

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037614**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.04.21**

(51) Int. Cl. **C07K 14/415** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201890980**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.10.14**

---

### (54) ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ МАИСА С ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К СЕВЕРНОЙ ПЯТНИСТОСТИ ЛИСТЬЕВ

---

(31) **62/242,691**

(32) **2015.10.16**

(33) **US**

(43) **2018.11.30**

(86) **PCT/US2016/057081**

(87) **WO 2017/066597 2017.04.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ПАЙОНИР ХАЙ-БРЕНД  
ИНТЕРНЭШНЛ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Хоу Чжэнлинь, Леонард Эйприл  
Линн, Ли Байлинь, Табор Гирма М.  
(US)**

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

(56) P.S. SCHNABLE ET AL.: "The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics", SCIENCE, vol. 326, no. 5956, 20 November 2009 (2009-11-20), pages 1112-1115, XP055335645, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1178534 abstract -& Schnable: "A0A096THR4", 26 November 2014 (2014-11-26), XP055335643, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/A0A096THR4.txt?version=1> [retrieved on 2017-01-16] the whole document

-& Anonymous: "UPI000220E9DC", 19 March 2013 (2013-03-19), XP055335638, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.uniprot.org/uniparc/UPI000220E9DC> [retrieved on 2017-01-16] the whole document

WO-A1-2014036048

WO-A2-2008021225

US-A1-2010095395

(57) В данном документе предусмотрены композиции и способы получения растений маиса, которые проявляют устойчивость к северной пятнистости листьев. Предусмотрены выделенные полинуклеотиды, кодирующие полипептид, который придает устойчивость к северной пятнистости листьев, полинуклеотидные конструкции, содержащие таковые, и растения маиса, содержащие полинуклеотидные конструкции. Способы включают обеспечение экспрессии выделенного полинуклеотида в клетке маиса с помощью стандартных способов трансформации и получение растения маиса из указанной клетки маиса.

**B1**

**037614**

**037614**

**B1**

### Ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/242691, поданной 16 октября 2015 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям и способам, применяемым для получения растений маиса с повышенной устойчивостью к северной пятнистости листьев.

### Ссылка на перечень последовательностей, представленный в электронном виде

Официальная копия данного перечня последовательностей представлена в электронном виде с помощью EFS-Web как отформатированный в ASCII перечень последовательностей в файле с названием 20160928\_BB2396PCT\_SequenceListing.txt, созданном 28 сентября 2016 г. и имеющем размер 65 килобайт, и подана одновременно с описанием. Перечень последовательностей, содержащийся в отформатированном в ASCII документе, является частью описания и включен в данный документ с помощью ссылки во всей своей полноте.

### Предпосылки изобретения

Северная пятнистость листьев (NLB), вызываемая патогенным грибом *Exserohilum turcicum* (ранее называемым *Helminthosporium turcicum*), представляет собой серьезное сосудистое заболевание листьев маиса во многих тропических условиях и умеренных условиях окружающей среды. Симптомы могут различаться от поражений в форме сигары на нижних листьях до полного разрушения листовой поверхности, вследствие этого снижается размер площади листовой поверхности, доступной для фотосинтеза. Снижение фотосинтетической способности приводит к недостатку углеводов, необходимых для налива зерна, что влияет на урожай зерна. Области средних широт тропиков на высоте приблизительно 900-1600 м над уровнем моря характеризуются особенно благоприятным климатом для северной пятнистости листьев благодаря длительным периодам присутствия росы и умеренным значениям температуры. Однако северная пятнистость листьев может также приводить к потерям урожая на 30-50% в условиях окружающей среды с умеренными значениями температуры, как, например, в Соединенных Штатах Америки во время периода дождей, особенно если инфекция располагается на верхних листьях растения до стадии выметывания пестичных столбиков.

Наиболее эффективным и наиболее предпочтительным способом контроля северной пятнистости листьев является выращивание устойчивых гибридов. В природе существует несколько разновидностей или рас *Exserohilum turcicum*, что предоставляет фермерам два варианта с применением гибридов: частично устойчивые гибриды, у которых обеспечивается широкий спектр защиты от многих рас на низком уровне; и гибриды, устойчивые по отношению к определенным расам, у которых обеспечивается защита от определенной расы. Были описаны генетические источники устойчивости к *Exserohilum turcicum*, и были идентифицированы четыре локуса устойчивости к *Exserohilum turcicum*: Ht1, Ht2, Ht3 и Htn1. Ген Ht1 локализуется на длинном плече хромосомы 2, где он является сцепленным с umc36 (Coe, E.H. et al. (1988), *Corn and Corn Improvement*, 3rd edn., pp. 81-258), sgr506 (Gupta, M. et al. (1989) *Maize Genet. Coop. Newsl.* 63, 112), umc150B (Bentolila, S. et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.*, 82:393-398) и pic18a (Collins et al. (1998) *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11:968-978), и при том он близко расположен к umc22 и umc122 (Li et al. (1998) *Hereditas*, 129:101-106). Ген Ht2 локализуется на длинном плече хромосомы 8 в интервале umc48-umc89 (Zaitlin et al. (1992) *Maize Genet. Coop. Newsl.*, 66, 69-70), и ген Ht3 локализуется на хромосоме 7 возле bnlgl666 (Van Staden, D et al. (2001) *Maize Genetics Conference Abstracts* 43:P134). Ген Htn1 локализуется на хромосоме 8 примерно на 10 cM дистальнее по отношению к Ht2 и на 0,8 cM дистальнее маркера RFLP umc117 (Simcox and Bennetzen (1993) *Maize Genet. Coop. Newl.* 67, 118-119; Simcox and Bennetzen (1993) *Phytopathology*, 83:1326-1330).

Способы контроля северной пятнистости листьев путем снижения количества инокулята грибов требуют дополнительного времени и ресурсов со стороны фермера и, кроме того, могут оказывать пагубные воздействия на окружающую среду. Это делает выращивание устойчивых гибридов еще более привлекательным для фермеров и широкой общественности. Таким образом, желательно обеспечить композиции и способы получения растений маиса с повышенной устойчивостью к северной пятнистости листьев.

### Краткое описание изобретения

В данном документе представлены композиции и способы получения растений маиса, проявляющих устойчивость к северной пятнистости листьев, будь то вновь приобретенная устойчивость или повышенная устойчивость.

В данном документе представлены выделенные полинуклеотиды, которые можно применять для получения растений маиса, которые проявляют устойчивость к северной пятнистости листьев. Выделенный полинуклеотид может быть выбран из группы, состоящей из: (a) нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1 (cDNA PH4GP), SEQ ID NO: 3 (cDNA PH1W2) или SEQ ID NO: 9 (геномная последовательность PH4GP); (b) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид CC-NB-LRR, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности по сравнению с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 на основании способа выравнивания

CLUSTAL W с параметрами по умолчанию; (с) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид CC-NB-LRR, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности при сравнении с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 на основании способа выравнивания CLUSTAL W с параметрами по умолчанию, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 10; и (d) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид CC-NB-LRR, имеющий последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

Также предусмотрены полинуклеотидные конструкции, содержащие выделенные полинуклеотиды, где выделенный полинуклеотид функционально связан с промотором.

Полинуклеотидная конструкция может дополнительно содержать одну или несколько гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептид, выбранный из группы, состоящей из полипептида, придающего устойчивость к заболеваниям; полипептида, придающего устойчивость к гербицидам; полипептида, придающего устойчивость к насекомым; полипептида, связанного с метаболизмом углеводов; полипептида, связанного с метаболизмом жирных кислот; полипептида, связанного с метаболизмом аминокислот; полипептида, связанного с развитием растений; полипептида, связанного с регуляцией роста растений; полипептида, связанного с улучшением урожайности; полипептида, связанного с устойчивостью к засухе; полипептида, связанного с холодоустойчивостью; полипептида, связанного с теплоустойчивостью, и/или полипептида, связанного с солеустойчивостью, где одна или несколько гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты функционально связаны с промотором. Например, полипептидом, придающим устойчивость к заболеваниям, может быть полипептид, который придает устойчивость к северной пятнистости листьев (NLB), который дополнительно может иметь аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности при сравнении с SEQ ID NO: 11 или 12 на основании способа выравнивания CLUSTAL W с параметрами по умолчанию.

Также предусмотрены клетки растения маиса, содержащие полинуклеотидные конструкции, и растения маиса, содержащие клетки растений маиса.

В данном документе предусмотрены способы получения растений маиса, проявляющих устойчивость к северной пятнистости листьев, в которых полинуклеотидная конструкция, содержащая выделенный полинуклеотид, предусмотренная в данном документе, где указанный выделенный полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью, экспрессируется в клетках растения маиса, способных к регенерации, и из клетки растения маиса получают растение маиса, которое проявляет устойчивость к северной пятнистости листьев. Растение маиса, полученное с помощью данного способа, содержит в своем геноме полинуклеотидную конструкцию. Регуляторная последовательность может представлять собой промотор и/или терминатор, а может быть нативной по отношению к маису. В некоторых аспектах регуляторная последовательность является нативной по отношению к гену Ht1. В еще других аспектах полинуклеотидная конструкция содержит одну или несколько дополнительных гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептид, выбранный из группы, состоящей из полипептида, придающего устойчивость к заболеваниям; полипептида, придающего устойчивость к гербицидам; полипептида, придающего устойчивость к насекомым; полипептида, связанного с метаболизмом углеводов; полипептида, связанного с метаболизмом жирных кислот; полипептида, связанного с метаболизмом аминокислот; полипептида, связанного с развитием растения; полипептида, связанного с регуляцией роста растения; полипептида, связанного с улучшением урожайности; полипептида, связанного с устойчивостью к засухе; полипептида, связанного с холодоустойчивостью; полипептида, связанного с теплоустойчивостью, и/или полипептида, связанного с солеустойчивостью, где каждая гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором. Полипептид может представлять собой полипептид, который придает устойчивость к северной пятнистости листьев (NLB), как, например, полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности при сравнении с SEQ ID NO: 11 или 12 на основании способа выравнивания CLUSTAL W с параметрами по умолчанию. Растение-потомок, содержащее полинуклеотидную конструкцию, также можно получать путем скрещивания растения маиса, полученного с помощью данного способа, со вторым растением маиса, которое не содержит в своем геноме полинуклеотидную конструкцию.

#### **Краткое описание графических материалов и перечней последовательностей**

Настоящее изобретение можно лучше понять исходя из следующего подробного описания, а также прилагаемых графических материалов и перечня последовательностей, которые образуют часть данной заявки. Перечень последовательностей содержит однобуквенный код для обозначений нуклеотидных последовательностей и трехбуквенные коды для аминокислот, как определено в соответствии со стандартами IUPAC-IUBMB, описанными в Nucleic Acids Research 13:3021-3030 (1985) и в Biochemical Journal 219 (No. 2): 345-373 (1984), которые включены в данный документ при помощи ссылки в полном объеме. Символы и формат, применяемые для данных относительно нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, соответствуют правилам, изложенным в 1.822 раздела 37 C.F.R.

На фиг. 1A-D показано выравнивание вариантов CC-NB-LRR от PH4GP (SEQ ID NO: 2), PH1W2

(SEQ ID NO: 4) и B73 (SEQ ID NO: 6 и 8). Делеция в участке LRR в аллелях B73 заключена в рамку на фиг. 1C.

SEQ ID NO: 1 представляет собой нуклеотидную последовательность cDNA Ht1, обнаруженную в инбредной линии PH4GP.

SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность полипептида, кодируемого SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 представляет собой нуклеотидную последовательность cDNA Ht1, обнаруженную в инбредной линии PH1W2.

SEQ ID NO: 4 представляет собой аминокислотную последовательность полипептида, кодируемого SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 5 представляет собой нуклеотидную последовательность cDNA Ht1, обнаруженную в инбредной линии B73 и в данном документе называемую "аллелем B73-high".

SEQ ID NO: 6 представляет собой аминокислотную последовательность полипептида, кодируемого SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 7 представляет собой нуклеотидную последовательность cDNA Ht1, обнаруженную в инбредной линии B73 и в данном документе называемую "аллелем B73-low".

SEQ ID NO: 8 представляет собой аминокислотную последовательность полипептида, кодируемого SEQ ID NO: 7.

SEQ ID NO: 9 представляет собой нуклеотидную последовательность геномной ДНК Ht1, обнаруженную в инбредной линии PH4GP.

SEQ ID NO: 10 представляет собой аминокислотную последовательность участка, обнаруженного в полипептидах Ht1 аллелей, связанных с устойчивостью.

SEQ ID NO: 11 представляет собой аминокислотную последовательность NLB18 из линии PH99N в патентной заявке WO 2011/163590.

SEQ ID NO: 12 представляет собой аминокислотную последовательность NLB18 из линии PH26N в патентной заявке WO 2011/163590.

### Подробное описание изобретения

Перед описанием настоящего изобретения следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, которые, само собой разумеется, могут изменяться. Также следует понимать, что терминология, применяемая в данном документе, предназначена лишь для описания конкретных вариантов осуществления и не подразумевается как ограничивающая. Применяемые в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения выражения в единственном числе и формы единственного числа, например, включают объекты во множественном числе, если только содержание явно не подразумевает обратное. Таким образом, например, упоминание "растения", "определенного растения" или "некоторого растения" также включает несколько растений; также, в зависимости от контекста, применение термина "растение" также включает генетически подобное или идентичное потомство такого растения; применение термина "нуклеиновая кислота" необязательно на практике включает множество копий такой молекулы нуклеиновой кислоты; аналогично термин "зонд" необязательно (и как правило) охватывает множество подобных или идентичных молекул зондов.

Если не указано иное, нуклеиновые кислоты записаны слева направо в ориентации 5'-3'. Числовые диапазоны, перечисляемые в описании, охватывают числа, определяющие диапазон, и включают каждое целое число или любую числовую долю в пределах определенного диапазона. Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается обычным специалистом в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, можно применять на практике для тестирования настоящего изобретения, в данном документе описаны предпочтительные материалы и способы. В описании и формуле настоящего изобретения будет применяться приведенная далее терминология в соответствии с изложенными ниже определениями.

#### I. Комиозиции.

##### A. Полинуклеотиды и полипептиды Ht1

В US 2010095395 описано картирование QTL, ассоциированного с устойчивостью к северной пятнистости листьев, на хромосоме 2 с применением популяции, полученной от скрещивания между линией PH4GP с устойчивостью к северной пятнистости листьев и линией PH5W4 с восприимчивостью к северной пятнистости листьев. В данном документе представлено клонирование гена Ht1 у маиса и идентификация предполагаемого гена CC-NB-LRR (суперспираль, нуклеотид-связывающая, с богатыми лейцином повторами) в качестве причинного гена. Последовательности cDNA Ht1 из PH4GP и PH1W2, двух источников устойчивости, описанных в US 2010095395, представлены под SEQ ID NO: 1 и 3 соответственно, тогда как аминокислотные последовательности кодируемых полипептидов представлены под SEQ ID NO: 2 и 4. Кроме того, получали конструкцию, содержащую геномную последовательность аллеля PH4GP (устойчивого) (SEQ ID NO: 9), и трансформировали в восприимчивую линию для трансформации с применением опосредованной *Agrobacterium* трансформации, в результате чего получали растения маиса с устойчивостью к северной пятнистости листьев.

Ген *Zea mays* CC-NB-LRR (суперспираль, нуклеотид-связывающая, с богатыми лейцином повторами; также называемый Ht1) является представителем большого и сложного семейства генов устойчивости к заболеваниям. Недостаточно понятны механизм активации белка NB-LRR и последующая передача сигнала в иммунитете, индуцируемом эффекторами (Eitas and Dangl. 2010. *Curr Opin Plant Biol* 13(4) :472-477).

Таким образом, в данном документе представлены полинуклеотиды, которые можно применять для получения растений маиса с устойчивостью к северной пятнистости листьев. Полинуклеотид может представлять собой (a) нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1 (с-DNA PH4GP), SEQ ID NO: 3 (сDNA PH1W2) или SEQ ID NO: 9 (геномная последовательность PH4GP); (b) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CC-NB-LRR, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательности при сравнении с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 на основании способа выравнивания CLUSTAL W с параметрами по умолчанию; (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CC-NB-LRR, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательности при сравнении с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, на основании способа выравнивания CLUSTAL W с параметрами по умолчанию, где указанный полипептид включает аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 10, которая представляет собой последовательность удаленного участка Ht1 в B73; и (d) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CC-NB-LRR, имеющий последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

Применение термина "полинуклеотид" не предназначено для ограничения полинуклеотида по настоящему изобретению до полинуклеотида, содержащего ДНК. Специалисты в данной области техники поймут, что полинуклеотиды могут содержать рибонуклеотиды и комбинации рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов. Такие дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды включают как встречающиеся в природе молекулы, так и синтетические аналоги. Полинуклеотиды по настоящему изобретению также охватывают все формы последовательностей, в том числе без ограничений одонитевые формы, двухнитевые формы, шпильки, структуры типа "стебель-петля" и т.п.

Используемый в данном документе "выделенный" или "очищенный" полинуклеотид или полипептид или их биологически активная часть фактически или практически не содержат компонентов, обычно сопутствующих полинуклеотиду или полипептиду или взаимодействующих с ними, которые обнаруживаются в своей природной среде. Таким образом, выделенный или очищенный полинуклеотид или полипептид фактически не содержат другого клеточного материала или культуральной среды при получении с помощью рекомбинантных методик или фактически не содержат химические предшественники или другие химические вещества при химическом синтезе. В оптимальном случае "выделенный" полинуклеотид не содержит последовательностей (в оптимальном случае последовательностей, кодирующих белок), которые в естественных условиях фланкируют полинуклеотид (т.е. последовательностей, расположенных на 5'- и 3'-концах полинуклеотида) в геномной ДНК организма, из которого получен полинуклеотид. Для целей данного изобретения выражения "выделенные" или "рекомбинантные", при использовании для обозначения молекул нуклеиновой кислоты, исключают выделенные немодифицированные хромосомы. Например, в различных вариантах осуществления выделенный полинуклеотид может содержать нуклеотидную последовательность размером менее чем приблизительно 5 т.о., 4 т.о., 3 т.о., 2 т.о., 1 т.о., 0,5 т.о. или 0,1 т.о., которая в естественных условиях фланкирует полинуклеотид в геномной ДНК клетки, из которой получен полинуклеотид. Полипептид, который фактически не содержит клеточный материал, включает препараты полипептидов, имеющие менее чем примерно 30, 20, 10, 5 или 1% (от сухого веса) загрязняющего белка. Если полипептид по настоящему изобретению или его биологически активная часть получены рекомбинантным путем, то в оптимальном случае в культуральной среде представлено менее чем приблизительно 30, 20, 10, 5 или 1% (от сухого веса) химических предшественников или химических веществ, не являющихся белком, представляющих интерес.

Как применяется в данном документе, "рекомбинантный" полинуклеотид содержит комбинацию из двух или нескольких химически связанных сегментов нуклеиновой кислоты, которые в природе не находятся непосредственно соединенными. Под "непосредственно соединенными" подразумеваются два сегмента нуклеиновой кислоты, которые непосредственно прилегают и присоединяются друг к другу с помощью химической связи. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный полинуклеотид содержит представляющий интерес полинуклеотид, такой, в котором дополнительный химически связанный сегмент нуклеиновой кислоты расположен либо на 5'-, 3'-конце, либо во внутренней части представляющего интерес полинуклеотида. В качестве альтернативы химически связанный сегмент нуклеиновой кислоты рекомбинантного полинуклеотида может образовываться путем делеции последовательности. Дополнительный химически связанный сегмент нуклеиновой кислоты или последовательность, удаленная для соединения сегментов нуклеиновой кислоты, может быть любой длины, в том числе, например, составляющей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или больше нуклеотидов. В данном документе раскрыты различные способы получения таких рекомбинантных полинуклеотидов, в том числе, например, путем химического синтеза или путем манипуляции с выделенными сегментами полинуклеотидов с помощью методик генной инженерии. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный по-

линуклеотид может содержать рекомбинантную последовательность ДНК или рекомбинантную последовательность РНК.

"Рекомбинантный полипептид" содержит комбинацию из двух или более химически связанных аминокислотных сегментов, которые в природе не находятся непосредственно соединенными. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный полипептид содержит дополнительный химически связанный аминокислотный сегмент, расположенный либо на N-конце, С-конце, либо во внутренней части рекомбинантного полипептида. В качестве альтернативы химически связанный аминокислотный сегмент рекомбинантного полипептида может образовываться путем делеции по меньшей мере одной аминокислоты. Дополнительный химически связанный аминокислотный сегмент или удаленный химически связанный аминокислотный сегмент может быть любой длины, в том числе, например, составляющей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или аминокислот.

Выравнивания последовательностей и расчеты процентной идентичности можно осуществлять с применением ряда способов сравнения, разработанных для выявления гомологичных последовательностей, в том числе без ограничения программы MEGALIGN® из комплекта биоинформационных вычислительных программ LASERGENE® (DNASTAR® Inc., Мэдисон, Висконсин). Если не указано иное, множественное выравнивание предусмотренных в данном документе последовательностей осуществляли с помощью способа выравнивания CLUSTAL V (Higgins and Sharp, CABIOS. 5:151-153 (1989)) с параметрами по умолчанию (ШТРАФ ЗА ОТКРЫТИЕ ГЭПА=10, ШТРАФ ЗА ПРОДЛЕНИЕ ГЭПА=10). Параметры по умолчанию для парных выравниваний и расчета процента идентичности белковых последовательностей с помощью программы CLUSTAL V являются следующими: KTUPLE=1, ШТРАФ ЗА ОТКРЫТИЕ ГЭПА=3, ОКНО=5 и ЧИСЛО НЕПРЕРЫВНО СОВПАДАЮЩИХ УЧАСТКОВ=5. Для нуклеиновых кислот эти параметры являются следующими: KTUPLE=2, ШТРАФ ЗА ОТКРЫТИЕ ГЭПА=5, ОКНО=4 и ЧИСЛО НЕПРЕРЫВНО СОВПАДАЮЩИХ УЧАСТКОВ=4. После выравнивания последовательностей с помощью программы CLUSTAL V является возможным получение значений "процентной идентичности" и "расхождения" посредством просмотра таблицы "расстояний между последовательностями" при помощи той же программы; если не указано иное, представленные и заявленные в данном документе показатели процентной идентичности и дивергенции рассчитаны таким путем.

В качестве альтернативы можно применять способ выравнивания Clustal W. Способ выравнивания Clustal W (описанный Higgins and Sharp, CABIOS. 5:151-153 (1989); Higgins, D. G. et al., Comput. Appl. Biosci. 8:189-191 (1992)) может быть доступен в программе MegAlign™ v6.1 комплекта биоинформационных вычислительных программ LASERGENE® (DNASTAR® Inc., Мэдисон, Висконсин). Параметры по умолчанию для множественного выравнивания соответствуют следующим: ШТРАФ ЗА ОТКРЫТИЕ ГЭПА=10, ШТРАФ ЗА ПРОДЛЕНИЕ ГЭПА=0,2, задержка выравнивания расходящихся последовательностей=30%, значение транзиций нуклеотидов=0,5, матрица сравнения аминокислот=серии Gonnet, матрица сравнения ДНК=IUB. Для попарных выравниваний параметрами по умолчанию являются Выравнивание=Медленное-Точное, Штраф за открытие гэпа=10,0, Штраф за продление гэпа=0,10, Матрица сравнения аминокислот=Gonnet 250 и Матрица сравнения ДНК=IUB. После выравнивания последовательностей с помощью программы Clustal W можно получить значения "процентной идентичности" и "расхождения" с помощью просмотра таблицы "расстояний между последовательностями" в той же программе.

#### В. Полинуклеотидные конструкции

Раскрытые в данном документе полинуклеотиды Ht1 можно предусматривать в кассетах экспрессии (таких как, например, в форме полинуклеотидных конструкций) для экспрессии в представляющем интерес растений или в любом представляющем интерес организме. Кассета может включать 5'- и 3'-регуляторные последовательности, функционально связанные с полинуклеотидом Ht1. Подразумевается, что выражение "функционально связанный" означает функциональную связь между двумя или более элементами. Например, функциональная связь между представляющим интерес полинуклеотидом и регуляторной последовательностью (т.е. промотором) представляет собой функциональную связь, которая обеспечивает экспрессию представляющего интерес полинуклеотида. Функционально связанные элементы могут быть смежными или несмежными. При использовании для обозначения соединения двух участков, кодирующих белок, под функционально связанными подразумевается, что кодирующие участки находятся в одной и той же рамке считывания. Кассета может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный ген, подлежащий введению в организм путем котрансформации. Альтернативно дополнительный (дополнительные) ген (гены) могут быть представлены в нескольких кассетах экспрессии. Такая кассета экспрессии обеспечивается с множеством сайтов рестрикции и/или сайтов рекомбинации для вставки полинуклеотида Ht1, чтобы он находился под управлением регуляторных участков при транскрипции. Кассета экспрессии может дополнительно содержать гены маркеров, подлежащих селекции.

В 5'-3'-направлении в направлении транскрипции кассета экспрессии может включать участок инициации транскрипции и трансляции (т.е. промотор), полинуклеотид Ht1 и участок терминации транскрипции и трансляции (т.е. участок терминации), являющиеся функциональными у растений. Регуляторные участки (т.е. промоторы, регуляторные участки транскрипции и участки терминации трансляции)

и/или полинуклеотид Ht1 могут быть нативными/аналогичными по отношению к клетке растения маиса или друг другу. В качестве альтернативы регуляторные участки и/или полинуклеотид Ht1 могут быть гетерологичными по отношению к клетке растения маиса или друг другу.

Используемый в данном документе термин "гетерологичная" в отношении последовательности означает, что последовательность происходит из чужеродного вида или, если она происходит из того же вида, тогда она фактически модифицирована по составу и/или геномному локусу по сравнению с ее нативной формой в результате преднамеренного вмешательства человека. Например, промотор, функционально связанный с гетерологичным полинуклеотидом, происходит из вида, отличного от вида, из которого получен полинуклеотид, или, если он происходит из того же/аналогичного вида, то один или оба из них являются фактически модифицированными по сравнению с их исходной формой и/или геномным локусом, или промотор не является нативным промотором для функционально связанного полинуклеотида.

Участок терминирования может быть нативным по отношению к участку инициации транскрипции, может быть нативным по отношению к растению маиса, или его можно получить из другого источника (т.е. чужеродного или гетерологичного) по отношению к промотору, полинуклеотиду Ht1, растению маиса или любой их комбинации.

Кассеты экспрессии могут дополнительно содержать 5'-лидерные последовательности. Такие лидерные последовательности могут служить для усиления трансляции. Трансляционные лидерные последовательности известны в области техники и включают лидерные трансляционные последовательности вирусов.

При получении кассеты экспрессии с различными фрагментами ДНК можно осуществлять манипуляции таким образом, чтобы получить последовательности ДНК в надлежащей ориентации и при необходимости в надлежащей рамке считывания. С этой целью для соединения фрагментов ДНК можно использовать адаптеры или линкеры или можно задействовать другие манипуляции для обеспечения подходящих сайтов рестрикции, удаления избыточной ДНК, удаления сайтов рестрикции или т.п. С этой целью можно задействовать мутагенез *in vitro*, репарацию с помощью праймеров, рестрикцию, отжиг, повторные замены, например транзиции и трансверсии.

Для экспрессии различных последовательностей Ht1, раскрытых в данном документе, можно изменять ряд промоторов, в том числе нативный промотор последовательности полинуклеотида, представляющей интерес (такой как, например, нативный промотор гена Ht1). Промоторы можно выбирать, исходя из необходимого результата. Такие промоторы включают, например, конститутивные, индуцируемые, предпочтительные для тканей или другие промоторы для экспрессии в растениях любого, представляющем интерес организм. Синтетические промоторы можно также использовать для экспрессии последовательностей Ht1. Синтетические промоторы включают, например, комбинацию из одного или нескольких гетерологичных регуляторных элементов.

Полинуклеотидной конструкцией может быть рекомбинантная ДНК-конструкция. "Рекомбинантная ДНК-конструкция" содержит два или более функционально связанных сегментов ДНК, которые в природе не находятся функционально связанными. Неограничивающие примеры рекомбинантных ДНК-конструкций включают представляющий интерес полинуклеотид, функционально связанный с гетерологичными последовательностями, которые способствуют экспрессии, аутологической репликации и/или геномной вставке представляющей интерес последовательности. Такие гетерологичные и функционально связанные последовательности включают, например, промоторы, последовательности терминирования, энхансеры и т.д. или любой компонент кассеты экспрессии; плазмиду, космиду, вирус, автономно реплицирующуюся последовательность, фаг или линейную или кольцевую одностороннюю или двустороннюю нуклеотидную последовательность ДНК или РНК; и/или последовательности, которые кодируют гетерологичные полипептиды.

#### C. Клетки растения маиса и растения маиса

"Маис" относится к растению *Zea mays* L. ssp. *mays*, который также известен как "кукуруза".

Также предусмотрены растения маиса, клетки растения маиса, части растения маиса и семена, а также зерно маиса, имеющие последовательности Ht1, раскрытые в данном документе. В конкретных вариантах осуществления растения и/или части растений имеют стабильно встроенный по меньшей мере один гетерологичный полипептид Ht1, раскрытый в данном документе. Кроме того, представляющие интерес растения или организм могут содержать множество полинуклеотидов Ht1 (т.е. по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более).

Как применяется в данном документе, термин "растение маиса" включает клетки растения маиса, протопласты растения маиса, тканевые культуры клеток растения маиса, из которых можно регенерировать растения маиса, каллусы растения маиса, скопления клеток растения маиса и клетки растения маиса, которые являются интактными в растениях маиса или частях растения маиса, таких как зародыши, пыльца, семяпочки, семена, листья, цветы, зерна, колоски, початки, семенные оболочки, стебли, корни, кончики корней, пыльники и т.п. Предполагается, что зерно означает зрелое семя, полученное коммерческими растениеводами для целей, отличных от выращивания или воспроизводства вида.

#### D. Другие признаки, представляющие интерес

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды Ht1, раскрытые в данном документе, мож-

но вводить посредством генной инженерии в молекулярный пакет. Таким образом, различные растения маиса, клетки растения маиса и семена маиса, раскрытые в данном документе, могут дополнительно содержать один или несколько представляющих интерес признаков, и в более конкретных вариантах осуществления растение маиса, часть растения маиса или клетка растения пакетированы с любой комбинацией представляющих интерес последовательностей полинуклеотидов для создания растений с необходимой комбинацией признаков.

Применяемый в данном документе термин "пакетированный" предусматривает присутствие в одном и том же представляющем интерес растении или организме нескольких признаков. В одном неограничивающем примере "пакетированные признаки" предусматривают молекулярный пакет, в котором последовательности физически граничат друг с другом. Термин "признак", используемый в данном документе, относится к фенотипу, обусловленному конкретной последовательностью или группами последовательностей.

Описанная в данном документе полинуклеотидная ДНК-конструкция может также содержать одну или несколько гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептид, выбранный из группы, состоящей из полипептида, придающего устойчивость к заболеваниям;

полипептида, придающего устойчивость к гербицидам; полипептида, придающего устойчивость к насекомым; полипептида, связанного с метаболизмом углеводов; полипептида, связанного с метаболизмом жирных кислот; полипептида, связанного с метаболизмом аминокислот; полипептида, связанного с развитием растения; полипептида, связанного с регуляцией роста растения;

полипептида, связанного с улучшением урожайности; полипептида, связанного с устойчивостью к засухе; полипептида, связанного с холодоустойчивостью; полипептида, связанного с теплоустойчивостью, и/или полипептида, связанного с солеустойчивостью, где каждая гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором.

Полипептидом, придающим устойчивость к заболеваниям, может быть другой полипептид, который придает устойчивость к северной пятнистости листьев (NLB). Например, полинуклеотидная ДНК-конструкция может содержать связанный с устойчивостью аллель Ht1 и связанный с устойчивостью аллель NLB18 (в WO 2011163590). В данном документе представлена аминокислотная последовательность полипептида NLB18 из линии PH99N как SEQ ID NO: 11; при этом в данном документе представлена аминокислотная последовательность полипептида NLB18 из линии PH26N как SEQ ID NO: 12. Как PH99N, так и PH26N представляют собой линии маиса, проявляющие устойчивость к северной пятнистости листьев, которые отражают различные источники устойчивости по отношению к QTL хромосомы 8, описанные в заявке WO 2011163590. Связанный с устойчивостью аллель NLB18 может кодировать полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 или 99% идентичную последовательности при сравнении с SEQ ID NO: 11 или 12, на основании способа выравнивания CLUSTAL W с параметрами по умолчанию.

II. Способы получения растений маиса с устойчивостью к северной пятнистости листьев.

"*Exserohilum turcicum*", ранее называемый *Helminthosporium turcicum*, представляет собой патогенный грибок, который вызывает инфекцию северной пятнистости листьев. Патогенный грибок в данном документе также называется *Exserohilum* или *Et*.

"Устойчивость к заболеваниям" (как, например, устойчивость к северной пятнистости листьев) является характерной особенностью растений, где растение избегает симптомов заболеваний, являющихся результатом взаимодействий растений и патогенов, таких как взаимодействия маис-*Exserohilum turcicum*. Иными словами, патогены не вызывают заболеваний растений и связанных с ними симптомов заболеваний или, в качестве альтернативы, симптомы заболевания, вызванные патогеном, сводятся к минимуму или уменьшаются. Специалисту в данной области техники понятно, что композиции и способы, раскрытые в данном документе, могут использоваться с другими композициями и способами, доступными на данном уровне техники для защиты растений от атаки патогенов.

"Устойчивость" является относительным термином, указывающим на то, что инфицированное растение производит лучший урожай маиса, чем другое, обработанное таким же образом, более восприимчивое растение. Иными словами, условия вызывают сокращение снижения выживаемости маиса и/или урожая у толерантного растения маиса по сравнению с восприимчивым растением маиса. Специалисту будет понятно, что устойчивость растений маиса к северной пятнистости листьев или патогену, вызывающему ее, может предусматривать спектр более устойчивых или менее устойчивых фенотипов и может варьировать в зависимости от тяжести инфекции. Однако путем простого наблюдения специалист может определить относительную устойчивость или чувствительность различных растений, линий растений или семейств растений к северной пятнистости листьев, и более того, также будет распознавать фенотипические градации "устойчивого". Например, можно использовать визуальную оценку от 1 до 9 для определения уровня устойчивости к северной пятнистости листьев. Более высокий балл указывает на более высокую устойчивость. Данные должны собираться только при наличии достаточного давления отбора в эксперименте с измерением. Термины "толерантность" и "устойчивость" применяются в данном документе взаимозаменяемо.

Устойчивость может быть "только что приобретенная" или "повышенная". "Только что приобре-

тенная" или "повышенная" устойчивость относится к повышенному уровню устойчивости против определенного патогена, широкого спектра патогенов или инфекции, вызванной патогеном(патогенами). Повышенный уровень устойчивости к конкретному патогенному грибу, такому как Et, например, представляет собой "повышенную" или улучшенную устойчивость к грибам. Варианты осуществления настоящего изобретения будут усиливать или улучшать устойчивость растений к грибковым патогенам таким образом, что устойчивость растений к патогенному грибу или патогенам будет повышаться, что, в свою очередь, повысит устойчивость к заболеванию, вызванному патогенным грибом. Термин "усиление" относится к улучшению, повышению, расширению, умножению, увеличению, прибавлению и т.п.

Получение растений маиса с помощью способов, описанных в данном документе, может придавать длительную и разнообразную устойчивость растениям маиса и может способствовать селекции растений маиса, устойчивых к северной пятнистости листьев. Например, если множество генов устойчивости к северной пятнистости листьев пакетируются в одну единицу, это приводит к уменьшению количества определенных локусов, которые требуют интрогрессии признака с помощью возвратного скрещивания, и сведению к минимуму нежелательных сцепленных признаков от незлитных устойчивых доноров.

Можно применять различные способы для введения представляющей интерес последовательности в клетку растения маиса, растение маиса или часть растения маиса. Подразумевается, что "введение" означает представление клетке растения маиса, растению маиса или части растения маиса полинуклеотида таким образом, что последовательность получает доступ внутрь клетки растения маиса. Способы по настоящему изобретению не зависят от конкретного способа введения последовательности в организм, или растение маиса, или часть растения маиса, за исключением того, что полинуклеотид получает доступ внутрь по меньшей мере одной клетки растения маиса. В данной области техники известны способы введения полинуклеотидов в различные организмы, включая растения маиса, в том числе без ограничений способов стабильной трансформации, способов транзientной трансформации и способов трансформации, опосредованной вирусами.

Подразумевается, что "стабильная трансформация" означает, что полинуклеотидная конструкция, вводимая в растение маиса, интегрируется в геном растения маиса и может быть унаследована его потомками. Подразумевается, что "транзientная трансформация" означает, что полинуклеотид вводится в растение маиса и не интегрируется в геном растения маиса.

Протоколы трансформации, а также протоколы введения полинуклеотидных последовательностей в растения, такие как маис, могут изменяться. Подходящие способы введения полинуклеотидов в клетки растения маиса включают микроинъекцию (Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4:320334), электропорацию (Riggs et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:56025606, трансформацию, опосредованную *Agrobacterium* (патент США № 5563055 и патент США № 5981840), прямой перенос генов (Paszkowski et al. (1984) *EMBO J.* 3:27172722) и баллистическое ускорение частиц (см., например, патенты США №№ 4945050; патент США № 5879918; патенты США №№ 5886244 и 5932782; Tomes et al. (1995) в *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips, (Springer-Verlag, Berlin); McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6:923926) и трансформацию *Lecl* (WO 00/28058). Также см. Klein et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:43054309 (маис); Klein et al. (1988) *Biotechnology* 6:559563 (маис); патенты США №№ 5240855; 5322783 и 5324646; Klein et al. (1988) *Plant Physiol.* 91:440444 (маис); Fromm et al. (1990) *Biotechnology* 8:833839 (маис); Hooykaas-Van Slogteren et al. (1984) *Nature (London)* 311:763764; патент США № 5736369 (злаки); De Wet et al. (1985) в *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman et al. (Longman, New York), pp. 197-209 (пыльца); D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505 (электропорация); и Osjoda et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750 (маис посредством *Agrobacterium tumefaciens*); все из которых включены в данный документ с помощью ссылки.

В других вариантах осуществления полинуклеотид Ht1, раскрытый в данном документе, можно вводить в растения путем приведения в контакт растений с вирусом или вирусными нуклеиновыми кислотами. Как правило, такие способы включают встраивание полинуклеотидной конструкции по настоящему изобретению в молекулу ДНК или РНК. Понятно, что последовательность Ht1 можно изначально синтезировать как часть вирусного полипротеина, который затем можно подвергать процессингу путем протеолиза *in vivo* или *in vitro* с получением необходимого рекомбинантного белка. Кроме того, следует учитывать, что промоторы, раскрытые в данном документе, также охватывают промоторы, используемые для транскрипции вирусными РНК-полимеразами. Способы введения в растения полинуклеотидов и способы экспрессии кодируемого ими белка, в которых задействованы молекулы вирусной ДНК или РНК, известны в данной области техники. См., например, патенты США №№ 5889191, 5889190, 5866785, 5589367, 5316931 и Porta et al. (1996) *Molecular Biotechnology* 5:209-221; включенные в данный документ посредством ссылки.

Из уровня техники известны способы нацеленной вставки полинуклеотида в конкретное местоположение в геноме растения. В одном варианте осуществления вставку полинуклеотида в требуемое местоположение в геноме выполняют с использованием системы сайт-специфичной рекомбинации. См., например, WO 99/25821, WO 99/25854, WO 99/25840, WO 99/25855 и WO 99/25853, все из которых включены в данный документ посредством ссылки. Вкратце, полинуклеотид, раскрытый в данном документе, может содержаться в кассете для переноса, фланкированной двумя нерекомбинируемыми сайтами

рекомбинации. Кассету для переноса вводят в растение, имеющее в своем геноме стабильно встроенный целевой сайт, фланкированный двумя нерекомбинируемыми сайтами рекомбинации, которые соответствуют сайтам кассеты для переноса. Обеспечивается наличие подходящей рекомбиназы, и кассета для переноса интегрируется в целевой сайт. Полинуклеотид, представляющий интерес, таким образом интегрируется в конкретное хромосомное положение в геноме растения. Другие способы нацеливания полинуклеотидов изложены в WO 200 9/114321 (включенной в данный документ посредством ссылки), в котором описаны "оригинальные" мегануклеазы, получаемые для модификации геномов растений, в частности генома маиса. См. также Gao et al. (2010) *Plant Journal* 1:17 6-187.

Из клеток, которые были трансформированы, можно вырастить растения в соответствии с традиционными способами. См., например, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Эти растения можно затем выращивать и опылять с помощью либо той же самой трансформированной линии, либо других линий и идентифицировать полученных в результате потомков, которые характеризуются конститутивной экспрессией указанной требуемой фенотипической характеристики. Можно вырастить два или более поколений, чтобы убедиться в том, что экспрессия требуемой фенотипической характеристики стабильно поддерживается и наследуется, а затем собрать семена, чтобы убедиться в том, что была достигнута экспрессия требуемой фенотипической характеристики. Таким образом, настоящее изобретение предусматривает трансформированное семя (также называемое "трансгенным семенем"), содержащее полинуклеотид, раскрытый в данном документе, например, как часть кассеты экспрессии, стабильно встроенной в его геном.

Трансформированные клетки растения маиса, полученные с помощью методик трансформации растений, включая обсуждаемые выше, могут культивироваться для регенерации целого растения, которое обладает трансформированным генотипом (т.е. полинуклеотидом Ht1, кодирующим полипептид, который придает устойчивость к северной пятнистости листьев) и, таким образом, необходимым фенотипом, таким как устойчивость к северной пятнистости листьев, будь то только что приобретенная устойчивость или повышенная. Относительно трансформации и регенерации маиса см. в Gordon-Kamm et al., *The Plant Cell*, 2:603-618 (1990). Регенерация растений из культивируемых протопластов описана в Evans et al. (1983) *Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture* pp. 124-176, Macmillan Publishing Company, New York и Binding (1985) *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts* pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton. Регенерации можно также достичь из растительных каллюсов, эксплантатов, органов или их частей. Такие методики регенерации в целом описаны в Klee et al. (1987) *Ann Rev of Plant Phys* 38:467. См. также, например, Payne and Gamborg.

Специалисту будет понятно, что после того, как кассету экспрессии, содержащую ген Ht1, стабильно внедряют в трансгенные растения и подтверждают, что она функциональна, ее можно вводить в другие растения путем полового скрещивания. Можно применять любую из множества стандартных методик селекции в зависимости от вида, подлежащего скрещиванию.

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение путем экспрессии в клетку растения маиса, способного к регенерации, полинуклеотидной конструкции, содержащей полинуклеотид, функционально связанный по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью, где полинуклеотид кодирует связанный с устойчивостью аллель гена Ht1, представленного в данном документе, и образование растения маиса, которое характеризуется устойчивостью к северной пятнистости листьев, из клетки растения маиса. Растение маиса, полученное с помощью данного способа, содержит в своем геноме полинуклеотидную конструкцию. Регуляторная последовательность может представлять собой промотор и/или терминатор, а может быть нативной по отношению к маису. В некоторых вариантах осуществления регуляторная последовательность является нативной по отношению к гену Ht1. Растение-потомка, содержащее полинуклеотидную конструкцию, также можно получать путем скрещивания растения маиса, полученного с помощью данного способа, со вторым растением маиса, которое не содержит в своем геноме полинуклеотидную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления ген Ht1 сверхэкспрессируется (либо в качестве геномного фрагмента, либо cDNA), чтобы придать большую устойчивость, чем при уровне экспрессии в нативном состоянии.

### Примеры

Следующие примеры предусмотрены для иллюстрации, а не для ограничения прилагаемой формулы изобретения. Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей и что специалисты в данной области техники определят различные реагенты или параметры, которые могут быть изменены без отступления от сути настоящего изобретения или объема прилагаемой формулы изобретения.

#### Пример 1.

Детальное картирование локуса устойчивости к северной пятнистости листьев.

Большую популяцию, полученную путем возвратного скрещивания, создавали для детального картирования генов QTL устойчивости к северной пятнистости листьев, расположенных в хромосоме 2. Популяцию создавали путем скрещивания между устойчивой линией PH4GP (балл=9) и восприимчивой линией PH5W4 (балл=1), и восприимчивую линию использовали в качестве рекуррентного родителя. Особей BC= оценивали в отношении инфекции северной пятнистости листьев с применением способа

фенотипирования, раскрытого в патенте США 8921646. Данные, полученные посредством рекомбинации с использованием маркера от большого числа особей из популяции 2, позволили поместить ген в участок размером 18 т.о. генома B73, охватывающий предполагаемую протеинфосфатазу 2С, предполагаемый белок "цинковых пальцев" PHD-типа и предполагаемый белок устойчивости к заболеваниям. EST для предполагаемого белка устойчивости к заболеваниям неизвестен; кроме того, на основании предсказанной последовательности гена B73 предполагаемый белок устойчивости к заболеваниям обладает низкой конститутивной экспрессией.

#### Пример 2.

Определение кандидатного гена для Ht1 и сравнение аллельных вариантов.

Конструировали библиотеку ВАС от устойчивого донора PH4GP, определяли клон ВАС, охватывающий интервал Ht1, и секвенировали его. Интервал Ht1 в PH4GP был менее чем 10 т.о., только с одним помеченным геном, который кодирует предполагаемый ген CC-NB-LRR (суперспираль, нуклеотид-связывающая, с богатыми лейцином повторами). Последовательности cDNA Ht1 из PH4GP и PH1W2 (другого источника связанной с устойчивостью алели Ht1; US2010095395) представлены под SEQ ID NO: 1 и 3 соответственно, тогда как аминокислотные последовательности, кодирующие полипептиды, представлены под SEQ ID NO: 2 и 4. B73 имеет два варианта сплайсинга, и новый вариант экспрессируется на намного более высоком уровне (также называемый B73-high), чем известный вариант (также называемый B73-low). SEQ ID NO: 5 представляет собой последовательность cDNA аллеля B73-high, тогда как аминокислотная последовательность кодируемого полипептида представлена под SEQ ID NO: 6. SEQ ID NO: 7 представляет собой последовательность cDNA аллеля B73-low, тогда как аминокислотная последовательность кодируемого полипептида представлена под SEQ ID NO: 8.

На фиг. 1A-D показано, что домены CC и NB очень схожи между восприимчивым аллелем (от B73) и связанными с устойчивостью аллелями (от PH4GP и PH1W2). Однако оба аллеля B73 имеют делецию в LRR (показаны в рамке на фиг. 1C). Аминокислотная последовательность данного участка в связанных с устойчивостью аллелях Ht1 представлена под SEQ ID NO: 10.

#### Пример 3.

Подтверждение при помощи трансгенеза.

Получали конструкцию, содержащую геномную последовательность аллеля PH4GP (устойчивого) (SEQ ID NO: 9), трансформировали в восприимчивую линию для трансформации с применением опосредованной *Agrobacterium* трансформации. Геномная последовательность (SEQ ID NO: 9) содержала нативный промотор, экзоны, интрон и участки терминации. Регенерированные трансгенные растения высаживали в теплицу и выполняли анализ с помощью количественной ПЦР, чтобы подтвердить вставку кассеты T-DNA, содержащей геномную последовательность аллеля PH4GP (устойчивого). Многие трансгенные объекты имели одну копию вставки T-DNA, что подтверждали с помощью qPCR с применением четырех фланкирующих маркеров. На основании данных о маркерах из 50 трансгенных объектов 41 являлся положительным в отношении вставки, а 9 были отрицательными (нулевыми).

Все трансгенные объекты подвергали тестированию в теплице в отношении эффективности к патогену северной пятнистости листьев (*Exserohilum turcicum*). Сначала все трансгенные объекты заражали расой 0 патогена, к которой ген Ht1, как известно, обеспечивает устойчивость; затем трансгенные объекты подвергали воздействию расы 1, к которой Ht1 не обеспечивает устойчивость. Все положительные трансгенные объекты, определенные с помощью qPCR, были устойчивыми к расе 0, а все отрицательные трансгенные объекты были восприимчивыми к расе 0. Как ожидалось, все трансгенные объекты были восприимчивыми к расе 1.

#### Пример 4.

Получение устойчивых к северной пятнистости листьев растений маиса, экспрессирующих полипептид маиса Ht1.

Устойчивые к северной пятнистости листьев растения маиса, экспрессирующие ген маиса Ht1, можно получить с применением, например, трансформации на основании рекомбинантной ДНК. Способы трансформации на основании рекомбинантной ДНК хорошо известны из уровня техники, например, *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованная трансформация и трансформация посредством бомбардировки частицами. В соответствии с трансформацией растений посредством *Agrobacterium tumefaciens* векторы составляли в соответствии со способами, известными из уровня техники. Векторы содержат вставку T-DNA, имеющую промотор, интрон, необязательный энхансер, такой как энхансерный элемент 35S, вариант ДНК Ht1, который придает устойчивость к северной пятнистости листьев, и растительный терминатор. Незрелые зародыши маиса вырезали и инфицировали с помощью вектора *Agrobacterium tumefaciens*, содержащего представляющий интерес вариант Ht1. После инфицирования эмбрионы переносили и культивировали в среде для совместного культивирования. После совместного культивирования инфицированные незрелые зародыши переносили в среду для роста трансгенных каллюсов. Предполагаемые трансгенные ткани каллюсов отбирали с применением ПЦР и необязательно вестерн-блоттинга, чтобы подтвердить наличие варианта гена Ht1. Предполагаемые трансгенные ткани каллюсов содержали в среде для дополнительного роста и проводили отбор перед регенерацией растений. Во время регенерации ткань каллюса, подтвержденную, что является трансгенной, переносили в среду для созревания и

культивировали для созревания соматических зародышей. Затем зрелые зародыши переносили в среду для регенерации для образования побегов и корней. После появления побегов и корней отдельные проростки переносили в пробирки со средой для укоренения. Проростки с образованными побегами и корнями пересаживали в горшки в теплице для дальнейшего роста и получения семян T1.

Более того, ДНК-конструкция, содержащая вариант ДНК Ht1, который придает устойчивость к северной пятнистости листьев, может также включать другой ген, кодирующий полипептид, который придает устойчивость к северной пятнистости листьев, такой как ген, кодирующий NLB18 (в WO 2011163590). Как PH99N, так и PH26N представляют собой линии маиса, проявляющие устойчивость к северной пятнистости листьев, которые представляют различные источники устойчивости по отношению к QTL хромосомы 8, описанные в заявке WO 2011163590. В данном документе последовательность полипептида NLB18 из линии PH99N представлена как SEQ ID NO: 11; при этом в данном документе аминокислотная последовательность полипептида NLB18 из линии PH26N представлена как SEQ ID NO: 12. Введение Ht1 и NLB18 в растение может характеризоваться эффектом в виде повышения устойчивости к расе 0 патогена *Exserohilum turcicum* и/или может обеспечивать устойчивость к дополнительной расе или расам (например, расе 1), к которым ген Ht1 не обеспечивает устойчивость.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотидная конструкция, придающая устойчивость к северной пятнистости листьев (NLB), содержащая выделенный полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9;  
 б) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид CC-NB-LRR, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности при сравнении с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 на основании способа выравнивания CLUSTAL W с параметрами по умолчанию;

с) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид CC-NB-LRR, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности при сравнении с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 на основании способа выравнивания CLUSTAL W с параметрами по умолчанию, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 10;

д) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид CC-NB-LRR, имеющий последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, где указанный выделенный полинуклеотид функционально связан с гетерологичным промотором.

2. Полинуклеотидная конструкция по п.1, где полинуклеотидная конструкция дополнительно содержит одну или несколько дополнительных гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептид, выбранный из группы, состоящей из полипептида, придающего устойчивость к заболеваниям растений; полипептида, придающего устойчивость к гербицидам; полипептида, придающего устойчивость к насекомым; полипептида, связанного с метаболизмом углеводов; полипептида, связанного с метаболизмом жирных кислот; полипептида, связанного с метаболизмом аминокислот; полипептида, связанного с развитием растения; полипептида, связанного с регуляцией роста растения; полипептида, связанного с улучшением урожайности; полипептида, связанного с устойчивостью к засухе; полипептида, связанного с холодоустойчивостью; полипептида, связанного с теплоустойчивостью, и/или полипептида, связанного с солеустойчивостью, где каждая гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором.

3. Полинуклеотидная конструкция по п.2, где дополнительный полипептид, придающий устойчивость к заболеваниям растений, представляет собой полипептид, который придает дополнительную устойчивость к северной пятнистости листьев (NLB).

4. Полинуклеотидная конструкция по п.3, где указанный дополнительный полипептид, придающий дополнительную устойчивость к северной пятнистости листьев (NLB), представляет собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности при сравнении с SEQ ID NO: 11 или 12 на основании способа выравнивания CLUSTAL W с параметрами по умолчанию.

5. Устойчивая к северной пятнистости листьев (NLB) клетка растения маиса, содержащая полинуклеотидную конструкцию по п.1.

6. Устойчивое к северной пятнистости листьев (NLB) растение маиса, содержащее клетку растения маиса по п.5.

7. Способ получения растения маиса, которое проявляет устойчивость к северной пятнистости листьев (NLB), включающий:

а) обеспечение экспрессии в клетке растения маиса, способной к регенерации, полинуклеотидной конструкции, содержащей полинуклеотид, функционально связанный по меньшей мере с одной гетерологичной регуляторной последовательностью, где полинуклеотид выбран из группы, состоящей из:

и) нуклеотидной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9;

ii) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид CC-NB-LRR, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности при сравнении с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 на основании способа выравнивания CLUSTAL W с параметрами по умолчанию;

iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид CC-NB-LRR, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности при сравнении с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 на основании способа выравнивания CLUSTAL W с параметрами по умолчанию, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 10;

iv) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид CC-NB-LRR, имеющий последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4;

v) нуклеотидной последовательности, комплементарной (i), (ii), (iii) или (iv);

b) получение растения маиса, которое проявляет устойчивость к северной пятнистости листьев, где указанное растение маиса содержит в своем геноме полинуклеотидную конструкцию.

8. Способ по п.7, где указанная по меньшей мере одна гетерологичная регуляторная последовательность представляет собой промотор.

9. Способ по п.7, где указанная по меньшей мере одна гетерологичная регуляторная последовательность представляет собой терминатор.

10. Способ по п.7, где указанная гетерологичная регуляторная последовательность является нативной по отношению к маису.

11. Способ по п.7, где указанная гетерологичная регуляторная последовательность является нативной по отношению к гену Ht1 (SEQ ID NO: 9).

12. Способ по п.7, где указанная полинуклеотидная конструкция содержит одну или несколько дополнительных гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептид, выбранный из группы, состоящей из полипептида, придающего устойчивость к заболеваниям растений; полипептида, придающего устойчивость к гербицидам; полипептида, придающего устойчивость к насекомым; полипептида, связанного с метаболизмом углеводов; полипептида, связанного с метаболизмом жирных кислот; полипептида, связанного с метаболизмом аминокислот; полипептида, связанного с развитием растения; полипептида, связанного с регуляцией роста растения; полипептида, связанного с улучшением урожайности; полипептида, связанного с устойчивостью к засухе; полипептида, связанного с холодоустойчивостью; полипептида, связанного с теплоустойчивостью, и/или полипептида, связанного с солеустойчивостью, где каждая гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором.

13. Способ по п.12, где дополнительный полипептид, придающий устойчивость к заболеваниям растений, представляет собой полипептид, который придает дополнительную устойчивость к северной пятнистости листьев (NLB).

14. Способ по п.13, где указанный дополнительный полипептид, придающий дополнительную устойчивость к северной пятнистости листьев (NLB), представляет собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности при сравнении с SEQ ID NO: 11 или 12 на основании способа выравнивания CLUSTAL W с параметрами по умолчанию.

15. Способ получения растения маиса, которое проявляет устойчивость к северной пятнистости листьев (NLB), включающий:

a) скрещивание растения маиса, полученного с помощью способа по п.7, с растением маиса, которое не содержит в своем геноме полинуклеотидную конструкцию;

b) получение растения-потомка, которое проявляет устойчивость к северной пятнистости листьев, где указанное растение-потомок содержит в своем геноме полинуклеотидную конструкцию.

1 MENPDAQAKAWAAEMRELAYDMEDSIDLFTHHVDHEPADTATTGVKRFFLRIRKLKKLH SEQIDNO2  
 1 MENPDAQAKAWAAEMRELAYDMEDSIDLFTHHVDHEPADTATTGVKRFFLRIRKLKKLH SEQIDNO4  
 1 MENPDAQAKAWAAEMRELAYDMEDSIDLFTHHVDHEPADTATTGVKRFFLRIRKLKKLH SEQIDNO6  
 1 MENPDAQAKAWAAEMRELAYDMEDSIDLFTHHVDHEPADTATTGVKRFFLRIRKLKKLH SEQIDNO8  
  
 61 YRHRFVQEIKQLHDLANESYRRRKRYRIEEGSSLSHAEIDPRLEALYVEVEKLVGIQGP SEQIDNO2  
 61 YRHRFVQEIKQLHDLANESYRRRKRYRIEEGSSLSHAEIDPRLEALYVEVEKLVGIQGP SEQIDNO4  
 61 YRHRFAQEIKQLHDLANESYRRRKRYRIEEGSSSLPHAEIDPRLEALYVEVEKLVGIQGP SEQIDNO6  
 61 YRHRFAQEIKQLHDLANESYRRRKRYRIEEGSSSLPHAEIDPRLEALYVEVEKLVGIQGP SEQIDNO8  
  
 121 SQEIIGQLVGENAAERRRVVAVVSGSGSKTTLAKQVYEKIRCQFSCAAFSVSQKPNMN SEQIDNO2  
 121 SQEIIGQLVGENAAERRRVVAVVSGSGSKTTLAKQVYEKIRCQFSCAAFSVSQKPNMN SEQIDNO4  
 121 SQEIIGQLVGENAAERRRVVAVVSGSGSKTTLAKQVYEKIRCQFSCAAFSVSQKPNMN SEQIDNO6  
 121 SQEIIGQLVGENAAERRRVVAVVSGSGSKTTLAKQVYEKIRCQFSCAAFSVSQKPNMN SEQIDNO8  
  
 181 SLLWELLSQIGNHGGDLGMMAVGYCSDKQLIDRLRSHLEKQ-----RYLVVID SEQIDNO2  
 181 SLLWELLSQIGNHGGDLGMMAVGYCSDKQLIDRLRSHLEKQ-----RYLVVID SEQIDNO4  
 181 SLLWELLSQIGNHGGDLGMMAVGYCSDKQLIDRLRSHLEKQ-----RYLVVID SEQIDNO6  
 181 SLLWELLSQIGNHGGDLGMMAVGYCSDKQLIDRLRSHLEKQRTDFSTASQSALRYLVVID SEQIDNO8

Фиг. 1А

229 DVWTNSAWETIQCALPKNAHASKIILTTRINSVGQFSCPTDEGFIYQMKPLCRNDSNLF SEQIDNO2  
 229 DVWTNSAWETIQCALPKNAHASKIILTTRINSVGQFSCPTDEGFIYQMKPLCRNDSNLF SEQIDNO4  
 229 DVWTNSAWETIQCALPKNAHASKIILTTRINSVGQFSCPTDEGFIYQMKPLCRNDSNLF SEQIDNO6  
 241 DVWTNSAWETIQCALPKNAHASKIILTTRINSVGQFSCPTDEGFIYQMKPLCRNDSNLF SEQIDNO8  
  
 289 LKRTLCDKDKFPAQLEGIKNEIEKCDGLPLAIVTLASMLATKQRTREEWERALDSIHSM SEQIDNO2  
 289 LKRTLCDKDKFPAQLEGIKNEIEKCDGLPLAIVTLASMLATKQRTREEWERALDSIHSM SEQIDNO4  
 289 LKRTLCDKDKFPAQLEGIKNEIEKCDGLPLAIVTLASMLATKQRTREEWERALDSIHST SEQIDNO6  
 301 LKRTLCDKDKFPAQLEGIKNEIEKCDGLPLAIVTLASMLATKQRTREEWERALDSIHST SEQIDNO8  
  
 349 HKKDSGLEVMDKILSLSYRDLPHNMNRNCLLYLSTFPEDHTIYKDALVWRWMAEGFIAETQ SEQIDNO2  
 349 HKKDSGLEVMDKILSLSYRDLPHNMNRNCLLYLSTFPEDHTIYKDALVWRWMAEGFIAETQ SEQIDNO4  
 349 HKKDSSLEVMDKILSLSYRDLPHNMNRNCLLYISTFPEDHTIYKDALVWRWMAEGFIAETQ SEQIDNO6  
 361 HKKDSSLEVMDKILSLSYRDLPHNMNRNCLLYISTFPEDHTIYKDALVWRWMAEGFIAETQ SEQIDNO8  
  
 409 GFTLEQVAEGYFYEFVNRSVLQPITLRSRYEMRGECCRVHDIVLNFLISRAAEENFLT SEQIDNO2  
 409 GFTLEQVAEGYFYEFVNRSVLQPITLRSRYEMRGECCRVHDIVLNFLISRAAEENFLT SEQIDNO4  
 409 GFTLEQVAEGYFYEFVNRSVLQPITLRSRYEMRGECCRVHDIVLNFLISRAAEENFLT SEQIDNO6  
 421 GFTLEQVAEGYFYEFVNRSVLQPITLRSRYEMRGECCRVHDIVLNFLISRAAEENFLT SEQIDNO8

Фиг. 1В

4 69 LYGAQGVPSDDRRIRRLSVWDSPEHALAVSRATMNLHLRSLRVRICNVGDWVPVAVLDLPV SEQ IDNO2  
 4 69 LYGAQGVPSDDRRIRRLSVWDSPEHALAVSRATMNLHLRSLRVRICNVGDWVPVAVLDLPV SEQ IDNO4  
 4 69 LYGAQGVPSDDRRIRRLSVWDSPEHALAVSRATMNLHLRSLRVRICNVGDWVPVAVLDLPV SEQ IDNO6  
 4 81 LYGAQGVPSDDRRIRRLSVWDSPEHALAVSRATMNLHLRSLRVRICNVGDWVPVAVLDLPV SEQ IDNO8  
  
 5 29 LRVLDLEGCRDLRIDEPCILSLFHLRYLGFRSASGVVLPAQIGNLHHLQTIDLSGTGVT SEQ IDNO2  
 5 29 LRVLDLEGCRDLRIDEPCILSLFHLRYLGFRSASGVVLPAQIGNLHHLQTIDLSGTGVT SEQ IDNO4  
 5 29 LRVLDLEGCRDLRIVDPDCILSLFHLRYLGFRSASGVVLPAQIGNLHHLQTIDLSGTGVT SEQ IDNO6  
 5 41 LRVLDLEGCRDLRIVDPDCILSLFHLRYLGFRSASGVVLPAQIGNLHHLQTIDLSGTGVT SEQ IDNO8  
  
 5 89 QLPESIVQLKRLMHLVGQRLIMPDGFGSMESLEELGTIDCCKCPV/SFGEDLALLSRLRVL SEQ IDNO2  
 5 89 QLPESIVQLKRLMHLVGQRLIMPDGFGSMESLEELGTIDCCKCPV/SFGEDLALLSRLRVL SEQ IDNO4  
 5 89 QLPESIVQLKRLMHLVGQRLIMPDGFGSMESLEELGTIDCCKCPAEG-----APSD SEQ IDNO6  
 6 01 QLPESIVQLKRLMHLVGQRLIMPDGFGSMESLEELGTIDCCKCPAEG-----APSD SEQ IDNO8  
  
 6 49 RVAFIGVETSDMETRRKSLMSSLCKLGGDNLRRTIIDLAGGGDCFVESWHPPRLLQKF SEQ IDNO2  
 6 49 RVAFIGVETSDMETRRKSLMSSLCKLGGDNLRRTIIDLAGGGDCFVESWHPPRLLQKF SEQ IDNO4  
 6 40 RVAFIGVETSDMETRRKSLMSSLCKLGGDNLRRTIIDLAGGGDCFVESWHPPRLLQKF SEQ IDNO6  
 6 52 RVAFIGVETSDMETRRKSLMSSLCKLGGDNLRRTIIDLAGGGDCFVESWHPPRLLQKF SEQ IDNO8

Фиг. 1С

7 09 IHISQQQHFSRFPWEISSCLCDLTHLDIAEKMEREHLVLEHLPAIRCLYLFVKRVSED SEQ IDNO2  
 7 09 IHIS--QHFSRFPWEISSCLCDLTHLDIAEKMEREHLVLEHLPAIRCLYLFVKRVSED SEQ IDNO4  
 7 00 IHISQQQHFSRFPWEISSCLCDLTHLDIAEKMEREHLVLEHLPAIRYLYLFVKRVSED SEQ IDNO6  
 7 12 IHISQQQHFSRFPWEISSCLCDLTHLDIAEKMEREHLVLEHLPAIRYLYLFVKRVSED SEQ IDNO8  
  
 7 69 GLAISHGAFRCLRRLEFCNVDPGLMFAGGVPMLEWLRLGFDADRAQSTYGGLEVGIQRL SEQ IDNO2  
 7 67 GLVISHGAFRCLRRLEFCNVDPGLMFAGGVPMLEWLRLGFDADRAQSTYGGLEVGIQRL SEQ IDNO4  
 7 60 GLVISHSAFRCLRRLEFCNVDPGLMFAGGVPMLEWLRLGFDADRAQSTYGGLEVGIQRL SEQ IDNO6  
 7 72 GLVISHSAFRCLRRLEFCNVDPGLMFAGGVPMLEWLRLGFDADRAQSTYGGLEVGIQRL SEQ IDNO8  
  
 8 29 SSLKHVVLIIVMVSEGGDDPAEQAVWSAINGQVEMLPNSPTVDIRFRRRSQLQASSE. SEQ IDNO2  
 8 27 SSLKHVVLIIVMVSEGGDDPAEQAVWSAINGQVEMLPNSPTVDIRFRRRSQLQASSE. SEQ IDNO4  
 8 20 SSLKHVVLIIVCMVSEGGDDPAEQAVWSAINGQVEMLPNSPTVDIRFRRRSQLQASSE. SEQ IDNO6  
 8 32 SSLKHVVLIIVCMVSEGGDDPAEQAVWSAINGQVEMLPNSPTVDIRFRRRSQLQASSE. SEQ IDNO8

Фиг. 1D

