экзогенный полинуклеотид, кодирующий полипептид, придающий резистентность к *Puccinia graminis*, где полинуклеотид функционально связан с промотором, способным регулировать экспрессию полинуклеотида в клетке растения.

В варианте осуществления *Puccinia graminis* является *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. В дополнительном варианте осуществления *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* является расой из группы Ug99.

В другом варианте осуществления трансгенное растение имеет повышенную резистентность к *Puccinia graminis* по сравнению с изогенным растением, в котором отсутствует экзогенный полинуклеотид.

В варианте осуществления полипептид является полипептидом Sr50.

В дополнительном варианте осуществления:

i) полипептид содержит аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или являющуюся ее биологически активным фрагментом, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 82% идентичную SEQ ID NO: 1; и/или

ii) полинуклеотид содержит нуклеотиды, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, последовательность, по меньшей мере на 82% идентичную SEQ ID NO: 10, или последовательность, гибридизующуюся с SEQ ID NO: 10.

В варианте осуществления полипептид содержит один или несколько, предпочтительно все, из биспирального домена (CC), нуклеотид-связывающего домена (NB) и домена богатых лейцином повторов (LRR).

В дополнительном варианте осуществления полипептид содержит один или несколько, предпочтительно все, из мотива р-петли и мотива киназы 3а в домене NB.

В варианте осуществления мотив р-петли содержит последовательность GxxGxGK(T/S)T (SEQ ID NO: 4), более предпочтительно последовательность GFGLGKTT (SEQ ID NO: 5).

В варианте осуществления мотив киназы 3а содержит последовательность GxxxxTxR (SEQ ID NO: 6), более предпочтительно последовательность GSRLTTTR (SEQ ID NO: 7).

В дополнительном варианте осуществления домен LRR содержит от приблизительно 5 до приблизительно 20 или от приблизительно 10 до приблизительно 20 несовершенных повторов последовательности xxLxLxxxx (SEQ ID NO: 8).

В варианте осуществления полипептид придает более высокую резистентность к *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* расы TTKSK, чем Sr33 (с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 13). В другом варианте осуществления Sr33 (с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 13) придает более высокую резистентность к *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* расы QFCSC, чем полипептид по изобретению. В варианте осуществления, как подробно описано в примере 2, определяют более высокую резистентность, если полипептид по изобретению находится в линии T. aestivum Gabo 1DL.1RS-DR.A1 и если Sr33 находится в линии T. aestivum Westonia/CS1D5405.

Предпочтительно растение является злаковым растением. Неограничивающие примеры трансгенных злаковых растений по изобретению включают пшеницу, ячмень, кукурузу, рис, овес, сорго и тритикале. В особенно предпочтительном варианте осуществления растение является пшеницей.

В дополнительном варианте осуществления растение содержит один или несколько дополнительных экзогенных полинуклеотидов, кодирующих другой полипептид резистентности к патогену растений. Неограничивающие примеры таких других полипептидов резистентности к патогену растений включают Lr34, Lr1, Lr3, Lr2a, Lr3ka, Lr11, Lr13, Lr16, Lr17, Lr18, Lr21, LrB, Sr35 и Sr33. В варианте осуществления растение, по меньшей мере, дополнительно содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий полипептид резистентности к патогену растений Sr33. Например, растение, по меньшей мере, дополнительно содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 87% идентичную, по меньшей мере на 90% идентичную или по меньшей мере на 95% идентичную одной или обоим из SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, придающим резистентность к *Puccinia graminis*.

Предпочтительно растение является гомозиготным по экзогенному полинуклеотиду.

В варианте осуществления растение выращивают в полевых условиях.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к трансгенному растению, в геном которого встроен экзогенный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 82% идентичную SEQ ID NO: 1, где полинуклеотид функционально связан с промотором, способным регулировать экспрессию полинуклеотида в клетке растения.

Настоящее изобретение также относится к популяции по меньшей мере из 100 трансгенных растений по изобретению, выращиваемых в полевых условиях.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу идентификации полинуклеотида, кодирующего полипептид, придающий резистентность к *Puccinia graminis*, включающий:

i) получение полинуклеотида, функционально связанного с промотором, кодирующего полипептид, содержащий аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, его биоло-

гически активный фрагмент или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 82% идентичную SEQ ID NO: 1;

- ii) встраивание полинуклеотида в растение;
- iii) определение того, модифицирован ли уровень резистентности к *Puccinia graminis* относительно изогенного растения, в котором отсутствует полинуклеотид; и
- iv) необязательно, селекцию полинуклеотида, при экспрессии придающего резистентность к *Puccinia graminis*.

В варианте осуществления способ включает одно или несколько из следующего:

- a) полинуклеотид содержит нуклеотиды, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, последовательность, по меньшей мере на 82% идентичную SEQ ID NO: 10, или последовательность, гибридизующуюся с SEQ ID NO: 10;
- b) растение является злаковым растением, таким как растение пшеницы;
- c) полипептид является полипептидом растения или его мутантом;
- d) стадия ii) дополнительно включает стабильное встраивание полинуклеотида, функционально связанного с промотором, в геном растения.

Настоящее изобретение также относится в значительной степени к очищенному и/или рекомбинантному полипептиду резистентности растения к *Puccinia graminis*.

В варианте осуществления полипептид является полипептидом Sr50.

В другом варианте осуществления полипептид содержит аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или являющуюся ее биологически активным фрагментом, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 82% идентичную, по меньшей мере на 90% идентичную или по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится в значительной степени к очищенному и/или рекомбинантному полипептиду, содержащему аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 82% идентичную, по меньшей мере на 90% идентичную или по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 1.

В варианте осуществления полипептид по изобретению является слитым белком, дополнительно содержащим по меньшей мере одну другую полипептидную последовательность. По меньшей мере один другой полипептид может являться, например, полипептидом, повышающим стабильность полипептида по настоящему изобретению, или полипептидом, облегчающим очистку или детекцию слитого белка.

В еще одном дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному и/или экзогенному полинуклеотиду, содержащему нуклеотиды, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, последовательность, по меньшей мере на 82% идентичную SEQ ID NO: 10, последовательность, кодирующую полипептид по изобретению, или последовательность, гибридизующуюся с SEQ ID NO: 10.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к химерному вектору, содержащему полинуклеотид по изобретению.

Предпочтительно полинуклеотид функционально связан с промотором.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантной клетке, содержащей экзогенный полинуклеотид по изобретению и/или вектор по изобретению.

Клетка может относиться к любому типу клеток, в качестве неограничивающих примеров, такому как растительная клетка, бактериальная клетка, клетка животного или дрожжевая клетка.

Предпочтительно клетка является растительной клеткой. Более предпочтительно растительная клетка является клеткой злакового растения. Даже более предпочтительно клетка злакового растения является клеткой пшеницы.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения полипептида по изобретению, включающему экспрессию полинуклеотида по изобретению в клеточной или бесклеточной системе экспрессии.

Предпочтительно способ дополнительно включает выделение полипептида.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к трансгенному, не являющемуся человеком организму, содержащему экзогенный полинуклеотид по изобретению, вектор по изобретению и/или рекомбинантную клетку по изобретению.

Предпочтительно трансгенный, не являющийся человеком организм является растением. Предпочтительно растение является злаковым растением. Более предпочтительно злаковое растение является растением пшеницы.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения клетки по изобретению, включающему стадию встраивания полинуклеотида по изобретению или вектора по изобретению в клетку.

Предпочтительно клетка является растительной клеткой.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения трансгенного растения по изобретению, включающему следующие стадии:

- i) встраивание полинуклеотида по изобретению и/или вектора по изобретению в клетку растения;
- ii) регенерация трансгенного растения из клетки;
- iii) необязательно, сбор семян растения и/или
- iv) необязательно, получение из трансгенного растения одного или нескольких растений-потомков, таким образом, получения трансгенного растения.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения растения, в геноме которого встроен полинуклеотид, кодирующий полипептид, придающий резистентность к *Puccinia graminis*, включающий стадии:

- i) скрещивание двух родительских растений, где по меньшей мере одно растение содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид, придающий резистентность к *Puccinia graminis*;
- ii) скрининг одного или нескольких растений-потомков скрещивания на наличие или отсутствие полинуклеотида;
- iii) селекция растения-потомка, содержащего полинуклеотид, таким образом, получения растения.

В варианте осуществления по меньшей мере одно из родительских растений является трансгенным растением по изобретению, и выбранное растение-потомок содержит экзогенный полинуклеотид, кодирующий полипептид, придающий резистентность к *Puccinia graminis*.

В дополнительном варианте осуществления по меньшей мере одно из родительских растений является тетраплоидным или гексаплоидным растением пшеницы.

В еще одном варианте осуществления стадия ii) включает анализ образца, содержащего ДНК из растения, на полинуклеотид.

В другом варианте осуществления стадия iii) включает:

- i) селекцию растений-потомков, гомозиготных по полинуклеотиду; и/или
- ii) анализ растения или одного или нескольких его растений-потомков на резистентность к *Puccinia graminis*.

В варианте осуществления способ дополнительно включает:

- iv) обратное скрещивание потомства скрещивания стадии i) с растениями того же генотипа в качестве первого родительского растения, в котором отсутствует полинуклеотид, кодирующий полипептид, придающий резистентность к *Puccinia graminis*, достаточное количество раз для получения растения с большей частью генотипа первого родительского растения, но содержащего полинуклеотид; и
- v) селекцию растения-потомка, имеющего резистентность к *Puccinia graminis*.

В еще одном аспекте способ по изобретению дополнительно включает стадию анализа растения по меньшей мере на один другой генетический маркер.

Настоящее изобретение также относится к растению, получаемому способом по изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению полинуклеотида по изобретению или вектора по изобретению для получения рекомбинантной клетки и/или трансгенного растения.

В варианте осуществления трансгенное растение имеет повышенную резистентность к *Puccinia graminis* по сравнению с изогенным растением, в котором отсутствует экзогенный полинуклеотид и/или вектор.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу идентификации растения, содержащего полинуклеотид, кодирующий полипептид, придающий резистентность к *Puccinia graminis*, включающему стадии:

- i) получение образца нуклеиновой кислоты из растения;
- ii) скрининг образца на наличие или отсутствие полинуклеотида, где наличие полинуклеотида свидетельствует о том, что растение является резистентным к *Puccinia graminis*.

В варианте осуществления полинуклеотид кодирует полипептид по изобретению.

В дополнительном варианте осуществления с помощью способа идентифицируют трансгенное растение по изобретению.

В другом варианте осуществления способ дополнительно включает получение растения из семян перед стадией i).

Настоящее изобретение также относится к части растения по изобретению.

В варианте осуществления часть растения представляет собой семена, содержащие экзогенный полинуклеотид, кодирующий полипептид, придающий резистентность к *Puccinia graminis*.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения части растения, включающему:

- a) выращивание растения по изобретению и
- b) сбор части растения.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения муки, цельнозерновых продуктов, крахмала или другого продукта, получаемого из семян, включающему:

- a) получение семян по изобретению и
- b) получение муки, цельнозерновых продуктов, крахмала или другого продукта.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к продукту, получаемому из растения по изобретению и/или части растения по изобретению.

В варианте осуществления часть является семенами.

В варианте осуществления продукт является пищевым продуктом или напитком. Неограничивающие примеры включают:

i) пищевой продукт, выбранный из группы, состоящей из муки, крахмала, дрожжевого или бездрожжевого хлеба, макаронных изделий, лапши, корма для животных, хлопьев для завтрака, закусочных пищевых продуктов, кондитерских изделий, солода, пива, выпечки и пищевых продуктов, содержащих соусы на основе муки; или

ii) напиток, являющийся пивом или солодом.

В альтернативном варианте осуществления продукт является непищевым продуктом. Неограничивающие примеры включают пленки, покрытия, адгезивы, строительные материалы и упаковочные материалы.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения пищевого продукта по изобретению, включающему смешивание семян или муки, цельнозерновых продуктов или крахмала из семян с другим пищевым ингредиентом.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения солода, включающему стадию проращивания семян по изобретению.

Настоящее изобретение также относится к применению растения по изобретению или его части в качестве корма для животных или для получения корма для животных или пищи для потребления человеком.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей один или несколько из полипептида по изобретению, полинуклеотида по изобретению, вектора по изобретению или рекомбинантной клетки по изобретению и один или несколько приемлемых носителей.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу идентификации соединения, связывающегося с полипептидом, содержащим аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или являющуюся ее биологически активным фрагментом, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 82% идентичную SEQ ID NO: 1, включающему:

i) приведение полипептида в контакт с соединением-кандидатом и

ii) определение того, связывается ли соединение с полипептидом.

Любой вариант осуществления, представленный в настоящем описании, должен быть применим, с соответствующими изменениями, к любому другому варианту осуществления, если не указано иначе.

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, представленными в настоящем описании, приведенными исключительно в иллюстративных целях. Функционально эквивалентные продукты, композиции и способы, несомненно, входят в объем изобретения, как представлено в настоящем описании.

Если не указано иначе или если контекст не указывает на иное, на всем протяжении настоящего описания упоминание одной стадии, композиции по изобретению, группы стадий или группы композиций по изобретению должно включать одну и множество (т.е. одну или несколько) из этих стадий, композиций по изобретению, групп стадий или групп композиций по изобретению.

Далее в настоящем описании настоящее изобретение будет описано с помощью следующих неограничивающих примеров и со ссылкой на сопутствующие фигуры.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Выделение клонов ДНК фага лямбда из локуса Sr50. На авторадиограмме представлена гибридизация P<sup>32</sup>-меченого зонда B76 с расщепленными DraI клонами фага лямбда 4, 5, 8, 11, 12 и 18 и геномной ДНК растений пшеницы Gabo1BL.1RS. Очищенная в геле область, используемая для получения библиотеки геномной ДНК фага лямбда, указана на дорожке Gabo1BL.1RS пунктирным прямоугольником, при этом фрагменты, отсутствующие в мутантах с делецией, указаны стрелками.

Фиг. 2. Схема контига ВАС в локусе Sr50. Представлена карта пяти перекрывающихся клонов ВАС, охватывающая делецию (пунктирная линия) в мутанте M2. Концевые последовательности ВАС в области делеции отсутствовали в M2, в то время как концевые последовательности ВАС вне области делеции представлены в M2. Для пяти клонов ВАС представлены положения ScRG1-A относительно членов семейства генов G и прогнозируемого гена ингибитора хитотрипсина (ScCI2). Показано, что ScRG1-A является геном Sr50, как представлено в настоящем описании.

Фиг. 3. Структура гена Sr50. На фигуре представлена схема структуры гена Sr50 (ScRG1-A), включающая 5'- и 3'-UTR, размеры интронов и экзонов (в парах нуклеотидов; п.н.) и положение мутаций в мутантах M7 и M13. Также представлены относительные положения CC, доменов NB и LRR в полипептиде Sr50 и положение праймеров 5pF3 и 5pR2 для амплификации области, включающей инициаторный кодон.

Фиг. 4. Филогенетическая взаимосвязь Sr50 и родственных белков CC-NB-LRR семейства Mla. Дерево по способу ближайшего связывания получали из предсказанных аминокислотных последовательностей генов ScRG1 из *S. cereale*, известных функциональных членов семейства MLA ячменя (*HvMLA*),

TmMLA T. monococcum, Sr33, Sr35 и полипептидов резистентности к листовой ржавчине Lr1, Lr10 и Lr21.

#### Список последовательностей

SEQ ID NO: 1 - Аминокислотная последовательность полипептида резистентности к стеблевой ржавчине (Sr50).

SEQ ID NO: 2 - Аминокислотная последовательность варианта Sr50 из Svalofs Otello и Frontier.

SEQ ID NO: 3 - Аминокислотная последовательность варианта Sr50 из Dwarf Petkus.

SEQ ID NO: 4 - Консенсусный мотив р-петли.

SEQ ID NO: 5 - Мотив р-петли полипептида, представленного как SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 6 - Консенсусный мотив киназы 3а.

SEQ ID NO: 7 - Мотив киназы 3а полипептида, представленного как SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 8 - Консенсусный повтор домена LRR.

SEQ ID NO: 9 - Нуклеотидная последовательность кДНК, кодирующей полипептид резистентности к стеблевой ржавчине (Sr50).

SEQ ID NO: 10 - Нуклеотидная последовательность открытой рамки считывания, кодирующей полипептид резистентности к стеблевой ржавчине (Sr50).

SEQ ID NO: 11 - Нуклеотидная последовательность экспрессирующей конструкции pVecNeoSr50.

SEQ ID NO: 12 - Нуклеотидная последовательность экспрессирующей конструкции pVecBarSr50.

SEQ ID NO: 13 - Аминокислотная последовательность полипептида резистентности к стеблевой ржавчине (из гаплотипа I) (Sr33).

SEQ ID NO: 14 - Аминокислотная последовательность аллельного варианта полипептида резистентности к стеблевой ржавчине, представленного как SEQ ID NO: 13 (из гаплотипа II) (Sr33).

SEQ ID NO: 15 - Функциональный сигнал ядерного экспорта NES из ВИЧ Rev.

SEQ ID NO: 16 - Нефункциональный pes.

SEQ ID NO: 17-59 - Олигонуклеотидные праймеры.

#### Подробное описание изобретения

Общие способы и определения.

Если конкретно не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, должны обладать значением, общепринято понимаемым специалистом в этой области (например, в культивировании клеток, молекулярной генетике, молекулярной биологии растений, белковой химии и биохимии).

Если не указано иначе, способы с использованием рекомбинантных белков, способы культивирования клеток и иммунологические способы, используемые в настоящем изобретении, являются стандартными способами, хорошо известными специалистам в этой области. Такие способы описаны в литературе в таких источниках, как J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (издатель), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (издатели), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 и 1996.), и F.M. Ausubel et al. (издатели), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, включая все обновления до настоящего времени), Ed. Harlow and David Lane (издатели) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), и J.E. Coligan et al. (издатели) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (включая все обновления до настоящего времени).

Следует понимать, что термин "и/или", например "X и/или Y", означает "X и Y" или "X или Y" и должен являться основой для обоих значений или для любого значения.

В рамках изобретения термин "приблизительно", если не указано иное, относится к  $\pm 10\%$ , более предпочтительно  $\pm 5\%$ , более предпочтительно  $\pm 1\%$ , более предпочтительно  $\pm 0,5\%$  от указанного значения.

На всем протяжении настоящего описания под термином "содержат" или его вариантами, такими как "содержит" или "содержащий", будут подразумевать включение указанного элемента, целого числа или стадии или группы элементов, целых чисел или стадий, но не исключение любого другого элемента, целого числа или стадии или группы элементов, целых чисел или стадий.

Стеблевая ржавчина.

В рамках изобретения термин "стеблевая ржавчина" относится к заболеванию растений, вызываемому *Puccinia graminis*. или грибковому патогену-возбудителю *Puccinia graminis* в зависимости от контекста. В рамках изобретения термин "стеблевая ржавчина пшеницы" относится к заболеванию растений, вызываемому *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, или грибковому патогену-возбудителю *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* в зависимости от контекста.

Группа рас Ug99 стеблевая ржавчина пшеницы (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) (также известная как "ТТКСК" по североамериканской системе номенклатуры) представляет собой хорошо известный грибковый патоген пшеницы, часто встречающийся на пшеничных полях в таких регионах, как Африка и

Ближний Восток (Singh et al., 2011; Hodson et al., 2012). Ug99 может вызывать значительные потери сельскохозяйственных культур и вирулентен даже при наличии генов резистентности, которые ранее защищали пшеницу от стеблевой ржавчины. В настоящее время известно восемь вариантов группы Ug99, являющихся близкородственными с учетом анализа ДНК-маркеров. Каждый вариант патогена, отличающийся своим профилем вирулентности/авирулентности в отношении панели растений пшеницы, каждое из которых содержит отличающийся ген резистентности R, известен как "раса" патогена. В группу изолятов Ug99 входят близкородственные варианты, и считают, что они эволюционировали из общего предка, но могут отличаться своими профилями вирулентности/авирулентности, в случае чего их могут считать разными расами. Семь из этих восьми вариантов приведены в табл. 2 в Singh et al. (2011). В варианте осуществления группа рас стеблевой ржавчины Ug99 проявляет вирулентность в отношении растений пшеницы, содержащих один или несколько из генов резистентности Sr31, Sr21, Sr24 и Sr36 (Singh et al., 2011). В одном из вариантов осуществления группа рас стеблевой ржавчины Ug99 *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* имеет вирулентность, по меньшей мере, в отношении растений пшеницы, содержащих ген резистентности Sr31 (Pretorius et al., 2000).

#### Полипептиды/пептиды.

Настоящее изобретение относится к полипептидам, придающим резистентность растению, например растению пшеницы, к стеблевой ржавчине, предпочтительно стеблевой ржавчине пшеницы, такой как группа рас Ug99. В предпочтительном варианте осуществления полипептид кодируется аллелем или вариантом гена Sr50, придающим резистентность к стеблевой ржавчине пшеницы. Неограничивающие примеры таких полипептидов включают полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1. Полипептид по изобретению придает повышенную резистентность к стеблевой ржавчине, предпочтительно стеблевой ржавчине пшеницы, такой как группа рас Ug99 *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* по сравнению с изогенным растением, в котором отсутствует ген, кодирующий полипептид. Этот термин также относится к продуцирующемуся в природе белку (или белку дикого типа, из которого получают мутантный белок), кодируемому геном, придающим растению (например, пшенице) повышенную резистентность к стеблевой ржавчине, такой как группа рас Ug99 *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, при выращивании в нормальных полевых условиях. В предпочтительном варианте осуществления полипептид по изобретению придает резистентность конкретно к стеблевой ржавчине, предпочтительно конкретно к стеблевой ржавчине пшеницы, более предпочтительно он не придает резистентность к листовой ржавчине пшеницы, вызываемой грибковым патогеном *Puccinia triticina*, и/или настоящей мучнистой росе. В этом контексте термины "конкретно к стеблевой ржавчине" и "конкретно к стеблевой ржавчине пшеницы" означают, что придаваемая резистентность является предпочтительно резистентностью к стеблевой ржавчине или стеблевой ржавчине пшеницы по сравнению с другим грибковым патогеном того же вида растений, предпочтительно ко многим или большинству других грибковых патогенов того же вида. В более предпочтительном варианте осуществления полипептид по изобретению придает резистентность к стеблевой ржавчине и по меньшей мере двум или всем трем из листовой ржавчины, желтой ржавчины злаков и настоящей мучнистой росы, предпочтительно у пшеницы. В варианте осуществления полипептиды по изобретению не кодируются геном Sr35 растения пшеницы. В варианте осуществления, полипептиды по изобретению не кодируются геном Sr35 растения пшеницы или его гомологами, такими как гомологи, по меньшей мере на 50% идентичные по аминокислотной последовательности по отношению к полипептиду Sr35. В другом варианте осуществления полипептиды по изобретению не кодируются геном Sr33 растения пшеницы. В варианте осуществления полипептиды по изобретению не кодируются геном Sr33 растения пшеницы или его гомологами, такими как гомологи, по меньшей мере на 87% идентичные по аминокислотной последовательности по отношению к полипептиду Sr33, как описано в WO 2014/000594 (SEQ ID NO: 13 и 14 в настоящем описании). Таким образом, в варианте осуществления полипептид по изобретению не содержит аминокислоты, имеющие последовательность, по меньшей мере на 87% идентичную по аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 13 и/или SEQ ID NO: 14. В дополнительном варианте осуществления полипептид по изобретению имеет аминокислотную последовательность, более родственную SEQ ID NO: 1 (имеющую больший уровень % идентичности), чем SEQ ID NO: 13 и/или 14.

В дополнительном варианте осуществления в случае экспрессии в трансгенном растении, инфицированном стеблевой ржавчиной, такой как раса Ug99 *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, клетки растения демонстрируют незначительные, если вообще какие-то, признаки гибели клеток (аутофлуоресценцию), например, по сравнению с экспрессией Sr45 в изогенном растении.

Полипептиды по изобретению, как правило, содержат биспиральный (CC) домен в направлении к N-концу с последующим нуклеотид-связывающим (NB) доменом и доменом богатых лейцином повторов (LRR) в направлении к C-концу (см. фиг. 3). Каждый из этих трех типов доменов распространен в полипептидах, придающих резистентность к патогенам растений. Кроме того, CC-NB-LRR-содержащие полипептиды представляют собой известный большой класс полипептидов, которые как класс придают резистентность к широкому спектру различных патогенов растений (см., например, Bulgarelli et al., 2010; McHale et al., 2006; Takken et al., 2006; Wang et al., 2011; Gennaro et al., 2009 и Dilbirli et al., 2003), хотя каждый из полипептидов CC-NB-LRR специфичен к конкретному виду или подвиду патогенов. Таким

образом, благодаря выравниванию полипептидов по изобретению с другими полипептидами CC-NB-LRR в комбинации с большим количеством исследований этих типов белков, а также доменов CC, доменов NB и доменов LRR, специалист в этой области имеет значительное количество рекомендаций для конструирования функциональных вариантов конкретных полипептидов, представленных в настоящем описании.

Биспиральный домен или мотив является структурным мотивом, являющимся одной из наиболее распространенных третичных структур белков, в которой  $\alpha$ -спирали заспирализованы вместе подобно нитям веревки. Разработаны компьютерные программы для детекции гептад и образующихся биспиральных структур (см., например, Delorenzi and Speed, 2002). Биспирали, как правило, содержат повторяющийся паттерн, hxxhxcxc, из гидрофобных (h) и заряженных (c) аминокислотных остатков, обозначаемых как гептадные повторы. Положения в гептадном повторе, как правило, помечают как abcdefg, где a и d являются гидрофобными положениями, зачастую занятыми изолейцином, аланином, лейцином или валином. Фолдинг белка с этими гептадами в  $\alpha$ -спиральную вторичную структуру заставляет гидрофобные остатки располагаться в виде "ленты", мягко спирализующейся вокруг спирали против часовой стрелки, образуя амфипатическую структуру.

Домен NB присутствует в генах резистентности, а также нескольких киназах, таких как АТФ/ГТФ-связывающие белки. Этот домен, как правило, содержит три мотива: киназа-1a (p-петля), киназа-2 и предполагаемая киназа-3a (Traut 1994; Tameling et al., 2002). Консенсусная последовательность GxxGxGK(T/S)T (SEQ ID NO: 4) (GFGGLGKTT (SEQ ID NO: 5) в полипептиде, придающем резистентность к *Puccinia graminis*, представленная как SEQ ID NO: 1), и GxxxxxTxR (SEQ ID NO: 6) (GSRLITTTT (SEQ ID NO: 7) в полипептиде, придающем резистентность к *Puccinia graminis*, представленная как SEQ ID NO: 1) в случае мотивов p-петли, киназы-2 и предполагаемой киназы-3a в гене резистентности соответственно отличаются от мотивов, присутствующих в других NB-кодирующих белках. Другими мотивами, присутствующими в домене NB генов резистентности типа NB/LRR, являются GLPL, RNBS-D и MHD (Meyers et al., 1999). Последовательности, перемежающиеся с этими мотивами и доменами, могут значительно отличаться даже среди гомологов гена резистентности (Michelmore and Meyers, 1998; Pan et al., 2000).

Богатый лейцином домен является белковым структурным мотивом, образующим  $\alpha$ -/ $\beta$ -подковообразную складку (Enkhbayar et al., 2004). Домен LRR содержит 9-41 несовершенный повтор, каждый из которых составляет приблизительно 25 аминокислот в длину с консенсусной аминокислотной последовательностью xLxLxxxx (SEQ ID NO: 8) (Cooley et al., 2000). В варианте осуществления полипептид по изобретению содержит от приблизительно 10 до приблизительно 20, более предпочтительно от приблизительно 12 до приблизительно 18, более предпочтительно приблизительно 15 богатых лейцином повторов. Эти повторы, как правило, сворачиваются вместе с образованием соленоидного белкового домена. Как правило, каждая единица повтора имеет структуру бета-цепь-повтор-альфа-спираль, и собранный домен, состоящий из множества таких повторов, имеет подковообразную форму с внутренним параллельным бета-слоем и внешний набор спиралей.

В варианте осуществления полипептид содержит одну, две, три, четыре или более аминокислоты, присутствующие в аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO: 1, но не обнаруживаемые в соответствующих положениях аминокислот в полипептиде, содержащем аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14.

В варианте осуществления полипептид не содержит аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, ее биологически активный фрагмент или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 87% идентичную одной или обеим из SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14. В варианте осуществления полипептид не содержит аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14.

В варианте осуществления полипептид является полипептидом из *S. cereale*.

В рамках изобретения "резистентность" является относительным термином в том смысле, что наличие полипептида по изобретению (i) снижает симптомы заболевания растения, содержащего ген (ген R), придающий резистентность, относительно растения, в котором отсутствует ген R, и/или (ii) снижает воспроизведение или распространение патогена в растении, содержащем ген R. В рамках изобретения термин "резистентность" относится к ответу "восприимчивого" растения на тот же патоген. Как правило, наличие гена R улучшает по меньшей мере один продуктивный признак растения, содержащего ген R, при инфицировании патогеном, такой как урожай зерна, по сравнению с изогенным растением, инфицированным патогеном, но в котором отсутствует ген R. Изогенное растение может иметь некоторый уровень резистентности к патогену или его можно классифицировать как восприимчивое. Таким образом, термины "резистентность" и "повышенная резистентность" в настоящем описании, как правило, используют взаимозаменяемо. Кроме того, полипептид по изобретению может не придавать полную резистентность к патогену, например, если некоторые симптомы все равно возникают или имеет место некоторое воспроизведение патогена при инфекции, но в сниженном количестве. Повышенную резистентность можно определять рядом известных в этой области способов, таких как анализ растений на количество

патогена и/или анализ роста растения, или степени повреждения, или симптомов заболевания у растения в присутствии патогена и сравнение одного или нескольких из этих параметров с изогенным растением, в котором отсутствует экзогенный ген, кодирующий полипептид по изобретению.

Термины "в значительной степени очищенный полипептид" или "очищенный полипептид" означают полипептид, как правило, отделенный от липидов, нуклеиновых кислот, других пептидов и других контаминирующих молекул, с которыми он ассоциирован в нативном состоянии. Предпочтительно в значительной степени очищенный полипептид по меньшей мере на 90% не содержит другие компоненты, с которыми он ассоциирован в природе.

Трансгенные растения и клетки-хозяева по изобретению могут содержать экзогенный полинуклеотид, кодирующий полипептид по изобретению. В этих случаях растения и клетки продуцируют рекомбинантный полипептид. Термин "рекомбинантный" в отношении полипептида относится к полипептиду, кодируемому экзогенным полинуклеотидом при продукции клеткой, где полинуклеотид встраивали в клетку или клетку-предшественника способами рекомбинантной ДНК или РНК, такими как, например, трансформация. Как правило, клетка содержит неэндогенный ген, вызывающий продукцию измененного количества полипептида. В варианте осуществления "рекомбинантный полипептид" является полипептидом, образующимся при экспрессии экзогенного (рекомбинантного) полинуклеотида в растительной клетке.

Термины "полипептид" и "белок", как правило, используют взаимозаменяемо.

% идентичности полипептида определяют с помощью анализа GAP (Needleman and Wunsch, 1970) (программа GCG) со штрафом за пропуск = 5 и штрафом за увеличение пропуска = 0,3.

Последовательность запроса составляет по меньшей мере 150 аминокислот в длину, и с помощью анализа GAP выравнивают две последовательности в области по меньшей мере из 150 аминокислот. Более предпочтительно последовательность запроса составляет по меньшей мере 500 аминокислот в длину, и с помощью анализа GAP выравнивают две последовательности в области по меньшей мере из 500 аминокислот. Более предпочтительно последовательность запроса составляет по меньшей мере 750 аминокислот в длину, и с помощью анализа GAP выравнивают две последовательности в области по меньшей мере из 750 аминокислот. Даже более предпочтительно последовательность запроса составляет по меньшей мере 900 аминокислот в длину, и с помощью анализа GAP выравнивают две последовательности в области по меньшей мере из 900 аминокислот. Даже более предпочтительно с помощью анализа GAP выравнивают две последовательности по всей их длине.

В рамках изобретения "биологически активный" фрагмент является частью полипептида по изобретению, сохраняющей определенную активность полноразмерного полипептида, например, при экспрессии в растении, таком как пшеница, придающей (повышающей) резистентность к стеблевой ржавчине, предпочтительно стеблевой ржавчине пшеницы, такой как группа рас Ug99 *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, по сравнению с изогенным растением, не экспрессирующим полипептид. Биологически активные фрагменты могут иметь любой размер при условии, что они сохраняют определенную активность, но предпочтительно они составляют по меньшей мере 750 или по меньшей мере 900 аминокислотных остатков в длину. Предпочтительно биологически активный фрагмент сохраняет по меньшей мере 10%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 90% активности полноразмерного белка.

Что касается определенного полипептида, следует понимать, что значения % идентичности, превышающие представленные выше, будут включать предпочтительные варианты осуществления. Таким образом, когда это применимо, в контексте минимальных значений % идентичности, предпочтительно, чтобы полипептид содержал аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60%, более предпочтительно по меньшей мере на 65%, более предпочтительно по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 76%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,1%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,2%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,3%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,4%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,5%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,6%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,7%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,8% и даже более предпочтительно по меньшей мере на 99,9% идентичную соответствующей SEQ ID NO.

Мутантные полипептиды по аминокислотной последовательности по настоящему изобретению можно получать посредством включения подходящих изменений нуклеотидов в нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению или синтеза желаемого полипептида *in vitro*. Такие мутанты включают, например, делеции, инсерции или замены остатков в аминокислотной последовательности.

Комбинирование делеции, инсерции и замены можно осуществлять для получения конечной конструкции при условии, что конечный пептидный продукт обладает желаемыми характеристиками. Пред-

почтительные мутанты аминокислотной последовательности имеют только одно, два, три, четыре или менее 10 изменений аминокислот относительно референсного полипептида дикого типа.

Мутантные (измененные) полипептиды можно получать любым способом, известным в этой области, например, с использованием направленной эволюции или стратегий рационального дизайна (см. ниже). Продукты, полученные из мутантной/измененной ДНК, легко можно подвергать скринингу способами, представленными в настоящем описании, для определения того, придают ли они резистентность к *Ruscinia graminis* (например, расе из группы Ug99 *Ruscinia graminis* f sp. *tritici*), например, посредством получения трансгенного растения, экспрессирующего мутантную/измененную ДНК, и определения способности растения давать зерно в присутствии патогена.

При дизайне мутантов по аминокислотной последовательности локализация участка мутации и природа мутации будут зависеть от характеристик, подлежащих модификации. Участки для мутации можно модифицировать по отдельности или серией, например, посредством (1) сначала замены консервативными аминокислотами по выбору, а затем с использованием более радикальной селекции в зависимости от достигаемых результатов, (2) делеции остатка-мишени или (3) инсерции других остатков, смежных с участком локализации.

Делеции в аминокислотной последовательности, как правило, имеют диапазон приблизительно от 1 до 15 остатков, более предпочтительно приблизительно от 1 до 10 остатков и, как правило, приблизительно от 1 до 5 смежных остатков.

Мутанты с заменой имеют по меньшей мере один делетированный аминокислотный остаток в молекуле полипептида и другой остаток, встроенный на его место. Для сохранения активности интересующие участки включают участки, располагающиеся не в активном центре, такие как домен CC, BD или LRR, и участки, не являющиеся высококонсервативными между разными видами. Эти участки, в частности, находящиеся в последовательности по меньшей мере из трех других неконсервативных участков, как правило, можно заменять относительно консервативным или неконсервативным образом. Примеры консервативных замен представлены в табл. 1.

Таблица 1

| Примеры замен    |                         |
|------------------|-------------------------|
| Исходный остаток | Примеры замен           |
| Ala (A)          | val; leu; ile; gly      |
| Arg (R)          | lys                     |
| Asn (N)          | gln; his                |
| Asp (D)          | glu                     |
| Cys (C)          | ser                     |
| Gln (Q)          | asn; his                |
| Glu (E)          | asp                     |
| Gly (G)          | pro, ala                |
| His (H)          | asn; gln                |
| Ile (I)          | leu; val; ala           |
| Leu (L)          | ile; val; met; ala; phe |
| Lys (K)          | arg                     |
| Met (M)          | leu; phe                |
| Phe (F)          | leu; val; ala           |
| Pro (P)          | gly                     |
| Ser (S)          | thr                     |
| Thr (T)          | ser                     |
| Trp (W)          | tyr                     |
| Tyr (Y)          | trp; phe                |
| Val (V)          | ile; leu; met; phe, ala |

В предпочтительном варианте осуществления мутантный полипептид/вариант полипептида имеет одну, или две, или три, или четыре консервативные замены аминокислот по сравнению с природным полипептидом. Подробности консервативных замен аминокислот представлены в табл. 1. В предпочтительном варианте осуществления изменения не находятся в одном или нескольких мотивах, являющихся высококонсервативными между разными полипептидами, представленными в настоящем описании. Как известно специалисту в этой области, можно обосновано прогнозировать, что такие небольшие изменения не будут изменять активность полипептида при экспрессии в рекомбинантной клетке.

В варианте осуществления белок по изобретению является геном CC-NB-LRR резистентности к патогену растений, содержащим домены, сконфигурированные, как представлено на фиг. 3.

Первичную аминокислотную последовательность полипептида по изобретению можно использовать для дизайна его вариантов/мутантов на основе сравнения с близкородственными полипептидами резистентности, содержащими домены NB и LRR, более предпочтительно - домены CC, NB и LRR. Как будет понятно специалисту в этой области, остатки, высококонсервативные среди близкородственных белков CC-NB-LRR, менее вероятно можно изменять, особенно посредством неконсервативных замен, и их активность сохранялась лучше, чем в случае менее консервативных остатков (см. выше).

В объем изобретения также входят полипептиды по настоящему изобретению, дифференциально модифицированные во время или после синтеза, например, посредством биотинилирования, бензилирования, гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления, связывания с молекулой антитела или другого клеточного лиганда и т.д. Полипептиды можно посттрансляционно модифицировать в клетке, например, посредством фосфорилирования, с помощью которого можно модулировать их активность. Эти модификации можно использовать для повышения стабильности и/или биологической активности полипептида по изобретению.

Направленная эволюция.

При направленной эволюции белок подвергают случайному мутагенезу и используют режим селекции для выбора вариантов, имеющих желаемые качества, например повышенную активность. Затем осуществляют дополнительные раунды мутаций и селекции. Типичная стратегия направленной эволюции включает три стадии.

1) Диверсификация: Ген, кодирующий интересующий белок, подвергают мутагенезу и/или рекомбинации случайным образом для получения большой библиотеки вариантов гена. Библиотеки вариантов гена можно конструировать с помощью подверженной ошибкам ПЦР (см., например, Leung, 1989; Cadwell and Joyce, 1992), с использованием совокупностей расщепленных ДНКазой I фрагментов, полученных из родительских матриц (Stemmer, 1994a; Stemmer, 1994b; Cramer et al., 1998; Coco et al., 2001) из вырожденных олигонуклеотидов (Ness et al., 2002, Coco, 2002) или из смесей того и другого или даже из нерасщепленных родительских матриц (Zhao et al., 1998; Eggert et al., 2005; Jézéque et al., 2008) и, как правило, их собирают посредством ПЦР. Библиотеки также можно получать из родительских последовательностей, рекомбинированных *in vivo* или *in vitro* посредством гомологичной или негомологичной рекомбинации (Ostermeier et al., 1999; Volkov et al., 1999; Sieber et al., 2001). Библиотеки вариантов гена также можно конструировать посредством субклонирования интересующего гена в подходящий вектор, трансформации вектора в "мутаторный" штамм, такой как *E. coli* XL-1 red (Stratagene), и выращивания трансформированных бактерий в течение подходящего количества поколений. Библиотеки вариантов гена также можно конструировать посредством подвергания интересующего гена перестановке ДНК (т.е. гомологичной рекомбинации *in vitro* совокупностей выбранных мутантных генов посредством случайной фрагментации и повторной сборки), как подробно описано Nagayama (1998).

2) Селекция: Библиотеку тестируют на наличие мутантов (вариантов), обладающих желаемым свойством, с использованием скрининга или селекции. Скрининги делают возможной идентификацию и выделение мутантов с высокими показателями вручную, в то время как посредством селекции автоматически удаляют все нефункциональные мутанты. Скрининг может включать скрининг на наличие известных консервативных аминокислотных мотивов.

Альтернативно или дополнительно, скрининг может включать экспрессию мутантного полинуклеотида в организме-хозяине или его части и анализ уровня активности.

3) Амплификация: Варианты, идентифицированные при селекции или скрининге, многократно реплицируют, что позволяет исследователям секвенировать их ДНК для понимания того, какие мутации возникли.

В целом, эти три стадии обозначают как "раунд" направленной эволюции. Большинство экспериментов будут включать несколько раундов. В этих экспериментах "победителей" предыдущего раунда подвергают диверсификации в следующем раунде для получения новой библиотеки. В конце эксперимента всех подвергнутых эволюции белковых или полинуклеотидных мутантов охарактеризовывают с использованием биохимических способов.

Рациональный дизайн.

Белок можно подвергать рациональному дизайну на основе известной информации о структуре и фолдинге белка. Это можно осуществлять посредством дизайна "с нуля" (дизайна *de novo*) или посредством реконструкции с учетом нативных каркасов (см., например, Hellinga, 1997; и Lu and Berry, Protein Structure Design and Engineering, Handbook of 2 Proteins 1153-1157 (2007)). Дизайн белка, как правило, включает идентификацию последовательностей, сворачивающихся в указанную или целевую структуру, и его можно осуществлять с использованием компьютерных моделей. С помощью компьютерных алгоритмов для дизайна белка осуществляют поиск пространства последовательностей-конформаций в случае последовательностей, имеющих низкую энергию при фолдинге в целевую структуру. В компьютерных алгоритмах для дизайна белка используют модели энергетики белков для оценки того, как мутации повлияют на структуру и функции белка. Эти энергетические функции, как правило, включают комбинацию молекулярной механики, статистических (т.е. с использованием искусственного интеллекта) и дру-

гих эмпирических терминов. Подходящее доступное программное обеспечение включает IPRO (Iterative Protein Redesign and Optimization), EGAD (A Genetic Algorithm for Protein Design), Rosetta Design, Sharpen и Abalone.

Полинуклеотиды и гены.

Настоящее изобретение относится к различным полинуклеотидам. В рамках изобретения термины "полинуклеотид", или "нуклеиновая кислота", или "молекула нуклеиновой кислоты" означают полимер из нуклеотидов, который может являться ДНК или РНК или их комбинацией, и включают геномную ДНК, мРНК, сRNA и кДНК. Менее предпочтительные полинуклеотиды включают тРНК, миРНК, shRNA и hpRNA. Они могут являться ДНК или РНК клеточного, геномного или синтетического происхождения, например, полученными с помощью автоматизированного синтезатора, и их можно комбинировать с углеводом, липидами, белком или другими материалами, метить флуоресцентными или другими группами или прикреплять к твердой подложке для осуществления конкретной активности, определенной в настоящем описании, или они содержат один или несколько модифицированных нуклеотидов, не обнаруживаемых в природе, хорошо известных специалистам в этой области. Полимер может являться одноцепочечным, в частности двухцепочечным или частично двухцепочечным. В рамках изобретения термин "спаривание оснований" относится к стандартному спариванию оснований между нуклеотидами, включая пары оснований G:U. Термин "комплементарный" означает, что два полинуклеотида способны образовывать пары (гибридизоваться) вдоль части их длин или вдоль всей длины одного или обоих из них. Термин "гибридизовавшийся полинуклеотид" означает, что полинуклеотид фактически образует пары оснований со своим комплементом. Термин "полинуклеотид" в настоящем описании используют взаимозаменяемо с термином "нуклеиновая кислота". Предпочтительные полинуклеотиды по изобретению кодируют полипептид по изобретению.

Термин "выделенный полинуклеотид" означает полинуклеотид, как правило, отделенный от полинуклеотидных последовательностей, с которыми он ассоциирован или связан в своем нативном состоянии, если полинуклеотид обнаруживают в природе. Предпочтительно выделенный полинуклеотид по меньшей мере на 90% не содержит другие компоненты, с которыми он ассоциирован в природе, если его обнаруживают в природе. Предпочтительно полинуклеотид не является природным, например, его получают посредством ковалентного соединения двух более коротких полинуклеотидных последовательностей способом, не обнаруживаемым в природе (химерный полинуклеотид).

Настоящее изобретение включает модификацию активности генов и конструирование и применение химерных генов. В рамках изобретения термин "ген" включает любую дезоксирибонуклеотидную последовательность, включающую кодирующую белок область или транскрибируемую в клетке, но не транслируемую, а также ассоциированные некодирующие и регуляторные области. Такие ассоциированные области, как правило, локализуются смежно с кодирующей областью или транскрибирующейся областью на 5'- и 3'-концах на расстоянии приблизительно 2 т.п.н. на любой стороне. В связи с этим ген может включать контрольные сигналы, такие как промоторы, энхансеры, сигналы терминирования и/или сигналы полиаденилирования, в природе ассоциированные с указанным геном, или гетерологичные контрольные сигналы, в случае чего ген обозначают как "химерный ген". Последовательности, локализуемые в 5'-направлении от кодирующей области и присутствующие в мРНК, обозначают как 5'-нетранслируемые последовательности. Последовательности, локализуемые в 3'-направлении или ниже кодирующей области и присутствующие в мРНК, обозначают как 3'-нетранслируемые последовательности. Термин "ген" включает кДНК и геномные формы гена.

В рамках изобретения термин "ген Sr50" относится к нуклеотидной последовательности, гомологичной выделенному гену Sr50 или кДНК Sr50 (SEQ ID NO: 9), представленному в настоящем описании. Как представлено в настоящем описании, некоторые аллели и варианты генов семейства Sr50 кодируют белок, придающий резистентность к стеблевой ржавчине (например, вызываемой группой рас Ug99 *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*). Гены Sr50 включают природные аллели или варианты, существующие в злаках, таких как пшеница. Молекулы нуклеиновой кислоты, имеющие нуклеотидную последовательность, представленную в настоящем описании как SEQ ID NO: 9 (кДНК) или SEQ ID NO: 10 (открытая рамка считывания), кодирующую белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, являются примерами гена Sr50, придающего резистентность к стеблевой ржавчине.

Геномная форма или клон гена, содержащий транскрибируемую область, может перемежаться некодирующими последовательностями, названными "интронами", или "вставочными областями", или "вставочными последовательностями", которые могут являться гомологичными или гетерологичными в отношении "экзонов" гена. В рамках изобретения термин "интрон" означает сегмент гена, транскрибируемый как часть первичного транскрипта РНК, но не присутствующую в зрелой молекуле мРНК. Интроны удаляются или "сплайсируются" из ядерного или первичного транскрипта; таким образом, интроны отсутствуют в матричной РНК (мРНК). Интроны могут содержать регуляторные элементы, такие как энхансеры. В рамках изобретения термин "экзоны" относится к областям ДНК, соответствующим последовательностям РНК, присутствующим в зрелой мРНК или зрелой молекуле РНК в случаях, когда молекула РНК не транслируется. Во время трансляции мРНК функционирует, определяя последовательность или порядок аминокислот в возникающем полипептиде. Термин "ген" включает синтетическую или сли-

тую молекулу, кодирующую все или часть белков по изобретению, представленных в настоящем описании, и нуклеотидную последовательность, комплементарную любой из указанных выше последовательностей. Ген можно встраивать в подходящий вектор для экстрахромосомного поддержания в клетке или предпочтительно для встраивания в геном хозяина.

В рамках изобретения термин "химерный ген" относится к любому гену, содержащему ковалентно соединенные последовательности, не обнаруживаемые в природе в соединенном состоянии. Как правило, химерный ген содержит регуляторные и транскрибируемые или кодирующие белок последовательности, не обнаруживаемые совместно в природе. Таким образом, химерный ген может содержать регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, полученные из разных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, полученные из одного источника, но расположенные в порядке, не обнаруживаемом в природе. Термин "эндогенный" используют в настоящем описании для обозначения вещества, как правило, присутствующего или продуцируемого в немодифицированном растении на той же стадии развития, что и исследуемое растение. Термин "эндогенный ген" относится к нативному гену в своей природной локализации в геноме организма. В рамках изобретения термины "рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты", "рекомбинантный полинуклеотид" или их варианты относятся к молекуле нуклеиновой кислоты, сконструированной или модифицированной посредством технологии рекомбинантных ДНК. Термины "чужеродный полинуклеотид", или "экзогенный полинуклеотид", или "гетерологичный полинуклеотид" и т.п. относятся к любой нуклеиновой кислоте, встраиваемой в геном клетки посредством экспериментальных манипуляций.

Чужеродные или экзогенные гены могут являться генами, встраиваемыми в ненативный организм, нативными генами, встраиваемыми в другой локализации в нативного хозяина, или химерными генами. "Трансген" является геном, встраиваемым в геном посредством трансформации. Термин "генетически модифицированный" включает встраивание генов в клетки посредством трансформации или трансдукции, мутагенез генов в клетках и изменение или модуляцию регуляции гена в клетке или организмах, по отношению к которым осуществляют эти манипуляции, или их потомстве.

Кроме того, термин "экзогенный" в отношении полинуклеотида (нуклеиновой кислоты) относится к полинуклеотиду, когда он присутствует в клетке, которая в природе не содержит полинуклеотид. Клетка может являться клеткой, содержащей неэндогенный полинуклеотид, приводящий к измененной степени продукции кодируемого полипептида, например экзогенный полинуклеотид, повышающий экспрессию эндогенного полипептида, или клеткой, которая в своем нативном состоянии не продуцирует полипептид. Повышенная продукция полипептида по изобретению также обозначена в настоящем описании как "гиперэкспрессия". Экзогенный полинуклеотид по изобретению включает полинуклеотиды, не отделенные от других компонентов трансгенной (рекомбинантной) клетки или бесклеточной системы экспрессии, в которой они присутствуют, и полинуклеотиды, продуцируемые в таких клетках или бесклеточных системах, впоследствии очищенных, по меньшей мере, от некоторых других компонентов. Экзогенный полинуклеотид (нуклеиновая кислота) может являться участком смежных нуклеотидов, существующим в природе, или содержать два или более участка смежных нуклеотидов из разных источников (природных и/или синтетических), соединенных с образованием одного полинуклеотида. Как правило, такие химерные полинуклеотиды содержат, по меньшей мере, открытую рамку считывания, кодирующую полипептид по изобретению, функционально связанный с промотором, подходящим для регуляции транскрипции открытой рамки считывания в интересующей клетке.

В варианте осуществления полинуклеотид является неприродным полинуклеотидом, таким как полинуклеотид, содержащий нуклеотиды, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. Например, в варианте осуществления полинуклеотид является кодон-оптимизированным полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или являющуюся ее биологически активным фрагментом, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 82% идентичную, по меньшей мере 90% идентичную или по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, для экспрессии в ином растении, чем рожь (таком как пшеница).

В варианте осуществления, при наличии в растении ржи или его части (такой как зерна ржи) или клетке, полинуклеотид не находится на хромосоме 1RS.

% идентичности полинуклеотида определяют посредством анализа GAP (Needleman and Wunsch, 1970) (программа GCG) со штрафом за пропуск = 5 и штрафом за увеличение пропуска = 0,3. Последовательность запроса составляет по меньшей мере 450 нуклеотидов в длину, и с помощью анализа GAP выравнивают две последовательности в области по меньшей мере из 450 нуклеотидов. Предпочтительно последовательность запроса составляет по меньшей мере 1500 нуклеотидов в длину, и с помощью анализа GAP выравнивают две последовательности в области по меньшей мере 1500 нуклеотидов. Даже более предпочтительно последовательность запроса составляет по меньшей мере 2700 нуклеотидов в длину, и с помощью анализа GAP выравнивают две последовательности в области по меньшей мере из 2700 нуклеотидов. Даже более предпочтительно с помощью анализа GAP выравнивают две последовательности по всей их длине.

Что касается определенных полинуклеотидов, следует понимать значения % идентичности, превы-

шающие представленные выше, будут включать предпочтительные варианты осуществления. Таким образом, когда это применимо, в контексте минимальных значений % идентичности, предпочтительно, чтобы полинуклеотид содержал полинуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 60%, более предпочтительно по меньшей мере на 65%, более предпочтительно по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,1%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,2%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,3%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,4%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,5%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,6%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,7%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,8% и даже более предпочтительно по меньшей мере на 99,9% идентичную соответствующей SEQ ID NO.

В дополнительном осуществлении настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, по существу, идентичным полинуклеотидам, конкретно представленным в настоящем описании. В рамках изобретения со ссылкой на полинуклеотид термин "по существу, идентичный" означает замену одного или нескольких (например, 2, 3 или 4) нуклеотидов при сохранении по меньшей мере одной активности нативного белка, кодируемого полинуклеотидом. Кроме того, этот термин включает добавление или делецию нуклеотидов, приводящую к увеличению или уменьшению размера кодируемого нативного белка на одну или несколько (например, 2, 3 или 4) аминокислот при сохранении по меньшей мере одной активности нативного белка, кодируемого полинуклеотидом.

Настоящее изобретение также относится к применению олигонуклеотидов, например, в способах скрининга на полинуклеотид по изобретению или полинуклеотид, кодирующий полипептид по изобретению. В рамках изобретения "олигонуклеотиды" являются полинуклеотидами до 50 нуклеотидов в длину. Минимальный размер таких олигонуклеотидов является размером, необходимым для образования стабильного гибрида между олигонуклеотидом и комплементарной последовательностью на молекуле нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Они могут являться РНК, ДНК или комбинациями или производными любых из них. Олигонуклеотиды, как правило, являются относительно короткими одноцепочечными молекулами от 10 до 30 нуклеотидов, как правило, 15-25 нуклеотидов в длину. При использовании в качестве зонда или праймера в реакции амплификации минимальный размер такого олигонуклеотида является размером, необходимым для образования стабильного гибрида между олигонуклеотидом и комплементарной последовательностью на целевой молекуле нуклеиновой кислоты. Предпочтительно олигонуклеотиды составляют по меньшей мере 15 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 18 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 19 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 20 нуклеотидов, даже более предпочтительно по меньшей мере 25 нуклеотидов в длину. Олигонуклеотиды по настоящему изобретению, используемые в качестве зонда, как правило, конъюгируют с меткой, такой как радиоактивный изотоп, фермент, биотин, флуоресцентная молекула или хемилюминесцентная молекула.

Настоящее изобретение относится к олигонуклеотидам, которые можно использовать, например, в качестве зондов для идентификации молекул нуклеиновой кислоты или праймеров для получения молекул нуклеиновой кислоты. Зонды и/или праймеры можно использовать для клонирования гомологов полинуклеотидов по изобретению из других видов. Кроме того, способы гибридизации, известные в этой области, также можно использовать для скрининга геномных библиотек или библиотек кДНК на такие гомологи.

Полинуклеотиды и олигонуклеотиды по настоящему изобретению включают полинуклеотиды и олигонуклеотиды, гибридизующиеся в строгих условиях с одной или несколькими из последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 9 и/или 10. В рамках изобретения строгие условия являются условиями, в которых (1) используют низкую ионную силу и высокую температуру промывки, например 0,015 M NaCl/0,0015 M цитрата натрия/0,1% NaDodSO<sub>4</sub> при 50°C; (2) при гибридизации используют денатурирующее средство, такое как формамид, например 50% (об./об.) формамида с 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,1% фикола, 0,1% поливинилпирролидона, 50 mM буфера фосфата натрия при pH 6,5 с 750 mM NaCl, 75 mM цитрата натрия при 42°C; или (3) используют 50% формамида, 5-кратный SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M цитрата натрия), 50 mM фосфата натрия (pH 6,8), 0,1% пирогосфата натрия, 5-кратный раствор Денхардта, обработанную ультразвуком ДНК молоко лососевых (50 г/мл), 0,1% SDS и 10% сульфата декстрана при 42°C в 0,2-кратном SSC и 0,1% SDS.

Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут содержать одну или несколько мутаций по сравнению с природными молекулами, являющихся делециями, инсерциями или заменами нуклеотидных остатков. Мутанты могут являться природными (другими словами, выделенными из природного источника) или синтетическими (например, при осуществлении сайт-специфического мутагенеза нук-

леиновой кислоты). Вариант полинуклеотида или олигонуклеотида по изобретению включает молекулы разного размера и/или способен гибридизоваться с полинуклеотидами или олигонуклеотидами генома пшеницы, близкими к молекулам полинуклеотидов или олигонуклеотидов, определенными в настоящем описании. Например, варианты могут содержать дополнительные нуклеотиды (например, 1, 2, 3, 4 или более) или меньше нуклеотидов при условии, что они все равно гибридизуются с целевой областью. Кроме того, можно заменять несколько нуклеотидов, не влияя на способность олигонуклеотида гибридизоваться с целевой областью. Кроме того, легко можно конструировать варианты, гибридизующиеся вблизи, например в пределах 50 нуклеотидов, области генома растения, с которой гибридизуются конкретные олигонуклеотиды, определенные в настоящем описании. В частности, они включают полинуклеотиды, кодирующие тот же полипептид или аминокислотную последовательность, но отличающиеся нуклеотидной последовательностью благодаря избыточности генетического кода. Термины "вариант полинуклеотида" и "вариант" также включают природные аллельные варианты.

Конструкции нуклеиновой кислоты.

Настоящее изобретение относится к конструкциям нуклеиновой кислоты, содержащим полинуклеотиды по изобретению и содержащим их векторам и клеткам-хозяевам, способам их получения и применения и их применению. Настоящее изобретение относится к элементам, являющимся функционально связанными. Термин "функционально связанный" и т.п. относится к соединению полинуклеотидных элементов посредством функциональной взаимосвязи. Как правило, функционально связанные последовательности нуклеиновой кислоты являются смежно связанными и, если необходимо соединить две кодирующие белок области, смежными и находящимися в рамке считывания. Кодирующая последовательность "функционально связана с" другой кодирующей последовательностью, если РНК-полимераза будет транскрибировать две кодирующие последовательности в одной РНК, которая при трансляции транслируется в один полипептид, содержащий аминокислоты, полученные из обеих кодирующих последовательностей. Кодирующие последовательности могут не являться смежными друг с другом при условии, что экспрессируемые последовательности в конечном итоге процессируются с образованием желаемого белка.

В рамках изобретения термины "цис-действующая последовательность", "цис-действующий элемент", "цис-регуляторная область" или "регуляторная область" или схожий термин должны означать любую последовательность нуклеотидов, которая, при соответствующем расположении и соединении относительно экспрессируемой генетической последовательности, способна регулировать, по меньшей мере частично, экспрессию генетической последовательности. Специалистам в этой области будет понятно, что цис-регуляторная область может активировать, подвергать сайленсингу, выступать в качестве энхансера, репрессировать или иначе изменять уровень экспрессии и/или специфичности в отношении типа клеток и/или специфичности в отношении стадии развития последовательности гена на транскрипционном или посттранскрипционном уровне. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения цис-действующая последовательность является активаторной последовательностью, повышающей или стимулирующей экспрессию экспрессируемой генетической последовательности.

Термин "функционально связанный" промоторный или энхансерный элемент для транскрибируемого полинуклеотида означает размещение транскрибируемого полинуклеотида (например, кодирующего белок полинуклеотида или другого транскрипта) под регуляторным контролем промотора, затем контролирующего транскрипцию этого полинуклеотида. При конструировании комбинаций гетерологичного промотора/структурного гена, как правило, предпочтительно располагать промотор или его вариант на расстоянии от участка начала транскрипции транскрибируемого полинуклеотида, являющегося приблизительно тем же, что и расстояние между этим промотором и кодирующей белок областью, которую он контролирует в природных условиях; т.е. ген, из которого получают промотор. Как известно в этой области, некоторые изменения этого расстояния можно адаптировать без утраты функции. Аналогично, предпочтительное расположение регуляторного элемента последовательности (например, оператора, энхансера и т.д.) в отношении транскрибируемого полинуклеотида, помещаемого под его контроль, определяют посредством размещения элемента в его природных условиях; т.е. генов, из которых его получают.

В рамках изобретения термин "промотор" или "промоторная последовательность" относится к области гена, как правило, выше (в 5'-направлении) кодирующей области РНК, контролирующей инициацию и уровень транскрипции в интересующей клетке. "Промотор" включает транскрипционные регуляторные последовательности классического геномного гена, такие как последовательности ТАТА-бокс и ССААТ-бокс, а также дополнительные регуляторные элементы (т.е. вышележащие активирующие последовательности, энхансеры и сайленсеры), изменяющие экспрессию генов в ответ на стимулы, связанные со стадией развития и/или окружающей средой, или тканеспецифическим или специфическим в отношении типа клеток образом. Промотор, как правило, но необязательно (например, некоторые промоторы PolIII), располагается выше структурного гена, экспрессию которого он регулирует. Кроме того, регуляторные элементы, содержащие промотор, как правило, располагаются в пределах 2 т.п.н. от участка инициации транскрипции гена. Промоторы могут содержать дополнительные конкретные регуляторные элементы, располагающиеся более дистально относительно участка инициации для дополнительного

повышения экспрессии в клетке и/или для изменения времени или индуцибельности экспрессии структурного гена, с которыми он функционально связан.

Термин "конститутивный промотор" относится к промотору, регулирующему экспрессию функционально связанной транскрибируемой последовательности во многих или всех тканях организма, таких как растение. В рамках изобретения термин "конститутивный" необязательно свидетельствует о том, что ген экспрессируется на одном уровне во всех типах клеток, скорее о том, что ген экспрессируется в широком диапазоне типов клеток, хотя зачастую определены некоторые изменения уровня экспрессии. В рамках изобретения термин "селективная экспрессия" относится к экспрессии почти исключительно в конкретных органах, например, растения, таких как, например, эндосперм, эмбрион, листья, плоды, клубни или корень. В предпочтительном варианте осуществления промотор экспрессируется селективно или предпочтительно в листьях и/или стеблях растения, предпочтительно злакового растения. Таким образом, термин "селективная экспрессия" можно противопоставить термину "конститутивная экспрессия", который означает экспрессию во многих или всех тканях растения в большинстве или всех условиях, которым подвергается растение.

Селективная экспрессия также может приводить к компартиментализации продуктов экспрессии генов в конкретных тканях или органах растения или на конкретных стадиях развития. Компартиментализации с конкретной субклеточной локализацией, например в пластидах, цитозоле, вакуолях или апопластическом пространстве, можно достигать посредством включения в структуру продукта гена подходящих сигналов, например сигнального пептида, для транспорта в необходимый клеточный компартмент или в случае полуавтономных органелл (пластид и митохондрий) посредством встраивания трансгена с подходящими регуляторными последовательностями непосредственно в геном органеллы.

"Тканеспецифический промотор" или "органоспецифический промотор" является промотором, предпочтительно экспрессирующимся в одной ткани или органе относительно многих других тканей или органов, предпочтительно большинства, если не всех, других тканей или органов, например, в растении. Как правило, промотор экспрессируется на уровне, в 10 раз более высоком в конкретной ткани или органе, чем в других тканях или органах.

В варианте осуществления промотор является стебле-специфическим промотором или промотором, регулирующим экспрессию генов в надземной части растения (специфическим для зеленых тканей промотор), таким как промотор рибулоза-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (RUBISCO).

Неограничивающие примеры стебле-специфических промоторов включают промоторы, описанные в патенте США № 5625136 и Bam et al. (2008).

Промоторы, предусмотренные настоящим изобретением, могут являться нативными для растения-хозяина, подлежащего трансформации, или их можно получать из альтернативного источника, если область функциональна в растении-хозяине. Другие источники включают гены Т-ДНК *Agrobacterium*, такие как промоторы генов биосинтеза нопалина, октопина, маннопина или другие опиновые промоторы, тканеспецифические промоторы (см., например, патент США № 5459252 и WO 91/13992); промоторы вирусов (включая специфические в отношении хозяина вирусы) или частично или полностью синтетические промоторы. Многочисленные промоторы, функциональные в одно- и двудольных растениях, хорошо известны в этой области (см., например, Greve, 1983; Salomon et al., 1984; Garfinkel et al., 1983; Barker et al., 1983), включая различные промоторы, выделенные из растений и вирусов, такие как промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35S, 19S). Неограничивающие способы оценки активности промотора описаны в Medberry et al. (1992, 1993), Sambrook et al. (1989, выше) и патенте США № 5164316.

Альтернативно или дополнительно, промотор может являться индуцибельным промотором или промотором, регулируемым стадией развития, способным регулировать экспрессию встроенного полинуклеотида на соответствующей стадии развития, например, растения. Другие cis-действующие последовательности, которые можно использовать, включают транскрипционные и/или трансляционные энхансеры. Энхансерные области хорошо известны специалистам в этой области и могут включать инициаторный кодон ATG и смежные последовательности. При включении инициаторный кодон должен совпадать с рамкой считывания кодирующей последовательности, относящейся к чужеродному или экзогенному полинуклеотиду, для обеспечения трансляции целой последовательности, если она подлежит трансляции. Области инициации трансляции можно получать из источника области инициации транскрипции или из чужеродного или экзогенного полинуклеотида. Последовательность также можно получать из источника промотора, выбранного для регуляции транскрипции, и можно специально модифицировать его для усиления трансляции мРНК.

Конструкция нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может содержать 3'-нетранслируемую последовательность приблизительно от 50 до 1000 пар нуклеотидов, которая может включать последовательность терминации транскрипции. 3'-нетранслируемая последовательность может содержать сигнал терминации транскрипции, который может включать или не включать сигнал полиаденилирования и любые другие регуляторные сигналы, способные приводить к процессингу мРНК. Сигнал полиаденилирования служит для добавления полиадениловых трактов на 3'-конец предшественника мРНК. Сигналы полиаденилирования, как правило, распознают по наличию гомологии с канонической формой 5'-ААТААА-3', хотя возможны варианты. Последовательности терминации транскрипции, не

включающие сигнал полиаденилирования, включают терминаторы для РНК-полимеразы PolI или PolII, содержащие участок из четырех или более тимидинов. Примерами подходящих 3'-нетранслируемых последовательностей являются транскрибируемые 3'-нетранслируемые области, содержащие сигнал полиаденилирования из гена октопинсинтазы (ocs) или гена нопалинсинтазы (nos) из *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan et al., 1983). Подходящие 3'-нетранслируемые последовательности также можно получать из генов растения, таких как ген рибулоза-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (ssRUBISCO), хотя также можно использовать другие 3'-элементы, известные специалистам в этой области.

Так как последовательность ДНК, встраиваемая между участком инициации транскрипции и началом кодирующей последовательности, т.е. 5'-нетранслируемая лидерная последовательность (5'-UTR), может влиять на экспрессию генов, если она транслируется, а также транскрибируется, также можно использовать конкретную лидерную последовательность. Подходящие лидерные последовательности включают последовательности, содержащие последовательности, выбранные для регуляции оптимальной экспрессии чужеродной или эндогенной последовательности ДНК. Например, такие лидерные последовательности включают предпочтительную консенсусную последовательность, которая может повышать или поддерживать стабильность мРНК и предотвращать неправильную инициацию трансляции, например, как описано Joshi (1987).

#### Векторы.

Настоящее изобретение относится к применению векторов для манипуляций с генетическими конструкциями или их переноса. Термин "химерный вектор" означает молекулу нуклеиновой кислоты, предпочтительно молекулу ДНК, полученную, например, из плазмиды, бактериофага или вируса растения, в которую можно встраивать или клонировать последовательность нуклеиновой кислоты. Предпочтительно вектор является двухцепочечной ДНК, содержит один или несколько уникальных участков рестрикции и может быть способен к автономной репликации в определенной клетке-хозяине, включая целевую клетку или ткань или ее клетку- или ткань-предшественник, или способен к встраиванию в геном определенного хозяина таким образом, что воспроизводится клонируемая последовательность. Таким образом, вектор может являться автономно реплицирующимся вектором, т.е. вектором, существующим в виде экстрахромосомного объекта, репликация которого не зависит от хромосомной репликации, например, линейной или замкнутой кольцевой плазмидой, экстрахромосомным элементом, мини-хромосомой или искусственной хромосомой. Вектор может содержать любые средства для осуществления ауторепликации. Альтернативно, вектор может являться вектором, который при встраивании в клетку встраивается в геном клетки-реципиента и реплицируется вместе с хромосомами, в которые его встраивают. Векторная система может содержать один вектор или плазмиду, два или более вектора или плазмиды, которые вместе содержат общую ДНК, подлежащую встраиванию в геном клетки-хозяина, или транспозон. Выбор вектора, как правило, будет зависеть от совместимости вектора с клеткой, в которую его будут встраивать. Вектор также может включать селективный маркер, такой как ген резистентности к антибиотику, ген резистентности к гербициду или другой ген, который можно использовать для селекции подходящих трансформантов. Примеры таких генов хорошо известны специалистам в этой области.

Конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению можно встраивать в вектор, такой как плазида. Плазмидные векторы, как правило, включают дополнительные последовательности нуклеиновой кислоты, обеспечивающие простоту селекции, амплификации и трансформации экспрессирующей кассеты в прокариотических и эукариотических клетках, например векторы, полученные из pUC, векторы, полученные из pSK, векторы, полученные из pGEM, векторы, полученные из pSP, векторы, полученные из pBS, или бинарные векторы, содержащие одну или несколько областей Т-ДНК. Дополнительные последовательности нуклеиновой кислоты включают участки начала репликации для обеспечения автономной репликации вектора, гены селективных маркеров, предпочтительно кодирующие резистентность к антибиотику или гербициду, уникальные участки множественного клонирования, обеспечивающие наличие множества участков для инсерции последовательностей нуклеиновой кислоты или генов, кодируемых конструкцией нуклеиновой кислоты, и последовательности, повышающие трансформацию прокариотических и эукариотических клеток (в особенности растений).

Термин "маркерный ген" означает ген, придающий особый фенотип клеткам, экспрессирующим маркерный ген, и, таким образом, позволяющий таким трансформированным клеткам отличаться от клеток, не имеющих маркер. Ген селективного маркера придает признак, благодаря которому можно осуществлять "селекцию" с учетом резистентности к селективному средству (например, гербициду, антибиотику, радиации, высокой температуре или другой обработке, повреждающей нетрансформированные клетки).

Подвергающийся скринингу маркерный (или репортерный) ген придает признак, который можно идентифицировать посредством наблюдения или тестирования, т.е. посредством "скрининга" (например,  $\beta$ -глюкуронидазы, люциферазы, GFP или другого фермента, не присутствующего в нетрансформированных клетках). Маркерный ген и интересующую нуклеотидную последовательность можно не связывать.

Для облегчения идентификации трансформантов желательно, чтобы конструкция нуклеиновой кислоты содержала подвергающийся селекции или подвергающийся скринингу маркерный ген в качестве

чужеродного или экзогенного полинуклеотида или в дополнение к нему. Конкретный выбор маркера не является критическим при условии, что он является функциональным (т.е. селективным) в комбинации с выбранными растительными клетками. Маркерный ген и интересующий чужеродный или экзогенный полинуклеотид можно не связывать, так как котрансформация несвязанных генов, например, как описано в патенте США № 4399216, также является эффективным способом при трансформации растений.

Примерами бактериальных селективных маркеров являются маркеры, придающие резистентность к антибиотику, такую как резистентность к ампициллину, эритромицину, хлорамфениколу или тетрациклину, предпочтительно резистентность к канамицину. Неограничивающие примеры селективных маркеров для селекции растений-трансформантов включают ген *hug*, кодирующий резистентность к гигромицину В; ген неомизинфосфотрансферазы (*nptII*), придающий резистентность к канамицину, паромомицину, G418; ген глутатион-S-трансферазы из печени крысы, придающий резистентность к гербицидам на основе глутатиона, например, как описано в EP 256223; ген глутаминсинтетазы, при гиперэкспрессии придающий резистентность к ингибиторам глутаминсинтетазы, таким как фосфинотрицин, например, как описано в WO 87/05327, ген ацетилтрансферазы из *Streptomyces viridochromogenes*, придающий резистентность к селективному средству фосфинотрицину, например, как описано в EP 275957, ген, кодирующий 5-енолпирикат-3-фосфатсинтетазу (EPSPS), придающий толерантность к N-фосфометилглицину, например, как описано в Hinchee et al. (1988), ген *bar*, придающий резистентность к биалафосу, например, как описано в WO 91/02071; ген нитрилазы, такой как *bxn* из *Klebsiella ozaenae*, придающий резистентность к бромоксилилу (Stalker et al., 1988); ген дигидрофолатредуктазы (DHFR), придающий резистентность к метотрексату (Thillet et al., 1988); а мутантный ген ацетолактатсинтазы (ALS), придающий резистентность к имидазолинону, сульфонилкарбамиду или другим ALS-ингибирующим химическим веществам (EP 154204); мутантный ген антранилатсинтазы, придающий резистентность к 5-метилтриптофану; или ген далапондегалагеназы, придающий резистентность к гербициду.

Предпочтительные подвергающиеся скринингу маркеры включают в качестве неограничивающих примеров ген *uidA*, кодирующий фермент β-глюкуронидазы (GUS), для которого известны различные хромогенные субстраты, ген β-галактозидазы, кодирующий фермент, для которого известны хромогенные субстраты, ген экворина (Prasher et al., 1985), который можно использовать в детекции кальций-чувствительной биоломинесценции; ген зеленого флуоресцентного белка (Niedz et al., 1995) или его производные; ген люциферазы (*luc*) (Ow et al., 1986), делающий возможной детекцию биоломинесценции, и другие маркеры, известные в этой области. В рамках изобретения термин "репортерная молекула" означает молекулу, которая по своей химической природе обеспечивает аналитически определяемый сигнал, облегчающий определение промоторной активности с учетом белкового продукта.

Предпочтительно конструкцию нуклеиновой кислоты стабильно встраивают в геном, например, растения. Таким образом, нуклеиновая кислота содержит подходящие элементы, позволяющие встраивать молекулу в геном, или конструкцию помещают в соответствующий вектор, который можно встраивать в хромосому растительной клетки.

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к рекомбинантному вектору, включающему по меньшей мере одну молекулу полинуклеотида по настоящему изобретению, встроенную в любой вектор, способный доставлять молекулу нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Такой вектор содержит гетерологичные последовательности нуклеиновой кислоты, являющиеся последовательностями нуклеиновой кислоты, которые в природе не обнаруживают смежными с молекулами нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и которые, предпочтительно получают из иного вида, чем вид, из которого получают молекулы нуклеиновой кислоты. Вектор может являться РНК или ДНК, прокариотическим или эукариотическим и, как правило, является вирусом или плазмидой.

Ряд векторов, подходящих для стабильной трансфекции растительных клеток или для получения трансгенных растений, описан, например, в Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, supp. 1987; Weissbach and Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989; и Gelvin et al., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1990. Как правило, экспрессирующиеся в растении векторы включают, например, один или несколько клонированных генов растений под транскрипционным контролем 5'- и 3'-регуляторных последовательностей и доминантный селективный маркер. Такие экспрессирующиеся в растении векторы также могут содержать промоторную регуляторную область (например, регуляторную область, контролирующую индуцибельную или конститутивную, регулируемую окружающей средой или стадией развития или клеточно- или тканеспецифическую экспрессию), участок инициации транскрипции, участок связывания рибосомы, сигнал процессинга РНК, участок терминации транскрипции и/или сигнал полиаденилирования.

Можно модулировать уровень белка по изобретению, повышая уровень экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей белок в растительной клетке, или снижая уровень экспрессии гена, кодирующего белок в растении, что приводит к модифицированной резистентности к патогену. Можно модулировать уровень экспрессии гена, изменяя количество его копий на клетку, например, посредством встраивания синтетической генетической конструкции, содержащей кодирующую последовательность и элемент транскрипционного контроля, функционально связанный с ней и функциональный в клетке.

Множество трансформантов можно подвергать селекции и скринингу для получения трансформантов с предпочтительным уровнем и/или специфичностью для экспрессии трансгена, возникающей под влиянием эндогенных последовательностей вблизи участка встраивания трансгена. Предпочтительным уровнем и профилем экспрессии трансгена является тот, который приводит к значительной модификации резистентности к патогену или другому фенотипу. Альтернативно, популяцию подвергнутых мутагенезу семян или популяцию растений из программы разведения можно подвергать скринингу на отдельные линии с измененной резистентностью к патогену или другим фенотипом, ассоциированным с резистентностью к патогену.

Рекомбинантные клетки.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к рекомбинантной клетке, включающей клетку-хозяина, трансформированную с использованием одной или нескольких рекомбинантных молекул по настоящему изобретению, или ее клеткам-потомкам. Трансформацию клетки с использованием молекулы нуклеиновой кислоты можно осуществлять любым способом, посредством которого молекулу нуклеиновой кислоты можно встраивать в клетку. Способы трансформации включают в качестве неограничивающих примеров трансфекцию, электропорацию, микроинъекцию, липофекцию, адсорбцию и слияние протопластов. Рекомбинантная клетка может оставаться одноклеточной или может развиваться в ткань, орган или многоклеточный организм. Трансформированные молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут оставаться экстрахромосомными или могут встраиваться в один или несколько участков в хромосоме трансформированной (т.е. рекомбинантной) клетки таким образом, чтобы сохранялась их способность экспрессироваться.

Предпочтительными клетками-хозяевами являются растительные клетки, более предпочтительно клетки злакового растения, более предпочтительно клетки ячменя или пшеницы и даже более предпочтительно клетка пшеницы.

Трансгенные растения.

В рамках изобретения термин "растение" относится к целому растению и любому члену царства растения, а термин "растительный" относится к любому веществу, присутствующему в растении, полученному из него или относящемуся к нему, например органам растения (например, листьям, стеблям, корням, цветам), отдельным клеткам (например, пыльце), семенам, растительным клеткам и т.п. Саженьцы и пророщенные семена, из которых возникают корни и побеги, также включены в термин "растение". В рамках изобретения термин "части растения" относится к одному или нескольким тканям или органам растения, полученным из растения и содержащим геномную ДНК растения. Части растения включают вегетативные структуры (например, листья, стебли), корни, органы/структуры цветка, семена (включая эмбрион, семядоли и оболочку семян), ткань растения (например, сосудистую ткань, механические ткани и т.п.), клетки и их потомство. В рамках изобретения термин "растительная клетка" относится к клетке, полученной из растения или в растении и включает протопласты или другие клетки, полученные из растений, гаметопродукующие клетки и клетки, регенерирующие в целые растения. Растительные клетки могут являться клетками в культуре. Термин "ткань растения" означает дифференцированную ткань в растении, или ткань, полученную из растения ("эксплантат"), или недифференцированную ткань, полученную из незрелых или зрелых эмбрионов, семян, корней, плодов, клубней, пыльцы, опухолевой ткани, такой как корончатые галлы, и различных форм агрегатов растительных клеток в культуре, таких как каллус. Примерами тканей растения в семенах или из семян являются семядоли, эмбрион и рубчик. Таким образом, настоящее изобретение включает растения, части растений и содержащие их продукты.

В рамках изобретения термин "семена" относится к "зрелым семенам" растения, готовым для сбора или собираемым с растения, таким как, как правило, собираемые в коммерческих условиях в полях, или "развивающимся семенам", возникающим в растении после оплодотворения и до установления покоя семян и сбора урожая.

В рамках изобретения термин "трансгенное растение" относится к растению, содержащему конструкцию нуклеиновой кислоты, не обнаруживаемую в растении дикого типа того же вида, сорта или культивара. Т.е. трансгенные растения (трансформированные растения) содержат генетический материал (трансген), который они не содержали до трансформации. Трансген может включать генетические последовательности, полученные из растительной клетки, или другой растительной клетки, или нерастительного источника, или синтетическую последовательность. Как правило, трансген встраивают в растение посредством вмешательства человека, такого как, например, трансформация, но, как понятно специалисту в этой области, можно использовать любой способ. Генетический материал, предпочтительно стабильно встраивают в геном растения. Встроенный генетический материал может содержать последовательности, в природе встречающиеся у этого вида, но в перестроенном порядке или с другим порядком элементов, например бессмысловую последовательность. Растения, содержащие такие последовательности, в настоящем описании включены в термин "трансгенные растения".

"Нетрансгенное растение" является растением, не подвергнутым генетической модификации посредством встраивания генетического материала способами рекомбинантной ДНК. В предпочтительном варианте осуществления трансгенные растения являются гомозиготами по каждому встроенному гену (трансгену) таким образом, чтобы их потомство не разделялось по желаемому фенотипу.

В рамках изобретения термин "по сравнению с изогенным растением" или схожие фразы относятся к растению, являющемуся изогенным относительно трансгенного растения, но без интересующего трансгена. Предпочтительно соответствующее нетрансгенное растение принадлежит к тому же культивару или сорту, что и предок интересующего трансгенного растения или сибсовая линия растения, в которой отсутствует конструкция, зачастую обозначаемая как "сегрегант", или растение того же культивара или сорта, трансформированное с использованием конструкции "пустого вектора", и может являться нетрансгенным растением. В рамках изобретения термин "дикий тип" относится к клетке, ткани или растению, не модифицированному по изобретению. Клетки, ткань или растения дикого типа можно использовать в качестве контролей для сравнения уровней экспрессии экзогенной нуклеиновой кислоты или степени и природы модификации признака при использовании клеток, ткани или растений, модифицированных, как представлено в настоящем описании.

Трансгенные растения, как определено в контексте настоящего изобретения, включают потомство растений, генетически модифицированных рекомбинантными способами, где потомство содержит интересующий трансген. Такое потомство можно получать посредством самоопыления первичного трансгенного растения или скрещивания таких растений с другим растением того же вида. Это, как правило, будет модулировать продукцию по меньшей мере одного белка, определенного в настоящем описании, в желаемом растении или органе растения. Части трансгенного растения включают все части и клетки указанного растения, содержащие трансген, такие как, например, культивируемые ткани, каллус и протопласты.

Растения, предназначенные для применения в практическом осуществлении настоящего изобретения, включают однодольные и двудольные растения. Целевые растения включают, в качестве неограничивающих примеров, следующие: злаки (например, пшеницу, ячмень, рожь, овес, рис, кукурузу, сорго и родственные культуры); свеклу (сахарную свеклу и кормовую свеклу); яблоки, костянки и ягоды (яблоки, груши, сливы, персики, миндаль, вишню, клубнику, малину и ежевику); стручковые растения (бобы, чечевицу, горох, сою); масляные растения (рапс или другие растения рода *Brassica*, горчицу, мак, оливу, подсолнечник, сафлор, лен, кокос, клещевину, какао-бобы, арахис); растения рода *Cucumis* (кабачки, огурцы, дыни); волокнистые растения (хлопок, лен, коноплю, джут); цитрусовые (апельсины, лимоны, грейпфруты, мандарины); овощи (шпинат, салат-латук, спаржу, кочанную капусту, морковь, лук, томаты, картофель, паприку); лавровые растения (авокадо, корицу, камфору) или такие растения, как кукуруза, табак, орех, кофе, сахарный тростник, чай, виноград, хмель, газонные травы, банан и каучуконосные растения, а также декоративные растения (цветы, кустарники, широколиственные растения и вечнозеленые растения, такие как хвойные растения). Предпочтительно растение является злаковым растением, более предпочтительно пшеницей, рисом, кукурузой, тритикале, овсом, сорго или ячменем, даже более предпочтительно пшеницей.

В рамках изобретения термин "пшеница" относится к любому виду рода *Triticum*, включая их предков, а также их потомство, получаемое посредством скрещивания с другими видами. Пшеница включает "гексаплоидную пшеницу", имеющую организацию генома AABBDD, состоящего из 42 хромосом, и "тетраплоидную пшеницу", имеющую организацию генома AABB, состоящего из 28 хромосом. Гексаплоидная пшеница включает *T. aestivum*, *T. spelta*, *T. macha*, *T. compactum*, *T. sphaerococcum*, *T. vavilovii* и продукты их межвидового скрещивания. Предпочтительным видом гексаплоидной пшеницы является *T. aestivum* ssp *aestivum* (также обозначаемая как "пшеница мягкая"). Тетраплоидная пшеница включает *T. durum* (также обозначаемый в настоящем описании как пшеница твердая или *Triticum turgidum* ssp. *durum*), *T. dicoccoides*, *T. dicocum*, *T. polonicum* и продукты их межвидового скрещивания. Кроме того, термин "пшеница" включает потенциальных предков гексаплоидной или тетраплоидной *Triticum* sp., таких как *T. urartu*, *T. monococcum* или *T. boeoticum* в случае А-генома, *Aegilops speltoides* в случае В-генома и *T. tauschii* (также известный как *Aegilops squarrosa* или *Aegilops tauschii*) в случае D-генома. Особенно предпочтительными предками являются растения с А-геномом, даже более предпочтительно предком с А-геномом является *T. monococcum*. Культивар пшеницы для использования в настоящем изобретении может принадлежать в качестве неограничивающих примеров к любому из указанных выше видов. В настоящее изобретение также включены растения, получаемые общепринятыми способами с использованием *Triticum* sp. в качестве родительской особи при половом скрещивании с растением, не являющимся *Triticum* species (таким как рожь [*Secale cereale*]), включая в качестве неограничивающих примеров тритикале.

В рамках изобретения термин "ячмень" относится к любому виду рода *Hordeum*, включая их предков, а также их потомство, получаемому посредством скрещивания с другими видами. Предпочтительно, чтобы растение принадлежало к видам *Hordeum*, коммерчески культивируемым, таким как, например, культивар или сорт *Hordeum vulgare*, или подходящим для коммерческого производства семян.

Трансгенные растения, как определено в контексте настоящего изобретения, включают растения (а также части и клетки указанных растений) и их потомство, генетически модифицированное рекомбинантными способами для вызывания продукции по меньшей мере одного полипептида по настоящему изобретению в желаемом растении или органе растения. Трансгенные растения можно получать известными в этой области способами, такими как способы, в целом, описанные в A. Slater et al., Plant

Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants, Oxford University Press (2003), и P. Christou and H. Klee, Handbook of Plant Biotechnology, John Wiley & Sons (2004).

В предпочтительном варианте осуществления трансгенные растения являются гомозиготами по каждому встроенному гену (трансгену) таким образом, чтобы их потомство не разделялось по желаемому фенотипу. Трансгенные растения также могут являться гетерозиготами по встроенным трансгенам, такими как, например, потомство F<sub>1</sub>, выращенное из гибридных семян. Такие растения могут обладать преимуществами, такими как гетерозис, хорошо известный в этой области.

В рамках изобретения "другими генетическими маркерами" могут являться любые молекулы, связанные с желаемым признаком растения. Такие маркеры хорошо известны специалистам в этой области и включают молекулярные маркеры, связанные с генами, определяющими признаки, такие как резистентность к заболеванию, урожайность, морфология растения, качество зерна, признаки покоя, цвет зерна, содержание гиббереллиновой кислоты в семенах, высота растения, цвет муки и т.п. Примерами таких генов являются гены резистентности к желтой ржавчине Yr10 или Yr17, гены резистентности к нематодам, такие как Cre1 и Cre3, аллели в локусах глютелина, определяющие прочность теста, такие как аллели Ah, Bx, Dx, Ay, Bu и Du, гены Rht, определяющие полукарликовый характер роста и, таким образом, резистентность к полеганию.

Описано четыре общих способа прямой доставки гена в клетки:

- (1) химические способы (Graham et al., 1973);
- (2) физические способы, такие как микроинъекция (Саресчи, 1980); электропорация (см., например, WO 87/06614, патенты США № 5472869, 5384253, WO 92/09696 и WO 93/21335) и генная пушка (см., например, патенты США № 4945050 и 5141131);
- (3) вирусные векторы (Clapp, 1993; Lu et al., 1993; Eglitis et al., 1988);
- (4) рецептор-опосредованные механизмы (Curiel et al., 1992; Wagner et al., 1992).

Способы ускорения, которые можно использовать, включают, например, бомбардировку микрочастицами и т.п. Одним из примеров способа доставки молекул нуклеиновой кислоты для трансформации в растительные клетки является бомбардировка микрочастицами. Обзор этого способа представлен в Yang et al., Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, England (1994). Небиологические частицы (микрочастицы) можно покрывать нуклеиновыми кислотами и доставлять в клетки посредством движущей силы. Примеры частиц включают частицы, состоящие из вольфрама, золота, платины и т.п. Конкретным преимуществом бомбардировки микрочастицами, в дополнение к тому, что она является эффективным средством для воспроизводимой трансформации однодольных растений, является то, что ни выделение протопластов, ни инфицирование *Agrobacterium* не является необходимым. Системой для доставки частиц, пригодной для использования в настоящем изобретении, является гелиевая пушка PDS-1000/He, доступная в Bio-Rad Laboratories. Для бомбардировки незрелые эмбрионы или полученные из них клетки-мишени, такие как скутеллум или каллус из незрелых эмбрионов, можно помещать на твердую среду для культивирования.

В другом альтернативном варианте осуществления можно стабильно трансформировать пластиды. Способ, описанный для трансформации пластид высших растений, включают доставку ДНК, содержащей селективный маркер, с помощью биобаллистической пушки и направленное встраивание ДНК в геном пластид посредством гомологичной рекомбинации (патенты США № 5451513, 5545818, 5877402, 5932479 и WO 99/05265).

*Agrobacterium*-опосредованный перенос является широко применяемой системой для встраивания генов в растительные клетки, так как ДНК можно встраивать в ткани целого растения, таким образом, обходя потребность в регенерации интактного растения из протопласта. Использование *Agrobacterium*-опосредованных векторов для встраивания ДНК в растительные клетки хорошо известно в этой области (см., например, патенты США № 5177010, 5104310, 5004863, 5159135). Кроме того, встраивание Т-ДНК является относительно точным, приводящим к нескольким перестройкам. Область ДНК, подлежащую переносу, определяют по пограничным последовательностям и вставочной ДНК, как правило, встраивают в геном растения.

Векторы для трансформации с помощью *Agrobacterium* способны реплицироваться в *E. coli*, а также *Agrobacterium*, что делает возможными удобные манипуляции, как описано (Klee et al., Plant DNA Infectious Agents, Hohn and Schell, (издатели), Springer-Verlag, New York, (1985): 179-203). Кроме того, технологический прогресс в области векторов для *Agrobacterium*-опосредованного переноса генов привел к улучшениям в размещении генов и участков рестрикции в векторах для облегчения конструирования векторов, способных экспрессировать различные кодирующие полипептид гены. Описанные векторы содержат удобные области полилинкеров, фланкированные промотором и участком полиаденилирования для прямой экспрессии встраиваемых кодирующих полипептид генов, и подходят для целей по настоящему изобретению. Кроме того, для трансформации можно использовать *Agrobacterium*, содержащие "необезоруженные" и "обезоруженные" гены Ti. Для сортов растений, для которых *Agrobacterium*-опосредованная трансформация является эффективной, она является способом выбора из-за простой и определенной природы переноса генов.

Трансгенное растение, полученное способами трансформации с использованием *Agrobacterium*, как

правило, содержит один генетический локус на одной хромосоме. Такие трансгенные растения можно обозначать как гемизиготы по добавленному гену. Более предпочтительным является трансгенное растение, гомозиготное по добавленному структурному гену; т.е. трансгенное растение, содержащее два добавленных гена, один ген в том же локусе на каждой хромосоме из пары хромосом. Гомозиготное трансгенное растение можно получать посредством полового скрещивания (самоопыления) независимого трансгенного растения-сегреганта, содержащего один добавленный ген, проращивания некоторых из полученных семян и анализа полученных растений на интересующий ген.

Также следует понимать, что два разных трансгенных растения также можно скрещивать для получения потомства, содержащего два независимо сегрегирующих экзогенных гена. Посредством самоопыления соответствующего потомства можно получать растения, гомозиготные по обоим экзогенным генам. Также предусмотрены обратное скрещивание с родительским растением и ауткроссинг с нетрансгенным растением, как при вегетативном размножении. Описание других способов разведения, общепотребительных для различных признаков и культур, можно найти в Fehr, *Breeding Methods for Cultivar Development*, J. Wilcox (editor) American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).

Трансформацию протопластов растения можно осуществлять способами на основе осаждения фосфатом кальция, обработки полиэтиленгликолем, электропорации и комбинации этих обработок. Использование этих систем по отношению к различным сортам растений зависит от способности к регенерации этого конкретного сорта растения из протопластов. Описаны иллюстративные способы регенерации злаков из протопластов (Fujimura et al., 1985; Toriyama et al., 1986; Abdullah et al., 1986).

Также можно использовать другие способы трансформации клеток, и они включают, в качестве неограничивающих примеров, встраивание ДНК в растения посредством прямого переноса ДНК в пыльцу, прямую инъекцию ДНК в репродуктивные органы растения или прямую инъекцию ДНК в клетки незрелых эмбрионов с последующей регидратацией обезвоженных эмбрионов.

Регенерация, выращивание и культивирование растений из отдельных трансформантов-протопластов растений или различных трансформированных эксплантатов хорошо известны в этой области (Weissbach et al., *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, (1988)). Эта регенерация и выращивание, как правило, включают стадии селекции трансформированных клеток, культивирование этих конкретных клеток с использованием общепринятых стадий эмбрионального развития со стадией укоренившегося саженца. Трансгенные эмбрионы и семена регенерируют аналогичным образом. Затем полученные трансгенные укоренившиеся побеги высаживают в подходящую среду для выращивания растений, такую как почва.

Выращивание или регенерация растений, содержащих чужеродный, экзогенный ген, хорошо известны в этой области. Предпочтительно регенерировавшие растения подвергают самоопылению для получения гомозиготных трансгенных растений. В ином случае пыльцу, полученную из регенерировавших растений, скрещивают с растениями агрономически важных линий, выращенными из семян. И наоборот, пыльцу растений этих важных линий используют для опыления регенерировавших растений. Трансгенное растение по настоящему изобретению, содержащее желаемую экзогенную нуклеиновую кислоту, культивируют способами, хорошо известными специалисту в этой области.

Способы трансформации двудольных растений, главным образом, с использованием *Agrobacterium tumefaciens* и получение трансгенных растений описаны для хлопка (патенты США № 5004863, 5159135, 5518908); сои (патенты США № 5569834, 5416011); растений рода *Brassica* (патент США № 5463174); арахиса (Cheng et al., 1996) и гороха (Grant et al., 1995).

Способы трансформации злаковых растений, таких как пшеница и ячмень, для внесения генетического варианта в растение посредством встраивания экзогенной нуклеиновой кислоты и для регенерации растений из протопластов или незрелых эмбрионов растений хорошо известны в этой области, см. например, СА 2092588, AU 61781/94, AU 667939, патент США № 6100447, WO 97/048814, патент США № 5589617, патент США № 6541257, и другие способы представлены WO 99/14314. Предпочтительно трансгенные растения пшеницы или ячменя получают посредством опосредованной *Agrobacterium tumefaciens* трансформации. Векторы, несущие желаемую конструкцию нуклеиновой кислоты, можно встраивать в регенерируемые клетки пшеницы из культивируемой ткани растений или эксплантатов или подходящие растительные системы, такие как протопласты. Регенерируемые клетки пшеницы, предпочтительно получают из скutelлума незрелых эмбрионов, зрелых эмбрионов, полученного из них каллуса или меристемной ткани.

Для подтверждения наличия трансгенов в трансгенных клетках и растениях можно осуществлять амплификацию посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) или саузерн-блоттинг способами, известными специалистам в этой области. Продукты экспрессии трансгенов можно определять любыми способами в зависимости от природы продукта, и эти способы включают вестерн-блоттинг и ферментативный анализ. Одним из особенно пригодных способов количественного анализа экспрессии белка и детекции репликации в различных тканях растений является использование репортерного гена, такого как GUS. После получения трансгенных растений их можно выращивать для получения тканей или частей растений, имеющих желаемый фенотип. Можно собирать ткани растения или части растения и/или семена. Семена могут служить источником для выращивания дополнительных растений с тканями или

частями, имеющими желаемые характеристики.

Селекция с использованием маркера.

Селекция с использованием маркера является хорошо известным способом селекции гетерозиготных растений, необходимых при обратном скрещивании с рекуррентной родительской особью в программе классического разведения. Популяция растений в каждом поколении при обратном скрещивании будет гетерозиготной по интересующему гену, как правило, присутствующему в популяции при обратном скрещивании в соотношении 1:1, и для различения двух аллелей гена можно использовать молекулярный маркер. Раннюю селекцию растений для последующего обратного скрещивания осуществляют посредством выделения ДНК, например, из молодых побегов и тестирования с использованием конкретного маркера для интрогрессированного желаемого признака, в то время как энергия и ресурсы концентрируются на меньшем количестве растений. Для дополнительного ускорения программы обратного скрещивания эмбрион из незрелых семян (25 дней после цветения) можно отделять и выращивать на питательных средах в стерильных условиях, а не позволять семенам полностью созреть. Этот способ, названный "спасение эмбриона", используемый в комбинации с выделением ДНК на стадии трех листьев и анализом по меньшей мере одного аллеля или варианта Sr50, придающего растению повышенную резистентность к стеблевой ржавчине, делает возможной быструю селекцию растений, несущих желаемый признак, которые можно выращивать до зрелости в теплице или поле для последующего дополнительного обратного скрещивания с рекуррентным родителем.

В способах по настоящему изобретению можно использовать любой способ молекулярной биологии, известный в этой области.

Такие способы включают в качестве неограничивающих примеров использование амплификации нуклеиновых кислот, секвенирование нуклеиновых кислот, гибридизацию нуклеиновых кислот с использованием соответствующим образом меченых зондов, анализ одноцепочечных конформационных полиморфизмов (SSCA), электрофорез в градиенте денатурирующего геля (DGGE), гетеродуплексный анализ (HET), анализ химического расщепления (CCM), каталитическое расщепление нуклеиновых кислот или их комбинацию (см., например, Lemieux, 2000; Langridge et al., 2001). Настоящее изобретение также включает способы с использованием молекулярных маркеров для детекции полиморфизмов, связанных с аллелями (например) гена Sr50, придающих повышенную резистентность к стеблевой ржавчине. Такие способы включают детекцию или анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP), RAPD, анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (AFLP) и микросателлитный анализ (простых повторов последовательности, SSR). Тесно сцепленные маркеры легко можно получать способами, хорошо известными в этой области, такими как анализ объединенных сегрегантов, как описано в Langridge et al. (2001).

В варианте осуществления сцепленные локусы для селекции с использованием маркера находятся по меньшей мере в 1 cM, или 0,5 cM, или 0,1 cM, или 0,01 cM от гена, кодирующего полипептид по изобретению.

"Полимеразная цепная реакция" ("ПЦР") является реакцией, при которой получают реплицированные копии целевого полинуклеотида с использованием "пары праймеров" или "набора праймеров", состоящего из "прямого" и "обратного" праймера, и катализатор полимеризации, такой как ДНК-полимераза и, как правило, термостабильный фермент-полимераза. Способы ПЦР известны в этой области и описаны, например, в "PCR" (M.J. McPherson and S.G. Moller (издатели), BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford (2000)). ПЦР можно осуществлять с использованием кДНК, полученной при обратной транскрипции мРНК, выделенной из растительных клеток, экспрессирующих ген или аллель Sr50, придающий повышенную резистентность к стеблевой ржавчине.

Однако, как правило, проще осуществлять ПЦР с использованием геномной ДНК, выделенной из растения.

Праймер является олигонуклеотидной последовательностью, способной гибридизоваться сайт-специфическим образом с целевой последовательностью и подвергаться элонгации при ПЦР. Ампликоны, или продукты ПЦР, или ПЦР-фрагменты, или продукты амплификации являются продуктами элонгации, содержащими праймер и заново синтезированные копии целевых последовательностей.

Мультиплексные системы ПЦР содержат множество наборов праймеров, приводящих к одновременной продукции нескольких ампликонов. Праймеры могут полностью совпадать с целевой последовательностью или могут содержать внутренние несовпадающие основания, что может привести к встраиванию участков распознавания ферментов рестрикции или участков каталитического распознавания/расщепления нуклеиновых кислот в конкретных целевых последовательностях. Праймеры также могут содержать дополнительные последовательности и/или модифицированные или меченые нуклеотиды для облегчения захвата или детекции ампликонов. Повторные циклы термической денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и элонгации отоженных праймеров с использованием полимеразы приводят к экспоненциальной амплификации целевой последовательности. Термины "мишень", "целевая последовательность" или "матрица" относятся к последовательностям нуклеиновой кислоты, подвергаемым амплификации.

Способы прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей хорошо известны специали-

стам в этой области, и их можно найти, например, в Ausubel et al., (выше) и Sambrook et al., (выше). Секвенирование можно осуществлять любым подходящим способом, например посредством дидеоксисеквенирования, химического секвенирования или их вариантов. Прямое секвенирование обладает преимуществом, состоящим в определении изменения в любой паре оснований конкретной последовательности.

#### TILLING.

Растения по изобретению можно получать способом, известным как TILLING (направленные индуцированные локальные повреждения генома). На первой стадии вносимые мутации, такие как новые отдельные изменения пар оснований, индуцируют в популяции растений, обрабатывая семена (или пыльцу) химическим мутагеном, а затем выращивая растения до поколения, когда мутации будут стабильно наследоваться. Выделяют ДНК и хранят семена от всех особей популяции для создания ресурса, который можно повторно оценивать в течение периода времени.

Для анализа TILLING конструируют праймеры для ПЦР для специфической амплификации отдельного интересующего гена-мишени. Специфичность особенно важна, если мишень является членом семейства генов или частью полиплоидного генома. Затем можно использовать меченые красителем праймеры для амплификации продуктов ПЦР из объединенной ДНК множества особей. Эти продукты ПЦР подвергают денатурации и повторному отжигу, чтобы позволить образоваться неправильно спаренным парам оснований. Неправильно спаренные пары оснований, или гетеродуплексы, представляют собой природные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) (т.е. несколько растений из популяции, вероятно, несут один и тот же полиморфизм) и индуцированные SNP (т.е. лишь редкие отдельные растения, вероятно, проявят мутацию). После образования гетеродуплексов использование эндонуклеазы, такой как Cel I, распознающей и расщепляющей неправильно спаренную ДНК, является ключевой стадией в обнаружении новых SNP в популяции TILLING.

С использованием этого подхода скринингу можно подвергать многие тысячи растений для идентификации любой особи с изменением отдельного основания, а также небольших инсерций или делеций (1-30 п.н.) в любом гене или конкретной области генома. Оцениваемые геномные фрагменты могут иметь диапазон размеров от 0,3 до 1,6 т.п.н. При 8-кратном объединении комбинация фрагментов в 1,4 т.п.н. (не считая концов фрагментов, где детекция SNP проблематична из-за помех) и 96 дорожек на анализ позволяет проводить скрининг до миллиона пар оснований геномной ДНК за один анализ, что делает TILLING высокопроизводительным способом.

TILLING дополнительно описан в Slade and Knauf (2005) и Henikoff et al. (2004).

В дополнение к эффективной детекции мутаций высокопроизводительная технология TILLING идеальна для детекции природных полиморфизмов. Таким образом, исследование неизвестной гомологичной ДНК посредством образования гетеродуплексов с известной последовательностью позволяет выявлять количество и положение полиморфных участков. Идентифицируют изменения нуклеотидов и небольшие инсерции и делеции, включая, по меньшей мере, некоторые полиморфизмы количества повторов. Этот способ назван ECOTILLING (Comai et al., 2004).

Регистрируют приблизительное положение каждого SNP в пределах нескольких нуклеотидов. Таким образом, каждый гаплотип можно архивировать с учетом его подвижности. Данные о последовательности можно получать с относительно небольшим пошаговым усилием с использованием аликвот той же амплифицированной ДНК, используемой для анализа расщепления неправильно спаренных оснований. Левый или правый праймер для секвенирования для отдельной реакции выбирают по его близости к полиморфизму полиморфизм. С помощью программного обеспечения Sequencher осуществляют множественное выравнивание и обнаруживают изменение оснований, которое в каждом случае подтверждало полосу в геле.

ECOTILLING можно осуществлять с меньшими затратами, чем полное секвенирование, в настоящее время используемое для обнаружения большинства SNP. Можно подвергать скринингу планшеты, содержащие упорядоченную экотипическую ДНК, а не совокупности ДНК из растений, подвергнутых мутагенезу. Так как детекцию осуществляют с использованием гелей с приблизительным разрешением пар оснований, и фоновые паттерны однородны среди дорожек, полосы, имеющие идентичный размер, можно совмещать, таким образом, определяя и генотипируя SNP за одну стадию. Таким образом, конечное секвенирование SNP является простым и эффективным, тем более что аликвоты тех же продуктов ПЦР, используемых для скрининга, можно подвергать секвенированию ДНК.

#### Обработка растений/зерна.

Зерно/семена по изобретению, предпочтительно зерно злаков и более предпочтительно зерно пшеницы, или другие части растений по изобретению можно обрабатывать для получения пищевого ингредиента, пищевого или непищевого продукта любым способом, известным в этой области.

В одном из вариантов осуществления продукт является цельнозерновой мукой, такой как, например, ультрамелкая цельнозерновая мука или мука, полученная приблизительно из 100% зерна. Цельнозерновая мука включает компонент рафинированной муки (рафинированную муку) и грубую фракцию (ультрамелкую грубую фракцию).

Рафинированная мука может являться мукой, получаемой, например, посредством перемалывания и просеивания очищенного зерна, такого как зерно пшеницы или ячменя. Размер частиц рафинированной

муки описан как мука, в которой не менее 98% проходит через ткань с отверстиями не более, чем у тканой проволочной сетки, обозначенной как "212 мкм (U.S. Wire 70)". Грубая фракция включает по меньшей мере одно из отрубей и проростка. Например, проросток является эмбриональным растением, обнаруживаемым в зародыше зерна. Проросток включает липиды, волокно, витамины, белок, минералы и фитонутриенты, такие как флавоноиды. Отруби включают несколько слоев клеток и содержат значительное количество липидов, волокна, витаминов, белка, минералов и фитонутриентов, таких как флавоноиды. Кроме того, грубая фракция может включать алейроновый слой, также включающий липиды, волокно, витамины, белок, минералы и фитонутриенты, такие как флавоноиды. Алейроновый слой, технически считающийся частью эндосперма, проявляет многие из тех же характеристик, что и отруби, и, таким образом, его, как правило, удаляют с отрубями и проростком при перемалывании. Алейроновый слой содержит белки, витамины и фитонутриенты, такие как феруловая кислота.

Кроме того, грубую фракцию можно смешивать с компонентом рафинированной муки. Грубую фракцию можно смешивать с компонентом рафинированной муки для получения цельнозерновой муки, таким образом получая цельнозерновую муку с повышенной пищевой ценностью, содержанием волокон и антиоксидантными свойствами по сравнению с рафинированной мукой. Например, грубую фракцию или цельнозерновую муку можно использовать в различных количествах для замены рафинированной или цельнозерновой муки в выпечке, закусочных пищевых продуктах и пищевых продуктах. Цельнозерновую муку по настоящему изобретению (т.е. ультрамелкую цельнозерновую муку) также можно предоставлять непосредственно потребителям для использования в домашней выпечке. В примере варианта осуществления профиль грануляции цельнозерновой муки является таким, что 98% частиц по массе цельнозерновой муки имеют размер менее 212 мкм.

В дополнительных вариантах осуществления ферменты, обнаруживаемые в отрубях и проростках в цельнозерновой муке и/или грубой фракции, инактивируют для стабилизации цельнозерновой муки и/или грубой фракции. Стабилизация является способом, в котором используют пар, высокую температуру, радиацию или другие обработки для инактивации ферментов, обнаруживаемых в отрубях и слое проростка. Стабилизированная мука сохраняет свои кулинарные характеристики и имеет больший срок годности.

В дополнительных вариантах осуществления цельнозерновая мука, грубая фракция или рафинированная мука могут являться компонентом (ингредиентом) пищевого продукта, и их можно использовать для получения пищевого продукта. Например, пищевой продукт может являться бейглом, бисквитом, хлебом, булкой, круассаном, пельменем, английским маффином, маффином, питой, бездрожжевым хлебом, замороженным тестом, тестом, запеченными бобами, буррито, чили, тако, тамале, тортильей, закрытым пирогом, готовыми к употреблению злаками, готовым блюдом, фаршем, предназначенной для приготовления в СВЧ-печи пищей, брауни, тортом, чизкейком, кексом к кофе, печеньем, десертом, кондитерскими изделиями, сдобной булочкой, сладким батончиком, корочкой пирога, начинкой для пирога, детским питанием, готовой смесью для выпечки хлебобулочных изделий, жидким тестом, сухарями, смесью для подливки, заменителем мяса, смесью приправ, смесью для супа, подливкой, заправкой для соуса, заправкой для салата, супом, сметаной, лапшой, макаронными изделиями, лапшой рамен, лапшой чоу-мейн, лапшой ло-мейн, добавкой в мороженое, брикетом мороженого, мороженым в вафельном стаканчике, мороженым в вафлях, крекером, гренком, пончиком, яичным роллом, экструдированной закусочкой, фруктовым и зерновым батончиком, предназначенным для приготовления в СВЧ-печи закусочным продуктом, питательным батончиком, оладьей, полуфабрикатом хлебобулочного изделия для допекания, претцелем, пудингом, продуктом на основе гранолы, закусочной из чипсов, закусочным продуктом, смесью закусок, вафель, основой для пиццы, кормом для животных или кормом для домашних животных.

В альтернативных вариантах осуществления цельнозерновая мука, рафинированная мука или грубая фракция могут являться компонентом питательной добавки. Например, питательная добавка может являться продуктом, добавляемым в питание, содержащим один или несколько дополнительных ингредиентов, как правило, включая: витамины, минералы, травы, аминокислоты, ферменты, антиоксиданты, травы, специи, пробиотики, экстракты, пребиотики и волокна. Цельнозерновая мука, рафинированная мука или грубая фракция по настоящему изобретению включают витамины, минералы, аминокислоты, ферменты и волокна. Например, грубая фракция содержит концентрированное количество пищевых волокон, а также других необходимых питательных веществ, таких как витамины группы В, селен, хром, марганец, магний и антиоксиданты, необходимые для здорового питания. Например, 22 г грубой фракции по настоящему изобретению соответствуют 33% рекомендуемого суточного количества потребляемого волокна. Питательная добавка может включать любые известные пищевые ингредиенты, которые будут полезны для общего здоровья индивидуума, их неограничивающие примеры включают витамины, минералы, другие волокнистые компоненты, жирные кислоты, антиоксиданты, аминокислоты, пептиды, белки, лютеин, рибозу, омега-3-жирные кислоты и/или другие пищевые ингредиенты. Добавку можно вводить в качестве неограничивающих примеров в следующих формах: быстрорастворимые смеси для напитков, готовые к употреблению напитки, питательные батончики, вафли, печенье, крекеры, гель, капсулы, жевательная резинка, жевательные таблетки и пилюли. Один из вариантов осуществления относится к волокнистой добавке в форме ароматизированного коктейля или солодового напитка, этот вари-

ант осуществления может быть особенно пригодным в виде волокнистой добавки для детей.

В дополнительном варианте осуществления для получения многозлаковой муки или многозлаковой грубой фракции можно использовать перемалывание. Например, отруби и проросток из одного типа зерна можно измельчать и смешивать с измельченным эндоспермом или цельнозерновой мукой другого типа злаков. Альтернативно, отруби и проросток одного типа зерна можно измельчать и смешивать с измельченным эндоспермом или цельнозерновой мукой другого типа зерна. Предполагают, что настоящее изобретение относится к смешиванию любой комбинации одного или нескольких из отрубей, проростков, эндосперма и цельнозерновой муки одного или нескольких типов зерна. Этот многозлаковый подход можно использовать для получения специальной муки и капитализации с учетом качеств и пищевой ценности множества типов злаков для получения одной муки.

Предполагают, что цельнозерновая мука, грубая фракция и/или зерновые продукты по настоящему изобретению можно получать любым способом перемалывания, известным в этой области. Пример варианта осуществления включает перемалывание зерна в едином потоке без разделения эндосперма, отрубей и проростков зерна в отдельные потоки. Чистое и кондиционированное зерно переправляют к первой проточной мельнице, такой как молотковая дробилка, вальцовая мельница, штифтовая мельница, ударная дробилка, дисковая мельница, атриторная мельница, вальцы или т.п. После перемалывания зерно отделяют и переправляют на сито-грохот. Кроме того, предполагают, что цельнозерновая мука, грубая фракция и/или зерновые продукты по настоящему изобретению можно модифицировать или улучшать несколькими другими способами, такими как ферментация, инстантизация, экструзия, инкапсуляция, за жаривание, обжаривание или т.п.

Соложение.

Солодовый напиток по настоящему изобретению включает алкогольные напитки (включая дистиллированные напитки) и безалкогольные напитки, получаемые с использованием солода в качестве исходного материала или его части. Примеры включают пиво, хаппосю (пивной напиток с низким содержанием солода), виски, солодовые напитки с низким содержанием алкоголя (например, солодовые напитки, содержащие менее 1% алкоголя) и неалкогольные напитки.

Соложение является способом контролируемого вымачивания и проращивания с последующим высушиванием зерна, такого как зерно ячменя и пшеницы. Эта последовательность событий важна для синтеза множества ферментов, вызывающих модификацию зерна, главным образом, деполимеризующую клеточные стенки погибшего эндосперма и мобилизующую питательные вещества зерна. При последующем высушивании запах и цвет появляются по причине химических реакций появления бурой окраски. Хотя солод в основном используют для получения напитков, его также можно использовать в других промышленных способах, например в качестве источника ферментов в хлебопекарной промышленности или в качестве ароматизатора и красителя в пищевой промышленности, например, в виде солода или солодовой муки или косвенно в виде солодового сиропа и т.д.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способам получения солодовой композиции. Способ, предпочтительно включает стадии:

- (i) получение зерна, такого как зерно ячменя или пшеницы по изобретению;
- (ii) вымачивание указанного зерна;
- (iii) проращивания вымоченного зерна в заранее определенных условиях и
- (iv) высушивание указанного пророщенного зерна.

Например, солод можно получать любым из способов, описанных в Hosney (Principles of Cereal Science and Technology, Second Edition, 1994: American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minn.). Однако с настоящим изобретением также можно использовать любой другой подходящий способ получения солода, такой как способы получения специальных солодов, включая в качестве неограничивающих примеров способы обжаривания солода.

Солод в основном используют для пивоварения, но также и для получения дистиллированных спиртов. Пивоварение включает получение сусла, основную и вторичную ферментацию и последующую обработку. Сначала солод перемалывают, вмешивают в воду и нагревают. В течение этого "затириания солода" ферменты, активированные при соложении, вызывают деградацию крахмала зерна в ферментируемые сахара. Полученное сусло очищают, добавляют дрожжи, ферментируют смесь и осуществляют последующую обработку.

### Примеры

Пример 1. Материалы и способы.

Растительный материал и условия роста.

В экспериментах, представленных в настоящем описании, использовали растения двух линий пшеницы, содержащих независимые интрогрессии Sr50, Gabo1BL.IRS и Gabo1DL.IRS-DR.A1, и мутанты M2 (00.002), M7 (00.007) и M13 (01.013), полученные из этих линий с помощью рентгеновского излучения и обработки этилметансульфонатом (EMS). Эти линии описаны Rogowosky et al. (1991) и Mago et al. (2004). Gabo1BL.IRS с транслокацией подвергали обратному скрещиванию через пять поколений с растениями пшеницы культивара Federation для получения резистентной линии Federation\*5/Gabo1BL.IRS-1-1, содержащей Sr50 в отсутствие фоновых генов Gabo. Растения линии Ga-

bo1BL.1RS являлись резистентными к североамериканским и африканским изолятам ржавчины Pgt благодаря наличию гена резистентности Sr50.

Растения *Nicotiana benthamiana* выращивали в вегетационной камере при 22°C с периодом освещения 16 ч и периодом темноты 8 ч за 24 ч.

Анализ маркеров и фенотипирование ржавчины.

Маркеры, полученные из содержащего ген Mla ВАС из хромосомы 5Н ячменя (Wei et al., 1999) и используемые для анализа мутантов в настоящем описании, описаны Mago et al. (2004). Фенотипирование стеблевой ржавчины и скрининг мутантов осуществляли с использованием саженцев возрастом 1 неделя и расы *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Pgt) 98-1,2,3,5,6 (регистрационный номер культуры 279 Sydney University), как описано в Mago et al. (2009). Для различения Sr50 и Sr31 растения фенотипировали по расам Pgt TTKSK (Ug99), TTKST и 98-1,2,3,5,7 + 50 (регистрационный номер культуры 632 Sydney University). Трансгенные растения также фенотипировали по ответам на листовую ржавчину и желтую ржавчину злаков посредством инокуляции саженцев патотипом 104-2,3,(6),(7),11 *P. tritricina* (регистрационный номер культуры 423 Sydney University) и патотипом 110 E143A+ *P. striiformis* f. sp. *tritici* (регистрационный номер культуры 444 Sydney University) соответственно.

В случае анализов инфицирования ржавчиной для различения Sr50 и других генов резистентности с разной специфичностью саженцы возрастом в одну неделю инокулировали расами Pgt 34-2,4,5,7,11 (регистрационный номер #760785 Plant Breeding Institute); 34-2,12,13 (#840552); 126-5,6,7,11 (#334), TTKSK (04KEN156/04, Ug99), TTKST (06KEN19v3, Ug99+Sr24), QFCSC (03ND76C), TPMKC (74MN1409), TRTTF (06YEM34-1), TTKTP (13GER16-1), QCMJC (07WA140-515). Растения также инокулировали расой *P. tritricina* 104-2,3,(6),(7), 11 (#890172) и расой *P. striiformis* f. sp. *tritici* 110 E143 A+ (#861725). Типы инфекций оценивали, как описано (McIntosh, 1995).

Получение библиотеки геномной ДНК фага лямбда.

Расщепленные DraI препараты геномной ДНК из растений пшеницы линии Gabo 1DL.1RS подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле в течение ночи, вырезали область геля, содержащую фрагменты размером 9-13 т.п.н., выделяли ДНК и очищали от геля. Полученную ДНК лигировали с адаптерами BamHI и клонировали в вектор EMBL3  $\lambda$ -BamHI (Epicentre Technologies) и упаковывали с использованием упаковывающих экстрактов лямбда MaxPlax (Epicentre Technologies) по инструкциям производителя.

Библиотеку гибридизовали с зондом, полученным из LRR-кодирующей области Mla1 (B76: Mago et al., 2004) и идентифицировали и секвенировали положительные клоны.

Скрининг ВАС и анализ последовательности.

Дителосомная дополнительная линия пшеницы-ржи, содержащая хромосому IRS ржи, несущую Sr50, с генетическим фоном пшеницы cv. Chinese Spring, описана Simkova et al. (2008). Библиотеку ВАС получали из подвергнутой проточной сортировке хромосомы IRS из этой дителосомной дополнительной линии. Эту специфичную в отношении хромосомы IRS библиотеку подвергали скринингу посредством гибридизации ДНК с использованием зонда B76, как описано ниже. Положительные клоны ВАС очищали и подвергали высокоинформативному фингерпринтингу содержимого ВАС стандартными способами. ДНК ВАС получали с использованием модифицированного способа щелочного лизиса (Sinnott et al., 1998). Секвенирование концов ВАС клонов при минимальном пути перекрытия в контиге, содержащем Sr50, осуществляли с использованием праймеров, сконструированных для вектора ВАС plndigo, посредством секвенирования по Сэнгеру.

Последовательности ВАС использовали для конструирования специфичных праймеров ПЦР. Пять клонов ВАС секвенировали с использованием платформы для секвенирования Roche 454. Перекрытие последовательностей повторов, присутствующих в собранных ВАС, выявляли с использованием базы данных повторов в пшенице ([wheat.pw.usda.gov/ITMI/Repeats/blastrepeats3.html](http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/Repeats/blastrepeats3.html)).

Считывания последовательности собирали с использованием Newbler v2.3. Неповторяющиеся последовательности анализировали на гены с использованием программного обеспечения для прогнозирования генов FGENESH ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)) и GENSCAN ([genes.mit.edu/GENSCAN.html](http://genes.mit.edu/GENSCAN.html)).

ПЦР-амплификация Sr50-кандидатов.

При ПЦР-амплификации предполагаемых генов резистентности к ржавчине из Gabo 1DL.1RS-DR.A1 и различных восприимчивых мутантов M2 использовали пары праймеров, фланкирующие гены. Амплифицированные последовательности сравнивали по изменениям нуклеотидов с использованием множественного выравнивания последовательностей (CLUSTAL-European Bioinformatics Institute - [www.edi.ac.uk/Tools/sequence.html](http://www.edi.ac.uk/Tools/sequence.html)). Выделение РНК, синтез кДНК, 5'- и 3'-RACE (быструю амплификацию концов кДНК) осуществляли способами, описанными в Periyannan et al. (2013). Для анализа RT-ПЦР использовали праймеры, сконструированные для спроектированных 5'- и 3'-концов транскриптов Sr50. В случае 5'- и 3'-RACE праймеры, сконструированные для 5'- и 3'-кодирующих областей, использовали в качестве геноспецифичных праймеров.

Трансформация пшеницы.

Получали две конструкции геномной ДНК, каждая из которых содержит Sr50 и, таким образом, кодирует полипептид Sr50. Первая из них содержала фрагмент размером 7,5 т.п.н., включающий вышележащую область размером 2,4 т.п.н. и нижележащую область размером 1,38 т.п.н. относительно коди-

рующей белок области ScRGAl-A в бинарном векторе pVecBarII. Этот фрагмент амплифицировали из геномной ДНК Gabo1DL.1RS с использованием праймеров F1-R1, а затем гнездовых праймеров F2-R2, приведенных в табл. 2, и ДНК-полимеразы PfuUltra II Fusion HS (Agilent Technologies) в условиях, рекомендуемых производителем. Вторая конструкция содержала фрагмент NotI размером 9,8 т.п.н. из клона BAC 180C18, включающий вышележащую область размером 4,2 т.п.н. и нижележащую область размером 1,88 т.п.н. относительно кодирующей белок области, и встраивали в бинарный вектор pVecNeo.

Таблица 2

**Праймеры, используемые для ПЦР-амплификации Sr50,  
ScRGAl-кандидатов и концов BAC**

| Маркер               | Прямой праймер                                  | Обратный праймер                              |
|----------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Sr50-F1, R1          | TAGCGCTGCTCACATCCACCTC<br>(SEQ ID NO: 17)       | GATCCGCCGTTGTCTGGCATT<br>GT (SEQ ID NO: 18)   |
| Sr50-F2, R2          | ATTCATGCTTTTATACTCACTAAT<br>ATC (SEQ ID NO: 19) | GGGCGTGAAGTGTGCTGCTT<br>(SEQ ID NO: 20)       |
| Sr50-F3              | TTCAGTGAAGTTGCCGCTGT<br>(SEQ ID NO: 21)         |                                               |
| ScRGAl-A-VIGS        | CGACAACCTCCGGCAGATTTA<br>(SEQ ID NO: 22)        | GACAAGGATCGATAGTAATTG<br>GTTC (SEQ ID NO: 23) |
| ScRGAl-A RT-<br>qPCR | TCCACCTAAGGTACCTTGATCTAC<br>(SEQ ID NO: 24)     | GAGTTGGAACCACTTATA<br>(SEQ ID NO: 25)         |
| ScRGAl-A RT-<br>ПЦР  | GCGCTGCCTGGAATAAGGTC<br>(SEQ ID NO: 26)         | TAAAACAAAGCCGCGGAAAAC<br>(SEQ ID NO: 27)      |
| RACE 5p, 3p          | GATTCCTGCCTTTCTTAAACAAGC                        | TCGGCATGATGTCTTTGTTCG                         |

|              |                                                  |                                                |
|--------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|
|              | CGA (SEQ ID NO: 28)                              | (SEQ ID NO: 29)                                |
| p2D7-F-конец | GGCGGGCTGCTAGTATTTCC<br>(SEQ ID NO: 30)          | GCCATCGGATCTGGAGAGAA<br>(SEQ ID NO: 31)        |
| p2D7-R-конец | CGTTGCAATGATGTACCATACG<br>(SEQ ID NO: 32)        | ACCGAGCTCGTGTGCTCAA<br>(SEQ ID NO: 33)         |
| p2E7-F-конец | CAACAAGACGCACACCACCT<br>(SEQ ID NO: 34)          | GTGCAGTTGCAGAGGACCTG<br>(SEQ ID NO: 35)        |
| p2C2-F-конец | TTCGCAGGTTTCATCATGGTC<br>(SEQ ID NO: 36)         | CTCCCGAATTGGAAAGTGGA<br>(SEQ ID NO: 37)        |
| p2C2-F-конец | CCTTGGCCTTTAGCTTGTGG<br>(SEQ ID NO: 38)          | TTGCCGAAGCAAGAAGCTTT<br>(SEQ ID NO: 39)        |
| p1F7-F-конец | CGGAGTGTTTGGATGAAAGG<br>(SEQ ID NO: 40)          | CCGATCCAGGGGATATAGGT<br>(SEQ ID NO: 41)        |
| p1F7-R-конец | CTTCGTTAGGAATGGCAGGT<br>(SEQ ID NO: 42)          | CATGCCTGATTCAATGTTGC<br>(SEQ ID NO: 43)        |
| p2B8-F-конец | GCACGCATGCATGTAGTTGA<br>(SEQ ID NO: 44)          | GGGAAGCTCCTGGTTTGTG<br>(SEQ ID NO: 45)         |
| p2B8-R-конец | ATCCGTGGGAGCTGTAGGTG<br>(SEQ ID NO: 46)          | AGATGGATTGGGCTGTGGAT<br>(SEQ ID NO: 47)        |
| p2C8-F-конец | CGCTCAGTTTGCCGAAAAG (SEQ<br>ID NO: 48)           | ATCGGAGTCGTCGAGAGAG<br>(SEQ ID NO: 49)         |
| p2C8-R-конец | GGTCCCTTGCTCGTGAGTTC<br>(SEQ ID NO: 50)          | TGTGATGGTGATGCTTGTGC<br>(SEQ ID NO: 51)        |
| p2C7-F-конец | TCTGAAGCCGGTCGAGTCTTC<br>(SEQ ID NO: 52)         | GGGAGTACTAGTCTCGCATCA<br>(SEQ ID NO: 53)       |
| p2C7-R-конец | CATGGCTGCCACTCTCAAAG<br>(SEQ ID NO: 54)          | TCACGCACGTCAAGTCAAAA<br>(SEQ ID NO: 55)        |
| p2A3-F-конец | TGGTACTGTGAAAGCGATTCTTAT<br>C (SEQ ID NO: 56)    | GACGGCAAGATGGAGCAAGGA<br>(SEQ ID NO: 57)       |
| pIndigoBAC5  | GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGT<br>TGG (SEQ ID NO: 58) | CTCGTATGTTGTGTGGAATTG<br>TGAGC (SEQ ID NO: 59) |

Бинарные векторы pVecNeo и pVecBarII являются производными pWBvec8 (Wang et al., 1998), в которых промотор 35S::ген резистентности к гигромицину заменяли промотором 35S::геном селективного маркера NPTII, полученным из pCMneoSTL2 (Maas et al., 1997), или кодирующей областью гена резистентности к биалафосу (bar) в качестве селективного маркера для трансформации растения.

Трансформацию восприимчивого к стеблевой ржавчине культивара пшеницы Fielder осуществляли с использованием штамма GV3101 *Agrobacterium tumefaciens* (pMP90), как описано (Ishida et al., 2014; Richardson et al., 2014). Трансформанты T0 и растения-потомки T1, включая растения, содержащие трансген, и сегрегантов, в которых он отсутствует, используемых в качестве растений отрицательного контроля, тестировали на ответ на ржавчину с использованием штамма Pgt 98-1,2,3,5,6, как описано выше. Наличие трансгена и/или гена селективного маркера определяли посредством саузерн-блоттинга, как описано (Mago et al., 2004). Для этого ПЦР-амплифицированную последовательность из 5'-конца Sr50 использовали в качестве геноспецифического зонда. Альтернативно, можно осуществлять трансген-специфичную ПЦР для детекции трансгена.

Дрожжевой двугибридный анализ.

Эксперименты по дрожжевому двугибридному анализу осуществляли с использованием репортерного штамма Hf7c *Saccharomyces cerevisiae*. кДНК, кодирующую полноразмерный или укороченный Sr50, клонировали по участкам EcoRI-XhoI pGBKT7 и pGADT7 (Clontech). Трансформацию дрожжей осуществляли в соответствии с Gietz and Woods (2002), при этом котрансформантов подвергали селекции на средах SD без лейцина и триптофана. Анализ взаимодействия осуществляли посредством высевания дрожжевых клеток на среды без лейцина, триптофана и гистидина и инкубации чашек при 30°C в течение 3-4 дней.

Конструкции для экспрессии в растениях.

Все продукты ПЦР, используемые для клонирования, получали с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Phusion (Finnzymes) с праймерами, приведенными в табл. 2. Молекулярное клонирова-

ние осуществляли с использованием системы рекомбинации Gateway (Life Technologies) или системы сайт-специфического мутагенеза Quickchange (Stratagene). Для создания исходных клонов Gateway использовали pDONR207 (Life Technologies). Для экспериментов по инфильтрации *Agrobacterium tumefaciens* (агробактериями) использовали pBIN19-35S::GTW:3HA, pBIN19-35S::GTW:CFP (Cesari et al. 2014), pAM-PAT-35s::GTW:YFP:NLS; pAM-PAT-35s::GTW:YFP:nls; pAM-PAT-35s::GTW:YFPv: NES и pAM-PAT-35s::GTW:YFPv:nes.

Функциональный NES из ВИЧ Rev (NES: LQLPPLERLTL; SEQ ID NO: 15) и нефункциональный nes (LQAPPAERATL; SEQ ID NO: 16) (Wen et al., 1995) встраивали в вектор pAM-PAT-35s-GWY-YFPv (Bernoux et al., 2008) в конец С-конца YFPv. Фрагменты YFPv-NES/nес амплифицировали с помощью ПЦР с использованием прямого праймера, содержащего 3'-участок SmaI, и обратного праймера, содержащего 5'-участок XbaI, также последовательность NES или nes. Соответствующие продукты ПЦР лигировали в pAM-PAT-35s-GWY-YFPv, расщепленный SmaI/XbaI для замены исходных YFPv продуктами слияния YFPv-NES/nес.

Транзитория экспрессия белка и анализ гибели клеток в *N. Benthamiana*.

Для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации клеток листьев *N. benthamiana* культуры штамма GV3101 *Agrobacterium*, трансформированного с использованием генетической конструкции pMP90, выращивали в жидкой среде Лурия-Бертани, содержащей 50 мг/мл рифампицина, 15 мг/мл гентамицина и 25 мг/мл канамицина при 28°C в течение 24 ч. С помощью конструкций, обеспечивающих экспрессию NLS-, NES-, nls- и nes-слитых белков, трансформировали штамм GV3103 *A. tumefaciens* и выращивали его, как описано выше, с добавлением 25 мг/мл карбенициллина. Бактерии собирали посредством центрифугирования, ресуспендировали в инфильтрационной среде (10 mM MES, pH 5,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub> и 150 мкМ ацетосирингона) до достижения OD<sub>600</sub> нм в диапазоне от 0,5 до 1 и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре до инфильтрации листьев. Инфильтрированные растения инкубировали в вегетационных камерах в контролируемых условиях для экспериментов по коиммунопреципитации и анализов гибели клеток. Для документирования гибели клеток листья фотографировали через 3-5 дней после инфильтрации.

Конфокальная микроскопия.

Эпидермальные клетки *N. benthamiana* подвергали конфокальной микроскопии (TCS SP8; Leica) через 20 ч после инфильтрации. Специфическую флуоресценцию YFP определяли с использованием следующих спектральных характеристик: возбуждение, 488 нм; детекция, 515-545 нм. Аутофлуоресценцию хлоропластов определяли при 670-730 нм. Все изображения получали с использованием водно-иммерсионной линзы (HC PL APO 63x/1,20 W CORR CS2, Leica).

Выделение белка, вестерн-блоттинг и коиммунопреципитация.

Выделение белка из листьев *N. benthamiana* и эксперименты по коиммунопреципитации осуществляли, как описано в Cesari et al. (2014). Для иммуноблоттинга белки разделяли посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Pall). Мембраны блокировали в 5% обезжиренном молоке и обрабатывали моноклональными антителами мыши против НА или против Мус (Roche), а затем антителами козы против мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена (Pierce). Мечение определяли с использованием наборов для определения хемилюминесценции SuperSignal West Pico или Femto (Pierce). Мембраны окрашивали понсо S для подтверждения равной нагрузки.

Пример 2. Ген Sr50 кодирует уникальную специфичность резистентности, эффективную против Ug99.

Для определения того, придавал ли ген резистентности к грибам Sr50 ту же специфичность резистентности или иную специфичность резистентности, чем Sr31, растения пшеницы определенных линий, несущих один или другой из этих генов или ни один из этих генов в качестве контроля, тестировали на их реакцию на набор штаммов Pgt с разными специфичностями вирулентности, как описано в примере 1. Также тестировали мутантные растения, несущие мутации в гене Sr50; ожидали, что они будут восприимчивыми к штаммам Ptg, несущим ген авирулентности, имеющий специфичность к Sr50. Данные тестирований с инокуляцией приведены в табл. 3.

Таблица 3

Типы инфекций линий, содержащих гены Sr31 и Sr50,  
при инокуляции штаммом TTKSK Pgt (Ug99)

| Название/генотип растения               | Раса инокулята Pgt |      |       |       |
|-----------------------------------------|--------------------|------|-------|-------|
|                                         | QFCS               | TPMK | TTKSK | TTKST |
| Federation                              | 3+                 | 4    | 4     | 4     |
| Federation*4/Kavkaz Sr31                | 1                  | 1+   | 4     | 4     |
| Federation*4/Kavkaz<br>sr31 (02, 010-2) | 3+                 | 4    | 4     | 4     |
| Gabo                                    | 1-;                | 2++  | 2     | 2     |
| Gabo 1DL.1RS- DR.A1 Sr50                | ;1-                | ;1   | 1     | 1     |
| Gabo 1BL.1RS Sr50                       | ;1                 | 1    | 1     | 1     |
| Gabo 1BL.1RS sr50 (M7)                  | 0;                 | 2++  | 2     | 2     |

Результаты свидетельствуют о том, что, хотя Sr31, как и ожидали, был неэффективным в обеспечении резистентности к штаммам Ug99 Pgt (TTKSK) и их производному TTKST, ген Sr50 при генетическом фоне пшеницы сорта Gabo обеспечивал эффективную резистентность к этим штаммам, что приводило к типу инфекции 1 (табл. 3). В случае мутанта Sr50 при том же генетическом фоне (M7 в табл. 3) наблюдали фенотип (тип инфекции 2), схожий с родительской особью Gabo без гена Sr50, что свидетельствует о том, что мутация в гене Sr50 у мутанта инактивировала ген резистентности. В случае некоторых инокуляций наблюдали промежуточный фенотип инфекции у растений этих линий, это являлось результатом наличия других генов резистентности к стеблевой ржавчине при генетическом фоне Gabo, придающем частичную резистентность к производным Ug99.

Для специфического тестирования гена Sr50 штамм Pgt со спонтанной мутацией и вирулентностью к Sr50, обозначенный как 98-1,2,3,5,6 + Sr50 (доступный под регистрационным номером #130176 в Plant Breeding Institute), выделяли из отдельной пустулы, наблюдаемой после инфицирования растений Sr50 штаммом 98-1,2,3,5,6 (#781219). Инфекция ряда дифференциальных линий пшеницы, каждая из которых содержала различные гены R, подтверждала, что мутантный штамм Pgt являлся идентичным родительскому изоляту, но с вирулентностью к Sr50. Таким образом, эту пару штаммов Pgt можно использовать для специфической детекции наличия Sr50.

Генотипические и фенотипические различия между генами резистентности Sr31 и Sr50 у растений дополнительно подтверждали посредством инокуляции растений родительским Pgt и мутантным производным Pgt, 98-1,2,3,5,6 + Sr50. Родительский штамм Pgt 98-1,2,3,5,6 являлся вирулентным в отношении растений культивара Gabo, не имеющего генов резистентности к этому штамму Pgt, и авирулентным в отношении растений, содержащих отдельно Sr31 или Sr50. В отличие от этого, мутант Pgt 98-1,2,3,5,6 + Sr50 сохранял авирулентность к Sr31, но являлся вирулентным к Sr50 (табл. 4). Кроме того, родительский штамм и мутантный Pgt являлись авирулентными в отношении растений, содержащих Sr33, ортолога Sr50 пшеницы (см. ниже), а также в отношении Sr<sup>Amigo</sup> (1AL.1RS), присутствующих у растений сорта Amigo. Таким образом, делали вывод, что мутантный штамм Sr50 Pgt утрачивал активность гена авирулентности Sr50 (AvrSr50) и что ген резистентности Sr50 кодировал уникальную специфичность резистентности, которую можно отличить от других локализованных на 1RS генов резистентности к стеблевой ржавчине. Также делали вывод, что Sr50 можно отличать от других генов резистентности к стеблевой ржавчине посредством инокуляции растений другими расами Pgt.

Таблица 4

Сравнение типов инфекции у различных линий при инфицировании  
расой Pgt 98-1,2,3,5,6 и ее Sr50-мутантом

| Название/генотип растения                             | Штамм Pgt |               |
|-------------------------------------------------------|-----------|---------------|
|                                                       | 98-12357  | 98-12357+Sr50 |
| Westonia (Sr33)                                       | 2-        | 2             |
| Gabo 1DL.1RS-DR.A1 (Sr50)                             | 12=       | 3+            |
| Gabo 1BL.1RS (Sr50)                                   | 12=       | 3+            |
| Mildress (Sr31)                                       | 12=       | ;1            |
| Производное Amigo (1AL.1RS)<br>(Sr <sup>Amigo</sup> ) | 2-2       | 2-2           |

Пример 3. Физическое картирование локуса Sr50.

Mago et al. (2004) наблюдали, что с помощью зонда для гибридизации ДНК, обозначенного как B76, полученного из кодирующей области LRR гена резистентности ячменя к настоящей мучнистой росе Mla1, определяли по меньшей мере 17 гибридизующихся фрагментов в рестрицированной DraI геномной

ДНК в локусе Sr50 пшеницы и что несколько мутантов Sr50 с небольшими делециями утрачивали лишь два их этих фрагментов размером приблизительно 10 и 12 т.п.н. Для выделения гена Sr50 получали библиотеку геномной ДНК фага лямбда, как описано в примере 1, из растений линии Sr50 Gabo1BL.1RS и подвергали их скринингу. Библиотека фага лямбда содержала DraI-рестрицированные фрагменты с диапазоном размеров от 9 до 13 т.п.н. Используя гибридизационный зонд B76, из библиотеки выделяли шесть уникальных клонов и выбирали их для дальнейшего анализа (фиг. 1).

Анализ последовательности показал, что все из них кодировали родственные Mla последовательности CC-NB-LRR. Три из них содержали различные укорачивания или сдвиги рамок считывания и, таким образом, не могли кодировать полноразмерные белки CC-NB-LRR, и две из них представляли собой последовательности с некоторым сходством с областью LRR зонда B76. Шестой из них, клон 5 (фиг. 1), содержал, главным образом, полноразмерный ген без внутренних прерываний рамки считывания, но укороченный по участку DraI в LRR-кодирующей области, и, таким образом, в нем отсутствовал 3'-конец прогнозируемого гена.

Затем для улучшения физического покрытия делетированной области, включающей Sr50, использовали зонд B76 для скрининга специфической в отношении хромосомы 1RS библиотеки BAC, сконструированной из Sr50-содержащей дителосомной дополнительной линии пшеницы-ржи, как описано в примере 1. С помощью этого зонда идентифицировали 175 клонов BAC. Посредством высокоинформативного фингерпринтинга BAC их группировали на 6 неперекрывающихся контингов на основе клонов 2, 3, 11, 24, 71 и 72. 18 BAC, образующих минимальный путь перекрывания этих контингов, подвергали скринингу посредством ПЦР с использованием праймеров, специфичных для гомолога Mla в клоне лямбда 5. Таким образом, BAC p2D7 (фиг. 2) идентифицировали как содержащую эту последовательность. Продукт ПЦР также амплифицировали из четырех клонов BAC, перекрывающих p2D7, p2E7 p2B12, p2B9 и p1H3, что подтверждало наличие гена-кандидата в этом континге (фиг. 2).

Для картирования гена Sr50 и окружающего локуса в физическом континге BAC, образующие минимальный путь перекрывания из континга, подвергали секвенированию концов и ПЦР-маркеры, полученные из этих концов BAC, использовали для скрининга родительского Sr50 и мутанта M2 с делецией (00.002). Этот анализ показал, что делеция в мутанте M2 и, таким образом, ген Sr50 полностью содержались в области, охваченной 3 клонами BAC, а именно p2D7, p2A3 и p2C2, с сохранением проксимальных и дистальных концов p2D7 и p2C2 соответственно (фиг. 2).

Секвенировали эти три клон BAC, охватывающие делецию, а также BAC p2E7, полностью содержащуюся в p2D7 и смежной BAC p2C7. При аннотировании нуклеотидных последовательностей из этой области размером 250 т.п.н. идентифицировали шесть Mla-родственных кодирующих белок областей NB-LRR (открытых рамок считывания) в делетированной области и одну ORF NB-LRR в смежной области в BAC p2C7 (фиг. 2). Их обозначали как ScRGA1-A-ScRGA1-G. ORF варьировались по длине от 3,6 до 12,1 т.п.н., и каждая из них содержала один или два спрогнозированных интрона. Они кодировали спрогнозированные полипептиды с длиной в диапазоне от 944 до 974 аминокислот. В делетированной области также определяли одну копию гена ингибитора химотрипсина (Ci), гомолог которого также присутствовал в локусе Mla ячменя. Это соответствовало предыдущим анализам гибридизации ДНК, в которых идентифицировали 4 копии родственного гена Ci на 1RS, только одна из которых подвергалась делеции у промежуточных мутантов с делецией (Mago et al., 2004). Аминокислотная последовательность, кодируемая клоном лямбда 5, была на 10 0% идентичной аминокислотной последовательности ScRGA1-A, но другие клоны лямбда, идентифицированные, как описано выше, не соответствовали любому из других генов ScRGA1 в континге BAC.

Пример 4. Идентификация гена Sr50.

В дополнение к мутанту M2 с делецией, описанному выше, авторы настоящего изобретения ранее выделяли несколько полученных из EMS мутантов гена Sr50, сохранивших все из

фрагментов, гибридизующихся с B76, и, таким образом, соответствующих точечным мутациям Sr50 (Mago et al. 2004). Выделяли два мутантных растения M7 (00.007) и M13 (01.013) и получали растения-потомки. При скрещивании растений M7 и M13 не получали резистентное потомство, что свидетельствовало о том, что они несли мутацию в том же гене. Шесть генов ScRGA1, идентифицированных в делеции M2, как описано выше, амплифицировали с использованием M7 и M13, а также Gabo1DL.1RS DR.A1 и секвенировали. Один ген-кандидат из шести, а именно ScRGA1-A, содержал делецию одной пары оснований в M7 и делецию 23 п.н. в M13. Обе мутации приводили к сдвигам рамки считывания, что приводило к образованию преждевременных стоп-кодонов в ORF (фиг. 3). Все другие гены-кандидаты были идентичными по последовательности по отношению к растениям дикого типа и мутантам M7 и M13. Идентификация множества независимых мутаций в одной кодирующей области показала, что кодирующая область ScRGA1-A соответствовала гену Sr50. Этот вывод подтверждали с помощью экспериментов по трансформации (см. ниже).

Пример 5. Трансформация пшеницы с использованием генов Sr50.

Для подтверждения того, что ScRGA1-A придает Sr50-резистентность, две конструкции, содержащие этот ген, использовали для трансформации растений восприимчивого к стеблевой ржавчине культивара пшеницы Fielder, как описано в примере 1. Первая конструкция, pVecBarSr50 (SEQ ID NO: 12), со-

держала ПЦР-амплифицированную геномную последовательность ScRGA1-A размером 7,9 т.п.н., включающую нативный промотор и терминатор (2,4 и 1,4 т.п.н. соответственно) в Т-ДНК. Вторая конструкция, pVecNeoSr50 (SEQ ID NO: 11), содержала геномный фрагмент NotI размером 9,7 т.п.н. из BAC p2D7 с более крупными 5'- и 3'-областями в Т-ДНК. Таким образом, обе конструкции содержали геномную форму ScRGA1-A, включающую все из ее интронов, а также нативный промотор, но связанный с гетерологичными последовательностями в химерной конструкции Т-ДНК. Конструкции использовали для трансформации пшеницы и подтверждения тестируемых трансгенных растений и их потомства, как описано в примере 1.

Независимые трансгенные растения T0 и растения-потомки T1, содержащие Т-ДНК из pVecBarSr50, инокулировали штаммами Pgt. Трансгенные растения демонстрировали ответы на Pgt, типичные для Sr50-опосредованной резистентности, в то время как растения-сегреганты, в которых отсутствовал трансген, являлись восприимчивыми, как нетрансформированные родительские растения. Аналогично, линии пшеницы T0, трансформированные с использованием pVecNeoSr50, демонстрировали резистентность, типичную для Sr50. Для подтверждения того, что наблюдаемый фенотип резистентности являлся расо-специфическим и не являлся результатом общего усиления защитных путей, потомство T1 из четырех резистентных к стеблевой ржавчине трансгенных растений (линии 2, 10b, 13 и 19d) тестировали на их реакции на листовую ржавчину и желтую ржавчину злаков посредством инокуляции штаммами, описанными в примере 1.

Все трансгенные растения-потомки являлись такими же восприимчивыми к листовой ржавчине и желтой ржавчине злаков, что и нетрансформированные контроли. Кроме того, популяции потомства T1 демонстрировали соотношение расщепления 3:1 (резистентные:восприимчивые) по реакции на стеблевую ржавчину, что свидетельствует о менделевском наследовании инсерции одного трансгена в ядерном геноме. Комбинированные данные о мутациях и комплементации убедительно свидетельствуют о том, что ген, обозначенный как ScRGA1-A, являлся геном резистентности Sr50.

Эксперимент также показал, что ген обеспечивал резистентность к ржавчине при использовании для трансформации злакового растения. Таким образом, как будет понятно специалисту в этой области, те же или схожие конструкции (например, с разными промоторными областями) можно использовать для получения других злаковых растений (таких как рис, ячмень, кукуруза или сорго), экспрессирующих Sr50, что приводит к резистентности к одной или нескольким расам *Puccinia graminis*.

Пример 6. Структура Sr50 и сравнение с функциональными генами Mla ячменя и пшеницы.

Наличие двух прогнозируемых интронов в кодирующей белок области Sr50 подтверждали посредством RT-ПЦР и сравнения кДНК и геномных нуклеотидных последовательностей. При анализе посредством быстрой амплификации концов кДНК (RACE), осуществленном, как описано в Jordan et al. (2011), идентифицировали 5'- и 3'-UTR размером 629 и 238 п.н. соответственно, содержащие три дополнительных интрона (фиг. 3). Размеры экзонов и интронов Sr50 представлены на фиг. 3.

Спрогнозированный полипептид Sr50 являлся на 77-78% идентичным по аминокислотной последовательности по отношению к полипептидам из семейства белков MLA ячменя, некоторые из которых придают резистентность к настоящей мучнистой росе, но не резистентность к ржавчине. Филогенетический анализ гомологов Mla злаков с использованием их аминокислотных последовательностей показал, что белок Sr50 относится к одной монофилетической группе с другими полипептидами ScRGA1, а также с ортологичными белками TmMla1 и Sr33 из диплоидных видов пшеницы, *T. monosocum* и *Ae. tauschii* (фиг. 4). Степень идентичности аминокислотных последовательностей среди членов ScRGA1 находилась в диапазоне от 78 до 89%, в то время как полипептид Sr50 демонстрировал 81 и 80% идентичности по отношению к аминокислотным последовательностям TmMla1 и Sr33 соответственно. Белки резистентности к листовой ржавчине пшеницы Lr1, Lr11 и Lr21 являлись высокодивергентными в монофилетической группе Mla/Sr33/Sr50 (фиг. 4), при этом идентичность последовательности находилась в диапазоне от 19 до 33%, что свидетельствует об отсутствии родства с полипептидами резистентности к листовой ржавчине. Полипептиды резистентности к листовой ржавчине очень отличались от полипептидов резистентности к ржавчине, и их легко можно различать. Полипептид, кодируемый только другим клонированным геном резистентности к стеблевой ржавчине пшеницы, Sr35 из *T. monosocum*, демонстрировал 48% идентичности аминокислотной последовательности по отношению к Sr50.

Пример 7. Наличие гена Sr50 и его вариантов у злаков.

Для определения наличия гена Sr50 у ржи, вида-источника гена Sr50 в пшенице, 114 географически разных образцов ржи подвергали скринингу посредством ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих Sr50. ПЦР-амплификацию осуществляли с использованием ДНК-полимеразы PfuUltra II Fusion HS и олигонуклеотидных праймеров F1-R1, а затем осуществляли гнездовую ПЦР с использованием праймеров F3-R3. При этих реакциях амплификации получали продукт ПЦР размером 4,17 т.п.н., включающий весь ген Sr50.

Амплификацию последовательностей Sr50 наблюдали лишь в случае 10 из 114 образцов, что свидетельствует о наличии гена Sr50 или его близкого гомолога в этих 10 образцах. В случае пяти из этих образцов амплифицированный ген являлся идентичным Sr50, в то время как три из других образцов содержали небольшие замены, а два имели нарушения из-за инверсии последовательности. Все из этих образ-

цов ржи, за исключением Dwarf Petkus R1, демонстрировали резистентность к нескольким расам стеблевой ржавчины, включая Sr50-вирулентного мутанта, что свидетельствовало о наличии дополнительных генов Sr, которые могут располагаться на других хромосомах. Несмотря на сходство последовательности гена Sr50 у большинства из этих образцов, они содержали разные гаплотипы этого сложного локуса, что подтверждает обширную рекомбинацию в этом кластере у ржи. Sr31 и гены резистентности к желтой ржавчине Yr9 находятся в одной и той же области 1RS, а также могут принадлежать к этому семейству генов. Таким образом, по-видимому, этот локус является горячей точкой для эволюции специфичностей резистентности к грибам у злаков, включая пшеницу, ячмень и рожь.

Пример 8. Функциональный анализ полипептида Sr50.

Биспиральный домен MLA10, Sr33 и Sr50 является достаточным для индукции гибели клеток.

Предшествующий функциональный анализ N-концевой области MLA показал, что фрагмент из 225 аминокислот, включающий CC и часть доменов NB, может самоассоциироваться у дрожжей, в то время как фрагмент из 160 аминокислот, содержащий только домен CC, являлся аутоактивным при передаче сигнала гибели клеток у растений. Фрагмент из 120 аминокислот, являвшийся укороченным доменом CC, мог димеризоваться *in vitro* (Maekawa et al., 2011; Bai et al., 2012).

Для исследования того, функционировали ли ортологи Sr33 и Sr50 пшеницы и ржи аналогично MLA, и для определения минимальной функциональной области при передаче сигнала гибели клеток различные N-концевые фрагменты полипептидов Sr50 и Sr33 подвергали слиянию с C-концевой HA- или CFP-меткой. Эти слитые полипептиды транзитивно экспрессировали в клетках листьев *N. benthamiana* под контролем промотора 35S, как описано в примере 1. Конструкции, экспрессировавшие полные домены CC Sr33 и Sr50, а именно аминокислоты 1-160 и 1-163 соответственно, запускали сильный ответ с гибелью клеток листьев, видимый через 40 ч после инфильтрации агробактериями в виде некроза ткани листьев в инфильтрированных зонах.

Аналогично предыдущим результатам (Maekawa et al., 2011; Bai et al., 2012), соответствующая доменная форма MLA ячменя, MLA101-160, также индуцировала сильный ответ с гибелью клеток, видимый в пределах 24 ч при экспрессии в клетках листьев *N. benthamiana*. Другая конструкция, полученная для экспрессии слитого белка положительного контроля, аутоактивный CC-NB-LRR RGA4 риса (Cesari et al., 2014), также приводила к сильному ответу с гибелью клеток, в то время как мутантный вариант RGA4 не вызывал ответ в клетках листьев *N. benthamiana*. Экспрессия доменов CC вместе с частью доменов NB Sr33 (1-225), Sr50 (1-228) и MLA10 (1-225) также запускала сильный ответ с гибелью клеток. Однако укороченные домены CC MLA10 (1-120), Sr33 (1-120) и Sr50 (1-123), слитые с HA-меткой, не индуцировали гибель клеток в *N. benthamiana*. Анализ вестерн-блоттинга показал, что все слитые белки правильно экспрессировались в клетках листьев.

В целом, эти результаты свидетельствуют о том, что полные домены CC MLA10, Sr33 и Sr50 являлись необходимыми и достаточными для индуцирования передачи сигнала гибели клеток, и хотя укороченный домен CC MLA10 димеризовался в растворе, и его кристаллическая структура разрешена (Maekawa et al., 2011), его было недостаточно для запуска ответа с гибелью клеток. Эти данные свидетельствовали о том, что функцией домена CC в каждом полипептиде являлся запуск индукции гибели клеток, ассоциированной с резистентным ответом в стволовых клетках пшеницы в присутствии патогена.

Биспиральные домены of Sr33, Sr50 и Lr21 образуют гомо-комплексы.

Хотя укороченный фрагмент MLA10 CC5-120 был способен самоассоциироваться в растворе с образованием димера, показано, что только домен MLA10 CC-NB1-225 взаимодействовал сам с собой при тестировании с использованием дрожжевого двугибридного анализа (Maekawa et al., 2011). Такое взаимодействие не было показано в случае минимального активного домена CC1-160. Таким образом, осуществляли эксперименты с использованием дрожжевой двугибридной системы для тестирования на взаимодействие между укороченным CC, CC и фрагментами CC-NB MLA10 и Sr50. Иммуноблоттинг показал, что в ходе экспериментов все фрагменты белков экспрессировались в дрожжевых клетках. Результаты свидетельствуют о том, что полные домены CC MLA10 и Sr50 являлись необходимыми для самоассоциации в дрожжах, в то время как не определяли взаимодействия в случае укороченных доменов CC этих белков.

Для определения того, ассоциировались ли активные домены CC MLA10, Sr33 и Sr50 сами с собой в растениях, комбинации HA- и CFP-меченых доменов MLA10, Sr33 и Sr50 коэкспрессировали в клетках листьев *N. benthamiana* и осуществляли анализы коиммунопреципитации. Домен CC1-284 неродственно-го полипептида резистентности Lr21, как известно, аутоактивного в растениях, также включали в эксперимент для тестирования его способности взаимодействовать с собой. Домен CC RGA4 (аминокислоты 1-171), слитый с CFP, использовали в качестве контроля для специфичности связывания. Иммуноблоттинг с использованием антител против GFP и против HA показал, что все полипептиды экспрессировались, как и предполагали, за исключением слитых полипептидов MLA10, что, вероятно, являлось результатом более быстрого ответа с гибелью клеток, индуцируемого этими полипептидами и их последующей деградацией в клетках. Иммунопреципитацию использовали для анализа на ассоциацию коэкспрессирующихся полипептидов. Иммунопреципитация с использованием антител против GFP привела к обогащению всех CFP-слитых белков и Sr331-160:HA, Sr501-163:HA и Lr211-284:HA, специфически копре-

ципитировавших с Sr331-160:CFP, Sr501-163:CFP и Lr211-284:CFP, соответственно, но не с RGA41-171:CFP. В целом, эти результаты свидетельствуют о том, что домены CC Sr33, Sr50 и Lr21 были способны образовывать специфические гомо-комплексы в растениях, т.е. могли самоассоциироваться.

Цитоплазматическая локализация биспиральных доменов MLA10, Sr33 и Sr50 необходима для индукции гибели клеток.

Показано, что полноразмерный полипептид MLA10 и его домен CC-NB1-225 запускает передачу сигнала гибели клеток при локализации в цитоплазме клеток листьев *N. benthamiana* (Bai et al., 2012). Для определения того, может ли более короткий домен CC1-160 MLA10, как считают, необходимый для индукции гибели клеток, сам по себе индуцировать гибель клеток при локализации в цитоплазме, и для тестирования этого признака в случае доменов CC Sr33 и Sr50, эти домены транзитивно экспрессировали в *N. benthamiana* слитыми с YFP вместе с сигналом ядерной локализации (NLS), мутантным NLS (nls), сигналом ядерного экспорта (NES) или мутантным NES (nes). После экспрессии слитых с YFP:NLS доменов CC специфическую флуоресценцию YFP определяли исключительно в ядрах клеток *N. benthamiana*. В отличие от этого, домены CC, слитые с YFP:NES, эффективно выходили из ядер, при этом флуоресценцию YFP определяли в цитозоле, и она лишь окружала ядро, в то время как в случае мутантных вариантов nls и nes определяли флуоресценцию YFP в цитозоле и ядре, как и предполагали. Анализы гибели клеток в клетках листьев *N. benthamiana* показали, что преднамеренная ядерная локализация всех доменов CC снижала их активность, приводящую к гибели клеток. Другие слитые полипептиды с YFP:NES, YFP:nes или YFP:nls не влияли на активность индукции гибели клеток доменами CC MLA10 или Sr33. В случае домена CC Sr50, мутант nls также демонстрировал некоторое снижение активности, приводящей к гибели клеток, относительно слитых полипептидов NES и nes. Экспрессию белка с использованием всех конструкций подтверждали посредством иммуноблоттинга. В случае слитых конструкций NES последовательно наблюдали более низкое накопление белка.

Несмотря на это, эти конструкции приводили к фенотипу наиболее сильной гибели клеток (гиперчувствительный ответ, HR), что позволяет предполагать, что гибель клеток и деградация белка уже активировались на момент забора образцов. Эти результаты свидетельствовали о том, что цитозольная локализация этих доменов CC была необходима для индукции гибели клеток.

#### Пример 9. Обсуждение.

Резистентность к настоящей мучнистой росе и ржавчине кодируется генами Mla.

Гены CC-NB-LRR из монофилетической группы генов Mla, исходно идентифицированные на хромосоме 1HS у ячменя в качестве гена резистентности к настоящей мучнистой росе, также встречаются у пшеницы, ортологи которой включают ген резистентности к настоящей мучнистой росе TmMla1 (Jordon et al., 2011) и ген резистентности к стеблевой ржавчине Sr33 (Periyannan et al., 2013). Гены представляют собой небольшое семейство генов из приблизительно пяти членов у пшеницы и ячменя. Гель-блоттинг ДНК показал, что это семейство, в значительной степени, охватывает более 20 членов на хромосоме 1RS у ржи (Mago et al., 2004). Эксперименты, описанные выше, показали, что ген резистентности к стеблевой ржавчине Sr50 является членом семейства ортологических генов Mla ржи.

Хотя ранее выделяли гены резистентности пшеницы к стеблевой ржавчине Sr33 и Sr35 (Periyannan et al., 2013; Saintenac et al., 2013), происходящие из пшеницы, ген Sr50 являлся первым клонированным геном резистентности к стеблевой ржавчине, происходящим из ржи и эффективным против всех известных полевых рас Pgt, включая Ug99. При картировании высокого разрешения и исследованиях мутаций Sr31 и ген резистентности к желтой ржавчине Yr9 из 1RS ржи Petkus также помещали в область, гомологичную Sr50 (Mago et al., 2005), что позволяет предполагать, что эти гены также могут принадлежать к семейству генов Mla. Таким образом, этот многовидовой локус, по-видимому, является горячей точкой для эволюции специфичности резистентности у злаков.

Субклеточная локализация белков NB-LRR и активация гибели клеток.

Повышение уровня знаний о локализации белков NB-LRR показало, что их можно наблюдать и активировать в широком диапазоне клеточных компартментов. Некоторые из них являются исключительно ядерными, такими как RRS1 (Deslandes et al., 2003; Tasset et al., 2010), в то время как другие, подобные RGA4 и RGA5, в основном локализуются в цитозоле (Cesari et al., 2014). Rpm1 (Gao et al., 2011), RPS2 (Axtell and Staskawicz, 2003) и RPS5 (Qi et al., 2012) локализуются в плазматической мембране, и белки L6 и M льна находятся на мембране аппарата Гольджи и тонопласта соответственно (Takemoto et al., 2012). Однако у многих наблюдают ядерно-цитоплазматическую локализацию, таких как N (Burch-Smith et al., 2007; Caplan et al., 2008), RPS4 (Wirthmueller et al., 2007), SNC1 (Cheng et al., 2009), Pik1/Pik2 (Zhai et al., 2014), Rx (Slootweg et al., 2010) и MLA10 (Shen et al., 2007).

В случае картофеля полипептид CC-NB-LRR Rx запускает распознавание белка оболочки (CP) вируса картофеля X (PVX), и показано, что CP активирует Rx в цитоплазме, и преднамеренная ядерная локализация Rx, в значительной степени, нарушала резистентность к вирусу и гибель клеток (Slootweg et al., 2010; Tameling et al., 2010). Однако выход Rx из ядра лишь умеренно снижал резистентность PVX (Slootweg et al., 2010), что позволяет предполагать, что цитозольная совокупность являлась наиболее важной, хотя ядерная и цитоплазматическая совокупности белков резистентности могут вносить свой вклад в передачу сигнала резистентности. И наоборот, другое исследование MLA10 показало, что лока-

лизованный в ядре рецептора было достаточно для придания резистентности к *B. graminis* в транзиторном анализе отдельных клеток ячменя, в то время как вышедшего MLA10 из ядра нет (Shen et al., 2007). Однако преднамеренная ядерная локализация аутоактивных вариантов белка MLA нарушала индукцию гибели клеток, в то время как вышедших из ядра вариантов было достаточно для запуска резистентности (Bai et al., 2012). Для объяснения этого предложена гипотеза о том, что запущенная MLA10 передача сигнала гибели клеток и передача сигнала резистентности к заболеванию происходят в разных компартаментах (Bai et al., 2012). Альтернативно, распознавание AVR<sub>MLA10</sub> может происходить исключительно в ядре, что позволяет объяснить необходимость локализованного в ядре рецептора для придания резистентности, при этом последующие события передачи сигнала, вероятно, происходят в цитоплазме.

Sr33 и, как показано в экспериментах, описанных выше, Sr50 являются гомологами MLA10, и, используя их минимальные сигнальные домены CC, наблюдали схожий паттерн индукции гибели клеток относительно гибели клеток, запускаемой полноразмерным белком MLA10 или доменом CC-NB MLA10 (Bai et al., 2012). Таким образом, оказалось, что ответы, запускаемые MLA10 в ячмене и его близким гомологом в пшенице, являлись схожими, что позволяет предполагать наличие консервативного пути гибели клеток, запускаемой различными патогенами в двух разных видах злаков.

Специалистам в этой области понятно, что можно осуществлять множество вариантов и/или модификаций настоящего изобретения, как показано в конкретных вариантах осуществления, без отклонения от сущности или объема изобретения, как описано. Таким образом, представленные варианты осуществления следует считать во всех смыслах иллюстративными, а не ограничивающими.

По заявке на данное изобретение испрашивается приоритет на основании заявки AU 2015904976, зарегистрированной 1 декабря 2015 г., полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Все публикации, обсуждаемые и/или упомянутые в настоящем описании, включены в настоящее описание в полном объеме.

Любое обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей или т.п., включенное в настоящее описание, представлено исключительно в целях обеспечения контекста для настоящего изобретения. Это не следует воспринимать как признание того, что любые или все из этих материалов образуют часть предшествующего уровня техники или являются общим уровнем знаний в области, к которой относится настоящее изобретение, в том виде, в котором оно существовало до даты приоритета для каждого пункта формулы изобретения в настоящей заявке.

## Ссылки

- Abdullah et al. (1986) *Biotechnology* 4:1087.
- Axtell and Staskawicz (2003) *Cell* 112:369-377.
- Bai et al. (2012) *PLoS Pathog* 8(6): e1002752.  
doi:10.1371/journal.ppat.1002752.
- Bam et al. (2008) *Proc S Afr Sug Technol Ass* 81:508-512.
- Barker et al. (1983) *Plant Mol. Biol.* 2: 235-350.
- Bernoux et al. (2008) *Plant Cell* 20:2252-2264.
- Bevan et al. (1983) *Nucl. Acid Res.* 11: 369-385.
- Burch-Smith et al. (2007) *PLoS Biol* 5: e68.
- Cadwell and Joyce (1992) *PCR Methods Appl.* 2:28-33.
- Capecchi (1980) *Cell* 22:479-488.
- Caplan et al. (2008) *Cell* 132:449-462.
- Césari et al. (2014) *EMBO J* 33:1941-1959.
- Chakraborty et al. (2011) *Euphytica* 179:19-32.
- Cheng et al. (1996) *Plant Cell Rep.* 15:653-657.
- Cheng et al. (2009) *Plant Cell* 21:2503-2516.
- Clapp (1993) *Clin. Perinatol.* 20:155-168.
- Cloutier et al. (2007) *Plant Mol Biol* 65:93-106.
- Coco et al. (2001) *Nature Biotechnology* 19:354-359.
- Coco et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20:1246-1250.
- Comai et al. (2004) *Plant J* 37: 778-786.
- Cooley et al. (2000) *Plant Cell* 12:663-676.
- Cramer et al. (1998) *Nature* 391:288-291.
- Curiel et al. (1992) *Hum. Gen. Ther.* 3:147-154.
- Deslandes et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8024-8029.
- Duplessis et al. (2011) *Proc Natl Acad Sci USA* 108:9166-9171.
- Eggert et al. (2005) *Chembiochem* 6:1062-1067.
- Eglitis et al. (1988) *Biotechniques* 6:608-614.
- Ellis et al. (2014) *Frontiers in Plant Science* 5:641.
- Enkhbayar et al. (2004) *Proteins* 54:394-403.
- Feuillet et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci* 100:15253-15258.
- Fujimura et al. (1985) *Plant Tissue Cultural Letters* 2:74.
- Gao et al. (2011) *Proc Natl Acad Sci USA* 108:7619-7624.

- Garfinkel et al. (1983) *Cell* 27: 143-153.
- Gietz and Woods (2002) *Meth. Enzymol.* 350:87-96.
- Graham et al. (1973) *Virology* 54:536-539.
- Grant et al. (1995) *Plant Cell Rep.* 15:254-258.
- Greve (1983) *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 499-511.
- Harayama (1998) *Trends Biotechnol.* 16:76-82.
- Hellinga (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:10015-10017.
- Henikoff et al. (2004) *Plant Physiol* 135: 630-636.
- Hinchee et al. (1988) *Biotech.* 6:915
- Huang et al. (2003) *Genetics* 164:655-664.
- Ishida et al. (2014) Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature wheat embryos. In Wang (ed.) *Agrobacterium protocols: Volume 1, Methods in Molecular Biology*, vol. 1223. Springer, New York.
- Jézéquel et al. (2008) *Biotechniques* 45:523-532.
- Jin and Singh (2006) *Plant Dis* 90:476-480.
- Jordan et al. (2011) *Plant J* 65:610-621.
- Joshi (1987) *Nucl. Acid Res.* 15: 6643-6653.
- Kerber and Dyck (1979) Resistance to stem and leaf rust of wheat in *Aegilops squarrosa* and transfer of a gene for stem rust resistance to hexaploid wheat. P.358-364. In S. Ramanujam (ed.) *Proc. 5th Int. Wheat Genet Symp*, New Delhi, India, 23-28 Feb 1978.
- Krattinger et al. (2009) *Science* 323:37-395.
- Langridge et al. (2001) *Aust. J. Agric. Res.* 52: 1043-1077.
- Lemieux (2000) *Current Genomics* 1: 301-311.
- Leung et al. (1989) *Technique* 1:11-15.
- Lu and Berry (2007) *Protein Structure Design and Engineering, Handbook of Proteins* 2: 1153-1157.
- Lu et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178: 2089-2096.
- Maas et al. (1997) *Mol. Breed* 3:15-28.
- Maekawa et al. (2011) *Cell Host Microbe* 9:187-199.
- Mago et al. (2004) *Genome* 47, 112-121.
- Mago et al. (2005) *Theor Appl Genet* 112: 41-50.
- Mago et al. (2009) *Theor Appl Genet* 124:65-70.
- McIntosh et al. (1995) *Wheat rusts: an atlas of resistance*

- genes (CSIRO Publishing, 1995).
- Medberry et al. (1992) Plant Cell 4: 185-192.
- Medberry et al. (1993) Plant J. 3: 619-626.
- Meyers et al. (1999) Plant Journal 20:317-332.
- Michelmore and Meyers (1998) Genome Res. 8:1113-1130.
- Needleman and Wunsch (1970) J. Mol Biol. 45:443-453.
- Ness et al. (2002) Nature Biotechnology 20:1251-1255.
- Niedz et al. (1995) Plant Cell Reports 14: 403-406.
- Olson et al. (2013) Theor Appl Genet (DOI 10.1007/s00122-013-2045-5).
- Ostermeier et al. (1999) Nature Biotechnology 17:1205-1209.
- Ow et al. (1986) Science 234: 856-859.
- Pan et al. (2000) J. Mol. Evol. 50:203-2013.
- Periyannan et al. (2013) Science 341:786-788.
- Prasher et al. (1985) Biochem. Biophys. Res. Comm. 126: 1259-68.
- Qi et al. (2012) Plant Physiology 158:1819-1832.
- Richardson et al. (2014) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 119:647-659.
- Rogowsky et al. (1991) Theor Appl Genet 82:537-544.
- Salomon et al. (1984) EMBO J. 3: 141-146.
- Saintenac et al. (2013) Science 341:783-786.
- Seeholzer et al. (2010) Mol Plant Microbe Interact 23:497-509.
- Shen et al. (2007) Science 325:1098-103.
- Shepherd, K.W. in Proceedings of the 4th International Wheat Genetics Symposium, Columbia, Missouri, USA (eds Sears E.R. & Sears L.M.S.). 745-760 (University of Missouri, 1973).
- Sieber et al. (2001) Nature Biotechnology 19:456-460.
- Simkova et al. (2008) BMC Genomics. 9:237.
- Singh et al. (2011) Annu Rev Phytopathol 49:465-481.
- Sinnett et al. (1998) BioTechniques 24:752-754.
- Slade and Knauf (2005) Transgenic Res. 14: 109-115.
- Slootweg et al. (2010) Plant Cell 22:4195-4215.
- Stalker et al. (1988) Science 242:419-423.
- Stemmer (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751.

- Stemmer (1994b) Nature 370(6488):389-391.
- Takemoto et al. (2012) Mol Plant Microbe Interact 25:379-392.
- Tameling et al. (2002) Plant Cell 14:2929-2939.
- Tameling et al. (2010) Plant Cell 22:4176-4194.
- Tasset et al. (2010) PLoS Pathog 6(11): e1001202.  
doi:10.1371/journal.ppat.1001202.
- Thillet et al. (1988) J. Biol. Chem. 263:12500.
- Toriyama et al. (1986) Theor. Appl. Genet. 205:34.
- Traut (1994) Eur. J. Biochem. 222:9-19.
- Volkov et al. (1999) Nucleic Acids Research 27:e18.
- Wagner et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6099-6103.
- Wang et al. (1998) Acta. Hort. 461:401-405.
- Wang et al. (2011) New Phytologist. 191: 418-431.
- Wei et al. (1999) Genetics 153:1929-1948.
- Wei et al. (2002) Plant Cell 14:1903-1917.
- Wen et al. (1995) Cell 82:463-473.
- Wirthmueller et al. (2007) Curr Biol 17:2023-2029.
- Zeller, F.J. in Proceedings of the 4th International Wheat Genetics Symposium, Columbia, Missouri, USA (eds Sears E.R. & Sears L.M.S.). 209-221 (University of Missouri, 1973).
- Zeller and Fuchs (1983) Z. PflZucht 90:285296.
- Zhai et al. (2014) PLoSONE 9:e98067.  
doi:10.1371/journal.pone.0098067.
- Zhao et al. (1998) Nature Biotechnology 16:258-261.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Генетически модифицированное растение, содержащее ген, кодирующий полипептид Sr50, который содержит аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, которая имеет по меньше 90% идентичность последовательности SEQ ID NO:1, где полипептид придает резистентность к одной или нескольким расам *Puccinia graminis* по сравнению с изогенным растением, у которого отсутствует генетическая модификация.

2. Растение по п.1, где *Puccinia graminis* является *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, таким как раса из группы Ug99.

3. Растение по п.1 или 2, где:

i) полипептид содержит аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1; и/или

ii) полипептид кодируется полинуклеотидом, который содержит нуклеотиды, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 10, или последовательность, гибридизующуюся с SEQ ID NO: 10.

4. Растение по любому из пп.1-3, где полипептид содержит один, несколько или все из биспирального домена (CC), нуклеотид-связывающего домена (NB) и домена богатых лейцином повторов (LRR).

5. Растение по любому из пп.1-4, к которому применимо одно или несколько из следующего:

i) растение является злаковым растением, таким как растение пшеницы;

ii) растение содержит один или несколько экзогенных полинуклеотидов, кодирующих другой полипептид резистентности к патогену растений;

iii) растение является гомозиготным по генетической модификации;

iv) растение выращивают в поле.

6. Способ идентификации полинуклеотида, кодирующего полипептид, придающий резистентность к *Puccinia graminis*, включающий:

i) получение полинуклеотида, функционально связанного с промотором, кодирующего полипептид, содержащий аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1;

ii) встраивание полинуклеотида в растение;

iii) определение того, модифицирован ли уровень резистентности к *Puccinia graminis* относительно изогенного растения, в котором отсутствует полинуклеотид; и

iv) селекцию полинуклеотида, который при экспрессии придает резистентность к *Puccinia graminis*.

7. Способ по п.6, где полинуклеотид содержит нуклеотиды, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 10, или последовательность, гибридизующуюся с SEQ ID NO: 10.

8. Способ по п.6 или 7, где растение является злаковым растением, таким как растение пшеницы.

9. Способ по любому из пп.6-8, где стадия ii) дополнительно включает стабильное встраивание полинуклеотида, функционально связанного с промотором, в геном растения.

10. Очищенный и/или рекомбинантный полипептид Sr50 резистентности растения к *Puccinia graminis*, который содержит аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1.

11. Выделенный и/или экзогенный полинуклеотид, кодирующий полипептид по п.10.

12. Химерный вектор, содержащий полинуклеотид по п.11.

13. Способ получения трансгенного растения по любому из пп.1-5, включающий стадии:

i) встраивание полинуклеотида по п.11 и/или вектора по п.12 в клетку растения;

ii) регенерация трансгенного растения из клетки.

14. Способ получения растения, в геном которого встроен полинуклеотид, кодирующий полипептид, придающий резистентность к *Puccinia graminis*, включающий стадии:

i) скрещивание двух родительских растений, где по меньшей мере одно растение содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид Sr50, который содержит аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1, и который придает резистентность к *Puccinia graminis*;

ii) скрининг одного или нескольких растений-потомков от скрещивания на наличие или отсутствие полинуклеотида;

iii) селекция растения-потомка, содержащего полинуклеотид, таким образом, получения растения.

15. Способ идентификации растения, содержащего полинуклеотид, кодирующий полипептид, придающий резистентность к *Puccinia graminis*, включающий стадии:

i) получение образца нуклеиновой кислоты из растения;

ii) скрининг образца на наличие или отсутствие полинуклеотида, представленного в п.11, где наличие полинуклеотида свидетельствует о том, что растение является резистентным к *Puccinia graminis*.

16. Часть растения по любому из пп.1-5.

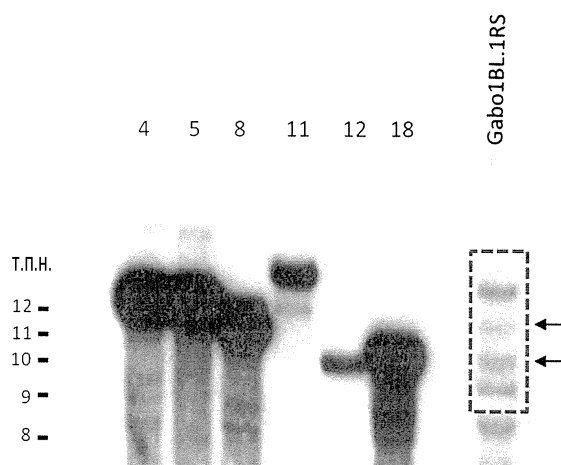
17. Часть растения по п.16, являющаяся семенем, которое имеет генетическую модификацию.

18. Способ получения муки, цельнозерновых продуктов или крахмала, включающий:

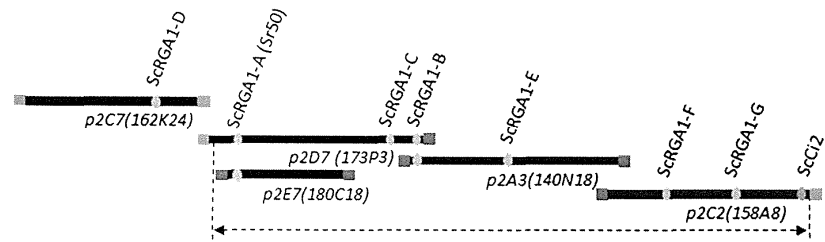
a) получение семян по п.17;

b) получение муки, цельнозерновых продуктов или крахмала.

19. Применение растения по любому из пп.1-5 или его части в качестве корма для животных или для получения пищи для потребления животными или пищи для потребления человеком.



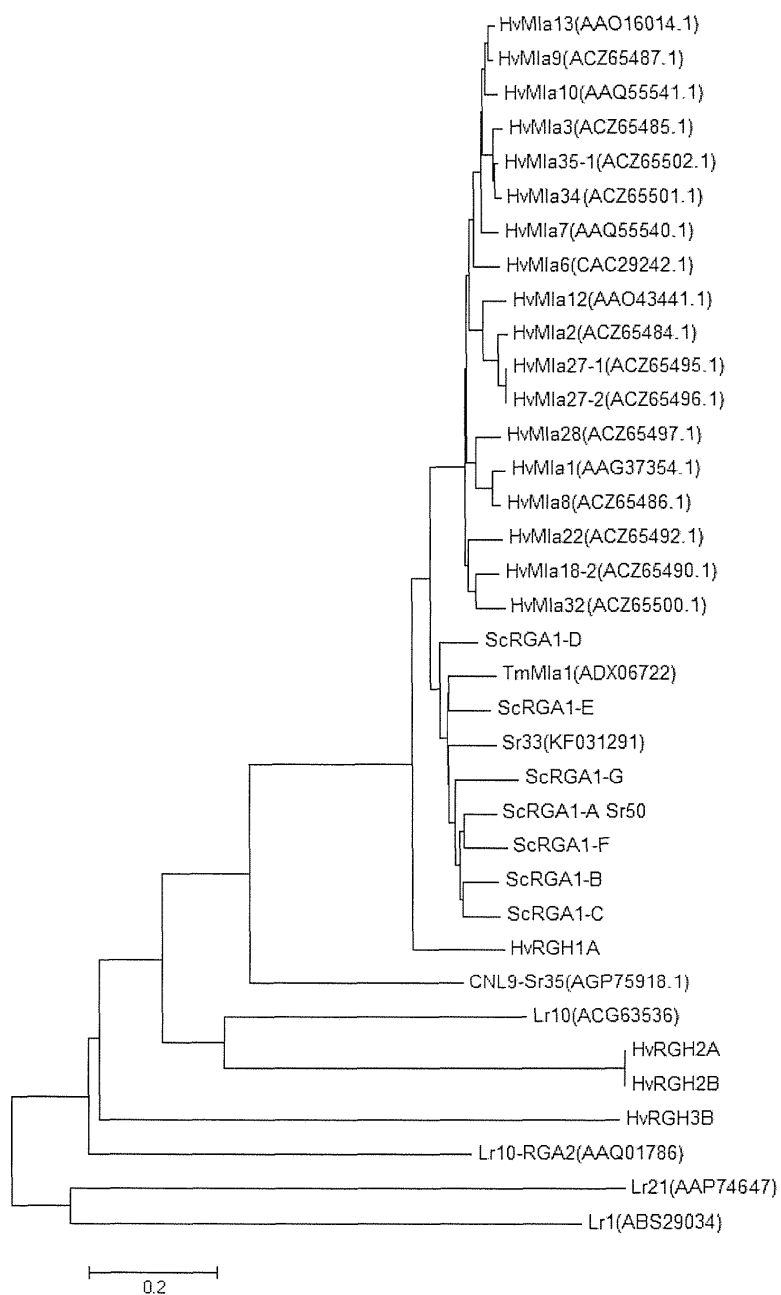
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2