

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191828** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.08.12

(51) Int. Cl. *C07K 14/415* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/06 (2018.01)
A01H 6/02 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.02.18

(54) **ГЕН УСТОЙЧИВОСТИ К БОЛЕЗНЯМ РАСТЕНИЙ**

(86) PCT/EP2019/054008

(87) WO 2020/169178 2020.08.27

(71) Заявитель:
КВС ЗААТ СЕ & Ко. КГаА (DE)

(72) Изобретатель:

Торьек Отто, Борхардт Дитрих (DE),
Рекоске Маргарет (US), Мехельке
Вольфганг, Лайн Дженс Кристоф,
Шульц Бритта (DE)

(74) Представитель:

Зуйков С.А. (RU)

(57) Более эффективная селекция растений, устойчивых к болезням, или разработка новых устойчивых линий обеспечивается посредством предложения опосредующего устойчивость гена по настоящему изобретению; в частности, эффект устойчивости у растения-мишени вызывается свойством идентифицированного гена. Опосредующий устойчивость ген и варианты осуществления настоящего изобретения, описанные ранее, предлагают дополнительное применение, например использование аллеля гена устойчивости в трансгенных подходах с целью разработки новых устойчивых сортов.

202191828

A1

A1

202191828

ГЕН УСТОЙЧИВОСТИ К БОЛЕЗНЯМ РАСТЕНИЙ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, молекула нуклеиновой кислоты которого способна придавать устойчивость к *Cercospora* (Церкоспора), в частности, к грибу *Cercospora beticola* (Церкоспора свекловичная) растению и, в частности, растению вида *Beta vulgaris* (Свекла обыкновенная), в котором экспрессируется полипептид, а также к полипептиду, кодируемому молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В частности, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению отличается тем, что эффект устойчивости к Церкоспоре, который придается полипептидом, является доминирующим. Кроме того, настоящее изобретение относится к устойчивому к Церкоспоре растению, растительной клетке, органу растения, растительной ткани, части растения или семени, или к потомку растения, которое содержит молекулу нуклеиновой кислоты или ее сегменты в виде эндогенного гена, в виде отредактированного гена или в виде трансгена. Кроме того, настоящее изобретение также охватывает способы повышения устойчивости к Церкоспоре растения вида *Beta vulgaris*, а также способы продуцирования или идентификации и, возможно, отбора растения, устойчивого к Церкоспоре. Настоящее изобретение также охватывает способы мониторинга заражения патогеном *Cercospora beticola*, а также олигонуклеотидные зонды и праймеры для гибридизации с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Пятнистость листьев (церкоспороз) - одно из наиболее опасных, широко распространенных во всем мире болезней листьев растений вида *Beta vulgaris*. Эту болезнь вызывает гриб *Cercospora beticola*. У растений, пораженных этой болезнью, обычно образуются небольшие, относительно круглые пятна на листьях (2-3 мм), которые посередине светло-серого цвета и окружены красно-коричневой каймой. При сильном заражении, пятна на листьях перекрываются, в результате чего целые сегменты листовой пластинки высыхают. Небольшие черные точки (псевдоstroma) видны внутри полностью сформированных пятен, а серое войлочноподобное покрытие (носители конидий с конидиями) образуется во влажных условиях - преимущественно на нижней стороне листа. Сильно зараженные листья сначала желтеют, затем буреют и отмирают. Параллельно происходит рост новых листьев, при этом, однако, листья снова заболевают и отмирают. Сначала симптомы повреждения видны только у отдельных растений, однако с распространением болезни зачастую происходит образование гнезд со стойким заражением. Дальнейшее распространение заражения по всему участку происходит посредством дождя и ветра.

Патоген *Cercospora beticola* был впервые описан во второй половине 19 века в Италии. До 40% урожая можно потерять из-за сильного заражения, которое может быть вызвано влажной погодой, ранним смыканием рядов, высоким потенциалом заражения, существовавшим в предыдущие годы, или чрезмерным орошением. Эти потери обусловлены сокращением урожая свеклы и снижением содержания сахара; см. Хольтшulte ((2000) «*Cercospora beticola* - распространение и заболеваемость во всем мире», стр. 5–16, в работе «*Cercospora beticola* Sacc. Биология, влияние на агротехнику и меры борьбы с болезнью свеклы сахарной», том 2 (М.Дж.С. Ашер, Б. Хольтшulte, М.Р. Молард, Ф. Россо, Г. Штайнрукен, Р. Бекерс, под ред.). Международный институт исследований свеклы, Брюссель, Бельгия, 215 стр.). Для борьбы с болезнью зачастую используют посадки в междурядьях или фунгициды. Химическая борьба с *Cercospora beticola* с помощью фунгицидов требует от фермера материальных затрат и загрязняет окружающую среду. Многократное применение фунгицидов дополнительно увеличивает давление отбора на толерантные к фунгицидам штаммы *Cercospora beticola*. Это противоречит устойчивой агротехнической практике.

Косвенная борьба ведется посредством отбора сортов со здоровыми листьями и культивирования свеклы с использованием, по меньшей мере, трехлетнего севооборота. Вести борьбу с заражением более эффективно можно с помощью комбинации толерантных или устойчивых сортов. Менее восприимчивые толерантные к Церкоспоре сорта свеклы предлагаются на рынке с 2000 г. (Штайнрукен 1997, «Die Zucht von *Cercospora*-resistenten Zuckerruben». [«Селекция устойчивой к Церкоспоре свеклы сахарной»], Vortrage für Pflanzenzüchtung [Лекции по селекции растений], Том 37, Лекционный симпозиум, 4-5 марта 1997 г., Киль). Эти сорта наделены количественной устойчивостью к *Cercospora beticola*. Устойчивость этих сортов основана на нескольких генах и передается количественно, при этом, точное количество генов, ответственных за устойчивость, неизвестно; см. Вейланд и Кох (2004), Пятнистость листьев свеклы сахарной (*Cercospora beticola* Sacc.), *The Plant Journal*, 5 (3), 157-166. Сложное количественное наследование было подтверждено посредством определенного количества анализов локусов количественных признаков (QTL). Этот способ позволяет картировать полигенные типы унаследованной устойчивости и является надежным методом идентификации количества и положения факторов генетической устойчивости на карте сцепления генетических признаков растения-хозяина. Таким образом, можно было бы определить множество причинных QTL на каждой хромосоме свеклы сахарной.

Картирование было проведено с различными донорами устойчивости к Церкоспоре, при этом, наблюдаемые эффекты QTL были, по большей части, незначительными. Максимальные заявленные фенотипические значения составили 5%.

В непрерывных исследованиях были описаны списки дифференциально экспрессируемых генов. В исследовании Вельтмейер *и соавт.*, ((2011) Профили транскриптов в генотипах свеклы сахарной раскрывают определение времени и силу защитных реакций на заражение *Cercospora beticola*, *Molecular plant-microbe interactions*, 758-772), профиль экспрессии на стороне генома для различных генотипов свеклы сахарной (то есть, устойчивых, толерантных, чувствительных и так далее к Церкоспоре) был создан с помощью технологии на основе микрочипов во время заражения патогеном для анализа транскрипционных изменений профиля экспрессии в связи с пятнистостью листьев. С помощью этих анализов авторы изобретения имели возможность создать патоген-индуцируемый профиль транскрипции в различных испытываемых генотипах свеклы сахарной и определить потенциальные гены-кандидаты. Однако эти гены еще не были охарактеризованы подробно. Генетический и функциональный фон устойчивости к Церкоспоре и идентичность генов устойчивости до сих пор были совершенно неясны.

Однако при количественном наследовании QTL, в растение вводится не только желаемая устойчивость к *Cercospora beticola*, но и, зачастую скорее нежелательные признаки, такие как, например, снижение урожайности из-за наследования дополнительных генов, которые сцеплены с положительным признаком устойчивости к Церкоспоре. Это явление также известно под термином «сцепленный груз». Кроме того, огромные затраты на селекцию, которые требуются для отбора множества локусов устойчивости без снижения, таким образом, урожайности, могут отрицательно сказаться на жизнеспособности растений; см. Вейланд и Кох, 2004.

Селекционные компании уже более десяти лет предлагают на рынке толерантные к Церкоспоре сорта. Устойчивость этих сортов наследуется, благодаря множеству генов устойчивости с незначительным эффектом. Однако недостаток этих сортов состоит в том, что разработка сорта является очень трудоемким и сложным процессом из-за сложностей наследования, и у таких сортов значительно более низкая урожайность по сравнению с обычными сортами, при отсутствии заражения. Среди прочего, это может быть связано с эпигенетическим взаимодействием некоторых генов устойчивости с генами, отвечающими за производство сахара, что приводит к снижению выносливости растений, в отсутствие патогена.

Использование новых методов селекции, основанных на редактировании генов, например, с помощью нуклеаз TALE или систем CRISPR, а также трансгенных подходов, на практике невозможно из-за сложностей наследования и множества генов, участвующих в развитии устойчивости, большинство из которых еще не идентифицировано и не охарактеризовано.

Для стабильной селекции растений, устойчивых к пятнистости листьев,

вызываемой Церкоспорой, то есть, растений, способных противостоять опасности, исходящей от вариантов Церкоспоры, которые преодолевают эту устойчивость, необходимо постоянно идентифицировать новые гены устойчивости и интегрировать их в генофонды культивируемых растений, таких как свекла сахарная. В частности, цель состояла в предложении подходящих генов устойчивости, которые после экспрессии в растении сами по себе уже продуцируют очень сильный, доминирующий эффект устойчивости к *Cercospora beticola*. В соответствии с настоящим изобретением, эта цель достигается посредством вариантов осуществления, охарактеризованных в формуле изобретения и в описании.

РЕФЕРАТ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая способна придавать устойчивость к Церкоспоре - в частности, к грибу *Cercospora beticola* - растению и, в частности, *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* (Мангольд). Таким образом, полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, продуцируется в растении. Молекула нуклеиновой кислоты, после экспрессии которой полипептид продуцируется сам по себе уже продуцирует в растении очень сильный, доминирующий эффект устойчивости к *Cercospora beticola*.

Кроме того, настоящее изобретение относится к устойчивому к Церкоспоре растению, растительной клетке, органу растения, растительной ткани, части растения или семени, семенному материалу или потомку растения, которое содержит молекулу нуклеиновой кислоты или ее сегменты. Нуклеиновая кислота может содержаться, например, в виде эндогена или трансгена. Кроме того, нуклеиновая кислота может содержаться в виде интрогрессии. Необязательно, исключаются те растения и их компоненты, которые были получены посредством по существу биологического процесса.

Способы повышения устойчивости к Церкоспоре растения вида *Beta vulgaris*, а также способы продуцирования или идентификации и, возможно, отбора растения, устойчивого к Церкоспоре, также охватываются настоящим изобретением. Настоящее изобретение также охватывает способы мониторинга заражения патогеном *Cercospora beticola*, а также олигонуклеотиды в виде зондов и праймеры для гибридизации с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

Таким образом, настоящее изобретение относится к вариантам осуществления, перечисленным в нижеследующих пунктах, которые также проиллюстрированы на примерах и фигурах.

[1] Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, который способен придавать устойчивость к Церкоспоре растению, в котором экспрессируется полипептид, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную

последовательность, которая выбрана из

(a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 3;

(b) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 2;

(c) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 53;

(d) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с нуклеотидной последовательностью, которая комплементарна нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктами (a), (b) или (c), при жестких условиях;

(e) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, который, посредством замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты аминокислотной последовательности, отличается от полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью в соответствии с пунктами (a), (b) или (c);

(f) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, который имеет аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 70% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3;

(g) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 70% идентична последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2;

при этом, устойчивость к Церкоспоре в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения представляет собой устойчивость к *Cercospora beticola*, или, при этом, растение в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения представляет собой растение подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, и в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - свеклу сахарную.

[2] Молекула нуклеиновой кислоты по пункту [1], отличающаяся тем, что эффект устойчивости к Церкоспоре, который придает полипептид, является доминирующим у растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, полипептид придает эффект устойчивости, по меньшей мере, на один рейтинговый балл, и в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - более, чем на один рейтинговый балл, в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на два рейтинговых балла, в особенно в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на три рейтинговых балла, и в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на четыре рейтинговых балла.

[3] Молекула нуклеиновой кислоты по пункту [1] или [2], отличающаяся тем,

что молекула нуклеиновой кислоты происходит от *Beta vulgaris* subsp. *maritima* (свекла морская).

[4] Полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [1]-[3].

[5] Вектор или кассета экспрессии, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [1]-[3], при этом, молекула нуклеиновой кислоты в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения является гетерологичной по отношению к вектору или кассете экспрессии.

[6] Клетка, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [1]-[3], или вектор или кассета экспрессии по пункту [5], при этом, молекула нуклеиновой кислоты или кассета экспрессии в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения присутствуют в виде эндогена или трансгена.

[7] Устойчивое к Церкоспоре растение или его сегмент, отличающееся тем, что растение или его сегмент содержит молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [1]-[3], в виде эндогена или трансгена, или вектор, или кассету экспрессии по пункту [5], при этом, растение, которое в виде эндогена содержит молекулу нуклеиновой кислоты, представляет собой растение вида *Beta vulgaris*, но не вида *Beta vulgaris* subsp. *maritima* или вида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*.

[8] Растение по пункту [7], отличающееся тем, что растение является гибридным растением.

[9] Растение по пункту [7] или [8], отличающееся тем, что молекула нуклеиновой кислоты присутствует в геноме растения в виде гетерозигы или гомозиготы.

[10] Семена или потомки растения по одному из пунктов [7]-[9], при этом, семя или потомок в виде трансгена или эндогена содержит молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [1]-[3], или вектор или кассету экспрессии по пункту [5].

[11] Способ повышения устойчивости растения к Церкоспоре, включающий следующие этапы:

(i) интеграцию молекулы нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [1]-[3] или вектора, или кассеты экспрессии по пункту [5] посредством гомологически направленной репарации или гомологической рекомбинации, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - посредством сайт-направленной нуклеазы, в геном, по меньшей мере, одной клетки растения и, необязательно, регенерацию растения из, по меньшей мере, одной растительной клетки; или

(ii) повышение экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [1]-[3], по меньшей мере, в одной клетке растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - посредством модификации нативного

промотора, например, содержащего последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 7, или посредством сцепления молекулы нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [1]-[3] с гетерологичным промотором, имеющим более высокий уровень активности по сравнению с нативным промотором, например, содержащим последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 7 - в частности, после заражения Церкоспорой, и, необязательно, регенерацию растения из, по меньшей мере, одной растительной клетки; или

(iii) повышение активности и/или стабильности полипептида по пункту [4] посредством модификации нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [1]-[3], по меньшей мере, в одной клетке растения и, необязательно, регенерацию растения из, по меньшей мере, одной растительной клетки; или

(iv) трансформацию растительной клетки с молекулой нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [1]-[3] или вектором, или кассетой экспрессии по пункту [5], и, необязательно, регенерацию (трансгенного) растения из трансформированной растительной клетки;

при этом, устойчивость к Церкоспоре представляет собой в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения устойчивость к *Cercospora beticola*, или, растение представляет собой в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения растение вида *Beta vulgaris*, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, и, в частности, - свеклу сахарную.

[12] Способ продуцирования растения, устойчивого к Церкоспоре, по одному из пунктов [7]-[9], включающий следующие этапы:

(a) трансформацию растительной клетки с молекулой нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [1]-[3] или вектором, или кассетой экспрессии по пункту [5], и

(b) регенерацию трансгенного растения из трансформированной растительной клетки; или

(i) введение сайт-направленной нуклеазы и репарационной матрицы в клетку растения

вида *Beta vulgaris*, при этом, сайт-направленная нуклеаза способна генерировать, по меньшей мере, один двухцепочечный разрыв ДНК в геноме клетки, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - выше и/или ниже целевой области, и репарационная матрица содержит молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [1]-[3];

(ii) культивирование клетки из этапа (i) в условиях, допускающих гомологически направленную репарацию или гомологическую рекомбинацию, при этом, молекула

нуклеиновой кислоты включена из репарационной матрицы в геном растения; и

(iii) регенерацию растения из клетки, модифицированной на этапе (ii).

[13] Способ по пункту [12], отличающийся тем, что целевая область содержит аллельный вариант молекулы нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [1]-[3], при этом, аллельный вариант кодирует полипептид, не придающий устойчивость или придающий незначительную устойчивость к Церкоспоре.

[14] Способ по пункту [12] или [13], отличающийся тем, что, по меньшей мере, один двухцепочечный разрыв происходит в положении, находящемся на удалении, составляющем не более 10 000 пар оснований выше и/или ниже целевой области, или не более 10 000 пар оснований, от аллельного варианта, как определено в пункте [13].

[15] Способ по пункту [12] или [13], отличающийся тем, что аллельный вариант молекулы нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из

(a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 6;

(b) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 5;

(c) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 4;

(d) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с нуклеотидной последовательностью, которая комплементарна нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктами (a), (b) или (c), при жестких условиях;

(e) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, который, посредством замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты аминокислотной последовательности, отличается от полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью в соответствии с пунктами (a), (b) или (c); или

(f) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 80% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 6.

[16] Растение или его сегмент, полученное или получаемое в соответствии со способом по одному из пунктов [12]-[15].

[17] Способ идентификации, и, необязательно, предложения, растения вида *Beta vulgaris*, устойчивого к Церкоспоре, отличающийся тем, что способ включает, по меньшей мере, этап (i) или (ii):

(i) определение присутствия и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по

одному из пунктов [1]-[3], или присутствия полипептида по пункту [4], в растении или сегменте растения; и/или

(ii) определение, по меньшей мере, одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [1]-[3] или в косегрегационной области; и

(iii) необязательно, отбор растения, устойчивого к *Cercospora beticola*.

[18] Способ идентификации молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, способный придавать устойчивость к Церкоспоре растению вида *Beta vulgaris*, в котором экспрессируется полипептид, отличающийся тем, что способ включает следующие этапы:

(i) сравнение аминокислотной последовательности полипептида по пункту [4] с аминокислотными последовательностями из базы данных последовательностей, или идентификацию аллельных вариантов, кодирующих полипептид по пункту [4] в генотипах вида *Beta vulgaris*;

(ii) идентификацию аминокислотной последовательности или аллельного варианта, кодирующего аминокислотную последовательность, при этом, аминокислотная последовательность, по меньшей мере, на 80% идентична аминокислотной последовательности полипептида по пункту [4];

(iii) введение молекулы нуклеиновой кислоты или аллельного варианта, кодирующего идентифицированную аминокислотную последовательность, в растение вида *Beta vulgaris*, и экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в растении; и

(iv) определение устойчивости к Церкоспоре.

[19] Способ возделывания растений вида *Beta vulgaris*, включающий

(i) предложение растений по одному из пунктов [7]-[9], продуцирование растений вида *Beta vulgaris* с помощью способа по одному из пунктов [12]-[15], или идентификацию и отбор растений рода *Beta* с помощью способа по пункту [17], и

(ii) культивирование растений из этапа (i) или их потомков,

при этом, способ препятствует заражению культивируемых растений Церкоспорой.

[20] Олигонуклеотид, состоящий из, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - из, по меньшей мере, 21, 22, 23, 24 или 25, в особенно в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - из, по меньшей мере, 30, 35, 40, 45 или 50, и, в особенно в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - из, по меньшей мере, 100, 200, 300 или 500 нуклеотидов в длину, при этом, олигонуклеотид гибридизируется с нуклеотидной последовательностью, как определено в одном из пунктов [1]-[3].

[21] Пара олигонуклеотидов, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - олигонуклеотидов по пункту [20], или набор, содержащий эти олигонуклеотиды, при этом, олигонуклеотиды подходят для гибридизации в качестве прямого праймера и обратного праймера для области в геноме *Beta vulgaris*, которая в *Beta vulgaris* имеет косегрегацию с устойчивостью к Церкоспоре, придаваемой полипептидом по пункту [4], или с молекулой нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [1]-[3].

[22] Использование молекулы нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [1]-[3] для продуцирования устойчивых к Церкоспоре растений подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*.

[23] Способ продуцирования организма, содержащего мутированную версию по пункту [1] и/или мутированную версию промотора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из

(a) SEQ ID NO: 7

(b) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся в жестких условиях с последовательностью, которая комплементарна последовательности по пункту (a)

(c) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 70% идентична последовательности, в соответствии с SEQ ID NO: 7

при этом, способ включает следующие этапы:

(I) Предложение организма или клетки, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты и/или промотор

(II) Увеличение частоты мутаций организма или клетки, или мутагенеза организма или клетки

(III) Фенотипический отбор организма, который в результате мутации демонстрирует измененную устойчивость или измененный уровень устойчивости к *Cercospora beticola*, или Генотипический отбор организма или клетки, содержащей мутацию в молекуле нуклеиновой кислоты и/или промотор, при этом, мутация была создана на этапе (II), и, необязательно,

(IV) Регенерацию организма из клетки, полученной на этапе (III).

[24] Способ по пункту [23], при этом, организм представляет собой растение.

[25] Способ по пункту [24], при этом, растение представляет собой *Beta vulgaris*, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, в более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - свеклу сахарную.

Во-первых, некоторые термины, используемые в настоящей заявке, более подробно поясняются следующим образом:

Под «рейтинговым баллом» в контексте настоящего изобретения понимается

качественная оценка устойчивости к заражению *Церкоспорой*, которая представлена с использованием шкалы от 1 до 9 (где 1 = сильная устойчивость и 9 = отсутствие устойчивости).

Таблица 1А: 9-уровневый рейтинг устойчивости к Церкоспоре

Рейтинговый балл	Фенотип листа	Фенотип целого растения
1	Здоровый лист	Здоровый лист, целый
3	Больной лист, пятна на наружных листьях	Целое растение, начало болезни, пятна на наружных листьях
5	Больной лист, слияние пятен в отмирающие участки	Целое растение, прогрессирующая болезнь, слияние пятен в отмирающие участки
7	Больной лист, большая часть листа коричневая и мертвая, только нижняя листовая пластинка еще живая	Целое растение больное, большая часть наружных листьев отмирает
9	Больные листья, листовая пластинка и черешок отмерли и высохли	Целое растение больное, наружные листья погибли, внутренние листья серьезно повреждены, сильный рост новых листьев

Род *Церкоспора* включает различные виды, например, такие виды, как *Cercospora arachidicola*, *Cercospora ariminiensis*, *Cercospora asparagi*, *Cercospora bertoreae*, *Cercospora beticola*, *Cercospora bizzozzeriana*, *Cercospora canescens*, *Cercospora carotae*, *Cercospora chenopodii*, *Cercospora cistinearum*, *Cercospora cladosporioides*, *Cercospora diazu*, *Cercospora dulcamarae*, *Cercospora erysimi*, *Cercospora hayii*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora malvacearum*, *Cercospora malvicola*, *Cercospora medicaginis*, *Cercospora oryzaem*, *Cercospora personata*, *Cercospora plantaginis*, *Cercospora ricinella*, *Cercospora setariae*, *Cercospora unamunoi*, *Cercospora violae* или *Cercospora zae-maydis*.

В сочетании с указанием длины нуклеотидной последовательности, термин «примерно» означает отклонение на +/- 200 пар оснований, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - на +/- 100 пар оснований и, в особенно в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - на +/- 50 пар оснований.

«Растение рода Beta» относится к семейству амарантовых (Amaranthaceae). Среди

этих растений есть растения видов *Beta macrocarpa*, *Beta vulgaris*, *Beta lomatogona*, *Beta macrorhiza*, *Beta corolliflora*, *Beta trigyna* и *Beta nana*. Растение вида *Beta vulgaris* представляет собой, в частности, растение подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*. Например, данный подвид включает: *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *altissima* (свекла сахарная в более узком смысле), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *vulgaris* (мангольд), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *conditiva* (свекла обыкновенная/свекла красная), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *crassialba* (свекла кормовая). Следует отметить, что нуклеиновая кислота по настоящему изобретению не встречается в природе в свекле сахарной, мангольде, свекле обыкновенной или свекле кормовой, но она может быть введена в них человеком.

Термин «функциональный фрагмент» нуклеотидной последовательности означает сегмент нуклеотидной последовательности, который обладает функциональностью, идентичной или сопоставимой с функциональностью целой нуклеотидной последовательности, из которой происходит функциональный фрагмент. Как таковой, функциональный фрагмент может иметь нуклеотидную последовательность, идентичную или гомологичную целой нуклеотидной последовательности, по меньшей мере, на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% или 99% по длине. Он также явно охватывает диапазон от 90 до 100%. Кроме того, термин «функциональный фрагмент» нуклеотидной последовательности также может означать сегмент нуклеотидной последовательности, изменяющий функциональность целой нуклеотидной последовательности, например, в ходе посттранскрипционного или транскрипционного сайленсинга генов. Как таковой, функциональный фрагмент нуклеотидной последовательности может содержать, по меньшей мере, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 или 140, и в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 последовательных нуклеотидов целой нуклеотидной последовательности. Он также явно охватывает диапазон от 21 до 50 нуклеотидов.

Термин «функциональная часть» белка означает сегмент белка или участок аминокислотной последовательности, кодирующий белок, при этом, этот сегмент может проявлять функциональность, идентичную или сопоставимую с функциональностью целого белка в растительной клетке. По длине, по меньшей мере, на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97% 98% или 99% функциональная часть белка имеет аминокислотную последовательность, которая идентична или, с учетом консервативного и полуконсервативного аминокислотных обменов, сходна с белком, из которого происходит функциональная часть.

Термин «гетерологичный» означает, что введенный полинуклеотид происходит из клетки или организма, имеющего другой генетический фон, одного и того же вида или другого вида, или он гомологичен прокариотической или эукариотической клетке-хозяину, но затем его расположили в другой генетической среде и, таким образом, он отличается от соответствующего полинуклеотида, который возможно присутствует в природе. Гетерологичный полинуклеотид может присутствовать в дополнение к соответствующему эндогенному гену.

По смыслу настоящего изобретения, под термином «гомолог» понимают белок, имеющий сходное филогенетическое происхождение, под термином «аналог» понимают белок, который проявляет сходную функцию, но имеет другое филогенетическое происхождение; под термином «ортолог» понимают белок из растения другого вида, который проявляет сходную функцию; под термином «паралог» понимают белок, который появился в виде посредством дубликации, при этом, эта копия либо сохраняет сходную функцию белка, изменяет свою матрицу экспрессии, но не функцию, изменяет функцию своего белка, либо распределяет функцию предкового гена между обеими копиями.

Под термином «гибридизация» следует понимать процесс, в котором молекула одноцепочечной нуклеиновой кислоты связывается с цепью нуклеиновой кислоты, которая до максимально возможной степени комплементарна, то есть, образует с ней пары оснований. Стандартные способы гибридизации описаны, например, в работе Сэмбрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Инструкция по проведению лабораторных работ, 3-е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, 2001. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, подразумевается, что, по меньшей мере, 60%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – по меньшей мере, 65%, 70%, 75%, 80% или 85%, и, в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% оснований молекулы нуклеиновой кислоты образуют спаривание оснований с цепью нуклеиновой кислоты, являющейся до максимально возможной степени комплементарной. Возможность такого отжига зависит от жесткости условий гибридизации. Термин «жесткость» относится к условиям гибридизации. Высокая жесткость присутствует, если спаривание оснований затруднено, а низкая жесткость присутствует, если спаривание оснований облегчено. Например, жесткость условий гибридизации зависит, например, от концентрации соли или ионной силы и температуры. Как правило, жесткость может быть повышена путем повышения температуры и/или снижения содержания соли. Под термином «жесткие условия гибридизации» понимают такие условия, при которых гибридизация происходит преимущественно только между гомологичными молекулами нуклеиновой кислоты.

Таким образом, термин «условия гибридизации» относится не только к условиям, преобладающим при фактическом добавлении нуклеиновых кислот, но также и к условиям, преобладающим во время последующих этапов промывки. Например, жесткие условия гибридизации представляют собой, условия, при которых гибридизируются преимущественно только те молекулы нуклеиновой кислоты, которые имеют, по меньшей мере, 70%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% идентичность последовательностей. Жесткими условиями гибридизации являются, например: гибридизация в 4 x SSC при температуре 65 °C с последующими многократными промывками в 0,1 x SSC при температуре 65 °C в течение, примерно, 1 час в общей сложности. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридизация происходит в жестких условиях.

В отношении нуклеиновой кислоты в форме двухцепочечной ДНК, термин «комплементарная» нуклеотидная последовательность означает, что вторая цепь ДНК, комплементарная первой цепи ДНК, имеет нуклеотиды, которые соответствуют основаниям первой цепи, в соответствии с правилами спаривания оснований. Комплементарная последовательность, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, полностью комплементарна противоположной последовательности и, таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения имеет такую же длину.

Под термином «выделенная молекула нуклеиновой кислоты» следует понимать молекулу нуклеиновой кислоты, извлеченную из ее природной или исходной среды. Этот термин также охватывает продуцированную синтетическим путем молекулу нуклеиновой кислоты. Под термином «выделенный полипептид» следует понимать полипептид, извлеченный из его природной или исходной среды. Этот термин также охватывает продуцированный синтетическим путем полипептид.

По термином «молекулярный маркер» следует понимать нуклеиновую кислоту, которая является полиморфной в популяции растений и используется в качестве эталонной или ориентирующей точки. Маркер для распознавания события рекомбинации должен подходить для мониторинга различий или полиморфизмов в популяции растений. Таким образом, такой маркер способен распознавать и различать различные аллельные состояния (аллели). Термин «молекулярный маркер» также относится к нуклеотидным последовательностям, которые комплементарны или, по меньшей мере, в большой степени комплементарны или гомологичны геномным последовательностям - например, нуклеиновым кислотам, которые используются в качестве зондов или праймеров. Эти различия на уровне ДНК должны определяться в виде маркеров, и они представляют

собой, например, различия в полинуклеотидных последовательностях, например, в SSR (*простые повторяющиеся последовательности*), RFLP (*полиморфизмы длин рестрикционных фрагментов*), FLP (*полиморфизмы длин фрагментов*) или SNP (*однонуклеотидные полиморфизмы*). Маркеры могут быть получены из геномных или экспрессируемых нуклеиновых кислот, таких как, сплайсированные РНК, кДНК или EST, и они также могут иметь отношение к нуклеиновым кислотам, которые используются в качестве зондов или пар праймеров и, как таковые, подходят для амплификации фрагмента последовательности с использованием способов на основе ПЦР. Маркеры, описывающие генетические полиморфизмы (между частями популяции), могут быть распознаны с использованием традиционных способов предшествующего уровня техники (Введение в генетический анализ, 7-е издание, Гриффитс, Миллер, Сузуки *и соавт.*, 2000). Они включают, например, секвенирование ДНК, сиквенс-специфическую амплификацию на основе ПЦР, верификацию RFLP, верификацию полинуклеотидных полиморфизмов посредством аллель-специфической гибридизации (ASH), распознавание амплифицированных переменных последовательностей генома растения, распознавание 3SR (*самоподдерживающаяся репликация последовательностей*), распознавание SSR, SNP, RFLP или AFLP (*полиморфизмы длин амплифицированных фрагментов*). Кроме того, также известны способы распознавания маркеров EST (*маркерные экспрессируемые последовательности*) и SSR, полученных из последовательностей EST и RAPD (*случайно амплифицированная полиморфная ДНК*). В зависимости от контекста, термин «маркер» в описании настоящего изобретения может также означать специфическое положение хромосомы в геноме того вида, у которого может быть выявлен специфический маркер (например, SNP).

Маркеры также включают синтетические олигонуклеотиды, которые могут быть связаны, по меньшей мере, с одной молекулой распознавания, при этом, молекулы распознавания могут использоваться для реакции распознавания или генерации сигнала в рамках способа верификации. Синтетические олигонуклеотиды также включают меченые праймеры. Синтетические олигонуклеотиды и меченые праймеры являются искусственными соединениями, они не встречаются в природе, и их нельзя выделить из природного сырья. Производство таких соединений более подробно описано ниже.

Термин «промотор» означает нетранслируемую, регуляторную последовательность ДНК, расположенную обычно выше кодирующей области, которая содержит точку связывания полимеразы РНК и инициирует транскрипцию ДНК. Промотор дополнительно содержит и другие элементы, которые действуют как регуляторный ген при экспрессии генов (например, цис-регуляторные элементы). Термин «основной или минимальный промотор» означает промотор, который имеет основные элементы, необходимые для

инициации транскрипции (например, ТАТА-бокс и/или инициатор).

Термин «патоген» означает организм, который при взаимодействии с растением вызывает симптомы болезни, по меньшей мере, в одном органе растения. Например, эти патогены включают животные, грибковые, бактериальные или вирусные организмы, или оомицеты.

Под термином «заражение патогеном» следует понимать самую раннюю временную точку, когда патоген взаимодействует с тканью растения-хозяина. В этом смысле, термин «заражение» означает возникновение контакта между патогеном и хозяином. При закреплении патогена на хозяине, например, грибной споры на поверхности листа растения, в клетке растения-хозяина запускаются механизмы распознавания патогена и передачи сигнала. В случае *Cercospora beticola*, конидии образуются при влажной теплой погоде и переносятся на соседние растения дождем и ветром. Новые случаи заражения чаще всего проявляются появлением отдельных пятен на листьях, сначала на физиологически более старых наружных листьях. Зачастую, эти пятна довольно четко отделены от здоровой ткани листа коричневым кольцом. Коричневые конидии-носители гриба в средней части пятен можно наблюдать с помощью лупы (рейтинговый балл 3). Количество этих коричневых пятен быстро увеличивается, при этом, спорокарпии изначально перекрывают даже более маленькие мертвые зоны (рейтинговый балл 5). При дальнейшем течении болезни, которое теперь распространяется и на внутренние листья, происходит наконец первое отмирание наружных листьев (рейтинговый балл 7), а затем происходит отмирание практически всех листьев (рейтинговый балл 9). Течение болезни и тяжесть симптомов в большей степени зависят от местонахождения и от ежегодно меняющихся погодных условий.

Термин «органы» растения означает, например, листья, побег, стебель, корни, гипокотиль, вегетативные почки, меристемы, зародыши, пыльники, семязачки, семена или плоды. Термин «части растения» включает, но этим не ограничивается, побег или цветоножку, листья, цветки, соцветие, корни, плоды и семена, а также пыльцу. Термин «части растения» также означает ассоциацию нескольких органов, например, цветка или семени, или части органа, например, поперечный разрез побега растения. Термин «ткани» растения означает, например, каллусную ткань, запасающую ткань, меристематическую ткань, ткань листа, ткань побега, ткань корня, ткань опухоли растения или репродуктивную ткань, а также камбий, паренхиму, сосудистую ткань, склеренхиму и эпидермис. Однако понятие ткани не ограничивается данным списком. Под термином «клетки» растения понимают, например, выделенные клетки, имеющие клеточную стенку или ее агрегаты, или протопласты.

В соответствии с настоящим изобретением, термин «регуляторная

последовательность» относится к нуклеотидной последовательности, которая влияет на специфичность и/или уровень экспрессии, например, в той мере, в какой регуляторная последовательность придает определенную тканеспецифичность. Такая регуляторная последовательность может быть расположена выше, а также ниже точки инициации транскрипции минимального промотора, например, в транскрибируемой, но нетранслируемой, лидерной последовательности или в интроне.

Термин «устойчивость» следует понимать в широком смысле, и он охватывает диапазон защиты от ретардации до полной блокировки развития болезни. Одним из примеров опасного патогена является *Cercospora beticola*. Устойчивая клетка растения по настоящему изобретению или устойчивое растение по настоящему изобретению в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения достигают устойчивости к *Cercospora beticola*. Устойчивость к патогену должна быть приравнена к устойчивости к болезни, которую вызывает этот патоген; например, устойчивость к *Cercospora beticola* также является устойчивостью к болезни пятнистость листьев. Например, повышение устойчивости можно измерить по уменьшению биомассы грибов на растении-хозяине; для этого можно определить ДНК грибов с помощью количественной ПЦР в сопоставлении с ДНК растений в зараженной растительной ткани. Дополнительным подходом к измерению устойчивости является оптический рейтинг, при этом, присваиваются рейтинговые баллы от 1 (нечувствительный) до 9 (очень чувствительный).

Термин «трансгенное растение» относится к растению, в геном которого интегрирован, по меньшей мере, один полинуклеотид. Таким образом, это может быть гетерологичный полинуклеотид. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, полинуклеотид является стабильно интегрированным, а это означает, что интегрированный полинуклеотид стабильно поддерживается в растении, экспрессируется, а также может стабильно передаваться потомкам. Стабильное введение полинуклеотида в геном растения также включает интеграцию в геном растения предыдущего родительского поколения, при этом, полинуклеотид может стабильно передаваться потомкам. Термин «гетерологичный» означает, что введенный полинуклеотид происходит, например, от клетки или организма, имеющего другой генетический фон одного и того же вида или другого вида, или он гомологичен прокариотической или эукариотической клетке-хозяину, например, но затем располагается в другой генетической среде и, таким образом, он отличается от соответствующего полинуклеотида, который возможно присутствует в природе. Гетерологичный полинуклеотид может присутствовать в дополнение к соответствующему эндогенному гену.

Термин «сырье для промышленного производства сахара» означает растительный материал, который можно поставлять на завод по производству сахара, специализирующийся на извлечении сахара из свеклы сахарной. Таким сырьем обычно является тело корнеплода свеклы (стержневой корень) собранного урожая свеклы сахарной. Для обеспечения соответствия требованиям процесса извлечения, тело корнеплода свеклы должно иметь достаточную массу, объем и коническую форму, чтобы сырье можно было механически разрезать на куски (свекловичную стружку). Эта свекольная стружка увеличивает площадь поверхности для извлечения сахара, и для эффективного извлечения, в ней должно быть низкое содержание натрия, калия и азота. После извлечения, оставшийся свекловичный жом прессуют, сушат и используют в качестве корма для животных.

«Концентрация сахарозы» выражается в процентах от сырой массы корня.

Термин «однозародышевый» означает, что из семени прорастает ровно одно растение, тогда как из многозародышевого семени (также называемого «семенной коробочкой») прорастает несколько растений.

Термин «стрелкование» означает получение цветущего стебля (или стеблей) на свекле сахарной при естественной попытке получить семена и воспроизвести растение. Стрелкование у свеклы сахарной включается из-за стресса, вызванного переохлаждением, например, из-за перезимовки. Однако выращиваемую в промышленных масштабах свеклу сахарную собирают перед стрелкованием, так как этот процесс снижает содержание сахара в свекле.

Термин «интрогрессия» означает, что нуклеотидная последовательность была перенесена в геном растения, при этом, эта нуклеотидная последовательность происходит от растения, которое не относится к тому же виду или подвиду. Это может, например, означать, что нуклеотидная последовательность, происходящая от растения подвида *Beta vulgaris maritima*, была перенесена в растение подвида *Beta vulgaris vulgaris*.

Схемы и варианты осуществления настоящего изобретения описаны в качестве примера со ссылкой на рассматриваемые последовательности и фигуры:

Фигура 1: Выравнивание белковой последовательности между белком устойчивости (белок, который придает растению устойчивость к Церкоспоре) и белком чувствительности (белок, который не придает растению устойчивость к Церкоспоре). Полиморфизмы выделены серым цветом.

Фигура 2: Выравнивание белковой последовательности между белком устойчивости (белок, который придает растению устойчивость к Церкоспоре) и белком чувствительности (белок, который не придает растению устойчивость к Церкоспоре). Полиморфизмы выделены серым цветом.

Фигура 3: Векторная карта вектора pZFN-nptII, включая область LRR.

Фигура 4: Статистическая оценка в виде коробчатой диаграммы данных, сгенерированных через восемь дней после заражения во время трансгенной верификации гена устойчивости.

Фигура 5: Статистическая оценка в виде коробчатой диаграммы данных, сгенерированных через одиннадцать дней после заражения во время трансгенной верификации гена устойчивости.

Фигура 6: Статистическая оценка в виде коробчатой диаграммы данных, сгенерированных через восемь дней после заражения во время трансгенной верификации гена устойчивости.

Фигура 7: Статистическая оценка в виде коробчатой диаграммы данных, сгенерированных через пятнадцать дней после заражения во время трансгенной верификации гена устойчивости.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая способна придавать устойчивость к Церкоспоре растению, в частности, к *Cercospora beticola*, в котором экспрессируется полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, патоген представляет собой грибок *Cercospora beticola*, который, является одним из наиболее опасных и деструктивных патогенов листьев свеклы сахарной, свеклы обыкновенной и мангольда, и он может, среди прочего, вызывать потери урожая, превышающие 40%. Грибок продуцирует вторичный метаболит церкоспорин, который вступает в реакцию с кислородом в присутствии света и приводит к образованию активных форм кислорода (АФК). АФК вызывают массивное повреждение клеток в ткани листьев зараженного растения, которое проявляется в форме некрозов.

Настоящее изобретение основано на тонком генетическом картировании, идентификации, выделении и характеристике гена или генного локуса, который происходит от донора *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, присутствие которого в растении, в частности, в *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, коррелирует или является причиной устойчивости соответствующего растения к болезни пятнистость листьев, вызываемой Церкоспорой. Исходный материал представлял собой популяцию *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, разработанную из 37 образцов *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, полученных от разных источников.

Нуклеотидная и аминокислотная кодирующая последовательность молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению характеризуется множественными полиморфизмами, что отличает ген NPS-LRR, идентифицированный по настоящему

изобретению, от «чувствительного» варианта гена, то есть, гена, не придающего устойчивости к Церкоспоре. Примеры полиморфизмов представлены на Фигуре 1.

Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может быть выделенной молекулой нуклеиновой кислоты. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - это ДНК, и в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - кДНК (кодирующая ДНК). Полипептид, который кодируется молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения придает устойчивость к патогену *Cercospora beticola*, вызывающему у растений болезнь пятнистость листьев. Кроме того, полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, придает, в частности, растениям рода *Beta*, устойчивость к этому патогену. Растение в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения представляет собой растение вида *Beta vulgaris*, в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - растение подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, среди них, например, такие сорта, как свекла сахарная, свекла обыкновенная, свекла кормовая, мангольд и Швейцарский мангольд.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 3, и/или кодирующую последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 2. Кроме того, настоящее изобретение предлагает нуклеотидную последовательность, которая содержит последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 53.

Ген, идентифицированный по настоящему изобретению, представляет собой ген/белок устойчивости типа NBS-LRR, который характеризуется специфическими структурными мотивами. Общая структура таких белков устойчивости у растений уже хорошо изучена (Мартин *и соавт.*, Annual Review Plant Biology 54 (2003), 23-61). Однако принцип структурного осуществления, в частности, так называемый домен LRR, который применяется в качестве потенциального домена распознавания для большинства неизвестных патогенных эффекторов, непредсказуем, и функциональный фон генов устойчивости, то есть, генетическая структура, как правило, в большей степени неизвестна. Следовательно, идентификация гена или белка, придающего устойчивость к Церкоспорозе, исключительно на основе известного структурного мотива, невозможна. Кроме того, оказалось, что область последовательности является высокоповторяющейся областью, которая содержит, среди прочего, *тандемные повторы* с очень высокой степенью гомологии последовательностей, что делает разработку диагностических

маркеров, а также формирование совокупности данных о последовательностях, особенно трудным.

С помощью комплекта популяции из более чем 4000 делящихся потомков и разработки специальных рекомбинационных скринингов, целевая область была уменьшена и, таким образом, в дальнейшем даже изолирована, посредством анализа информативных рекомбинантов (генотипических и фенотипических) в серии испытаний устойчивости. Это генетическое картирование, а также создание физических карт, сопровождаемое секвенированием WHG («полногеномное секвенирование»), сравнительным секвенированием ВАС (Вас-by-Вас) и биоинформаторными анализами, привели к идентификации трех рекомбинантных генотипов, которые подтвердили ген устойчивости (1 рекомбинант в соседнем гене, с одной стороны, и 2 рекомбинанта в соседнем гене, с другой стороны). В свете особых требований, авторы изобретения поместили высокоповторяющуюся структуру в целевую область, которая, среди прочего, содержит *тандемные повторы* с очень высокой степенью гомологии последовательностей, что значительно затруднило разработку маркера и, следовательно, идентификацию информативных рекомбинантов. Следующие этапы были особенно решающими для местоположения генетической структуры гена устойчивости:

- Разработка маркеров s4p0264s01, s4p2271s01, sxh0678s01, s4p4293s01, s4p4295s01, s4p4301s01 (см. Таблицу 1В).

- Тонкое картирование в сочетании с интенсивным фенотипированием. Фенотипы были верифицированы с использованием 90-180 потомков на одно растение в испытании, проводимом в условиях теплицы, и с использованием интенсивных статистических методов (например, t-испытание, анализ мощности и так далее).

- Идентификация ВАС-клона и секвенирование из ВАС-пулов устойчивого генотипа.

- Оценка последовательности, а также сравнение последовательности и белка по генотипам RR (то есть, устойчивым) и ss (то есть, чувствительным); таким образом, формирование ясно выраженной совокупности данных о генотипов RR и ss последовательностей не всегда было возможно из-за сложности последовательностей.

Таблица 1В: Маркер в целевой области; информация в квадратных скобках [X/Y] обозначает

диагностический SNP, при этом, X идентифицирует чувствительный генотип, а Y - устойчивый генотип.

Маркер	Последовательность [чувствительная / устойчивая / консенсусная]	Положение на генетической карте [сМ]	Положение на физической карте [пар оснований]
s4p0264s01	SEQ ID NO: 54 / SEQ ID NO: 55 / SEQ ID NO: 10	62,79590373	57208510
s4p2271s01	SEQ ID NO: 56 / SEQ ID NO: 57 / SEQ ID NO: 11	62,81185523	57212240
s4p4293s01	SEQ ID NO: 58 / SEQ ID NO: 59 / SEQ ID NO: 12	62,84491806	57219956
s4p4295s01	SEQ ID NO: 60 / SEQ ID NO: 61 / SEQ ID NO: 13	62,85399055	57222060
s4p4301s01	SEQ ID NO: 62 / SEQ ID NO: 63 / SEQ ID NO: 14	62,94635089	57243521
sxh0678s01	SEQ ID NO: 64 / SEQ ID NO: 65 / SEQ ID NO: 15	62,97474964	57250119

Соединения, представленные в Таблице 1B, можно использовать в качестве молекулярных маркеров по настоящему изобретению.

Анализы показали, что ген LRR имеет умеренную гомологию белка с белком устойчивости к Cf-2 из томата (UNIPROT|Q41397_SOLPI P. Cf-2.1) (идентичность последовательности 322/830=38%). Фактически, идентифицированный белок, придающий устойчивость к Церкоспоре, является лучшим гомологом белка свеклы сахарной для белка устойчивости томата Cf-2. Белок устойчивости Cf-2 из томата придает устойчивость к *Cladosporium fulvum* - разновидности черного плесневого гриба (US 6,287,865 B1) - посредством взаимодействия с белком авирулентности Avr2 из *C. fulvum*. Это приводит к активации иммунной защиты растения от патогена; см. Диксон *и соавт.*, 1996 (Диксон, Марк С., *и соавт.*, «Локус устойчивости к болезни белка томата Cf-2 содержит два функциональных гена, кодирующих белки с высоким содержанием лейцина». *Cell* 84.3 (1996): 451-459). Следует предположить, что из-за гомологии последовательностей между геном Cf-2 и идентифицированным геном LRR - но без привязки к одной теории - сходный защитный механизм, лежащий в основе устойчивости к Церкоспоре, также имеет место в случае со свеклой сахарной. Однако из-за умеренной гомологии последовательностей нельзя исключать и другой механизм.

Кроме того, в нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению могут быть введены замещения, делеции, вставки, добавления и/или любое другое изменение, которые, по отдельности или в комбинациях, фактически изменяют нуклеотидную последовательность, при этом, однако, модифицированная нуклеотидная

последовательность может выполнять ту же функцию, что и исходная последовательность. В рассматриваемом случае речь идет о кодировании аминокислотной последовательности, которая придает устойчивость к болезни пятнистость листьев. Таким образом, следующий вариант осуществления настоящего изобретения включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который представляет собой производное полипептида, который кодируется нуклеотидной последовательностью по настоящему изобретению, или который включает аминокислотную последовательность по настоящему изобретению. Производная аминокислотная последовательность, которая имеет, по меньшей мере, одно замещение, делецию, вставку или добавление, по меньшей мере, одной аминокислоты, при этом, функциональность кодируемого полипептида/белка сохраняется, представляет собой производное полипептида. Замещения, делеции, вставки, добавления и/или любое другое изменение, либо по отдельности, либо в комбинациях, которые фактически изменяют нуклеотидную последовательность, но выполняют ту же функцию, что и исходная последовательность, могут быть, таким образом, введены в нуклеотидную последовательность с использованием традиционных методов, известных в предшествующем уровне техники, например, посредством сайт-направленного мутагенеза, ПЦР-опосредованного мутагенеза, транспозонного мутагенеза, редактирования генома и так далее.

Замещение одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей такие же или эквивалентные, или сходные химические/физические свойства, называется «консервативным замещением» или «полуконсервативным замещением». Примерами физических/химических свойств аминокислоты являются, например, гидрофобность или заряд. О том, какое аминокислотное замещение представляет собой консервативное или полуконсервативное замещение, известно специалисту в данной области техники. Кроме того, накопленные знания позволяют специалисту в данной области техники узнавать, идентифицировать и распознавать, какие аминокислотные делеции и добавления безвредны для функциональности белка устойчивости, и в каких положениях они возможны. Специалисту в данной области техники известно, что в случае рассмотрения белка NBS-LRR для модификаций аминокислотной последовательности (замещения, делеции, вставка или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты), функциональность, в частности, консервативных доменов, должна быть сохранена, и поэтому в этих доменах возможны только ограниченные предшествующие модификации.

Таким образом, настоящее изобретение включает функциональный фрагмент нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению. Термин «фрагмент», таким образом, включает гены с нуклеотидной последовательностью, достаточно сходной с вышеупомянутой нуклеотидной последовательностью. Термин «достаточно сходная»

означает, что первая нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность имеет достаточное или минимальное количество идентичных или эквивалентных нуклеотидов, или аминокислотных групп относительно второй нуклеотидной последовательности или второй аминокислотной последовательности.

Что касается аминокислотной последовательности, то после модификации с помощью вышеупомянутого способа, у нее также имеется общий структурный домен, и/или она обладает общей функциональной активностью. Нуклеотидные последовательности или аминокислотные последовательности, имеющие идентичность, составляющую, по меньшей мере, примерно, 70%, по меньшей мере, примерно, 99% или, по меньшей мере, примерно, 100% с нуклеотидной последовательностью или аминокислотной последовательностью по настоящему изобретению, определены в настоящем документе как достаточно сходные. Идентичность также явно охватывает диапазон от 90% до 100%. Для функциональных фрагментов устанавливается достаточное сходство, если нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность как правило имеет то же свойство, что и ранее названная нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность по настоящему изобретению. Те нуклеотидные последовательности, которые кодируют производное или производную аминокислотную последовательность, генерируются либо непосредственно, либо опосредованно (например, посредством амплификации или этапов репликации) из исходной нуклеотидной последовательности, которая соответствует нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению по всей длине, или, по меньшей мере, частично.

Соответственно, настоящее изобретение включает нуклеотидную последовательность, которая способна гибридизоваться в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению, или с нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислотную последовательность по настоящему изобретению.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению отличается тем, что после экспрессии в растении, она уже сама по себе придает доминирующий эффект устойчивости к патогену, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - к *Cercospora beticola*, или тем, что она кодирует полипептид, который способен придавать доминирующий эффект устойчивости к Церкоспоре. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты или полипептид придает эффект устойчивости, по меньшей мере, на один рейтинговый балл, в

предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на два рейтинговых балла и, в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - на три-четыре рейтинговых балла. Такой ген, который уже сам по себе придает растению столь ярко выраженную устойчивость к Церкоспоре или кодирует полипептид, способный придавать такую выраженную устойчивость, не известен из предшествующего уровня техники. Как уже было описано выше, у сортов, прежде доступных на рынке, устойчивость к Церкоспоре передается через множество генов устойчивости, оказывающих незначительный эффект, и недостатком таких сортов является то, что их разработка идет очень медленно и является дорогостоящей из-за сложной передачи, и то, что в отсутствие заражения, такие сорта имеют значительно более низкую урожайность по сравнению с обычными сортами. Среди прочего, это может быть связано с эпигенетическим взаимодействием некоторых генов устойчивости с генами, отвечающими за производство сахара, что приводит к снижению выносливости растений, в отсутствие патогена.

Таким образом, авторы изобретения смогли впервые предложить ген устойчивости к Церкоспоре, который можно использовать для существенно упрощенной селекции растений. Благодаря включению этого гена в элитные линии, теперь можно очень быстро разработать высокоурожайные сорта с высокой устойчивостью к Церкоспоре. Соответственно, в рамках настоящего изобретения впервые предложены растение свекла сахарная, растение мангольд, растение свекла красная или свекла обыкновенная, растение свекла кормовая, обладающие устойчивостью по настоящему изобретению к *Cercospora beticola*, и, таким образом, они охвачены настоящим изобретением. Поскольку все перечисленные растения представляют собой культивируемые растения, культуры или растения, подходящие для культивирования в сельском хозяйстве, и обладающие устойчивостью по настоящему изобретению, то они являются частью настоящего изобретения. В частности, частью настоящего изобретения являются такие культуры, которые содержат подземный запасующий орган, используемый в качестве пищи, сырья или промышленного источника сахара, и которые обладают устойчивостью по настоящему изобретению; эти культуры являются другим аспектом настоящего изобретения. Запасующим органом может быть, например, сахаросодержащее тело корнеплода свеклы сахарной, потребляемое тело корнеплода свеклы красной или питательное тело корнеплода свеклы кормовой. Подземный запасующий орган может составлять более 50%, а для свеклы сахарной даже более 70% от общей массы полноценного взрослого растения. Кроме того, семена или семенной материал этих растений также являются частью настоящего изобретения. Семена или семенной материал можно технически обработать, как описано далее ниже.

В данном контексте, настоящее изобретение также включает нуклеиновую кислоту, кодирующую белок в соответствии с SEQ ID NO: 3, при этом, в конкретном варианте осуществления настоящего изобретения встречающаяся в природе нуклеиновая кислота в соответствии с SEQ ID NO: 1 исключена.

Кроме того, настоящее изобретение относится к рекомбинантной и/или гетерологичной молекуле ДНК, которая содержит последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Кроме того, эта молекула ДНК в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения имеет регуляторную последовательность. Таким образом, она может быть оперативно сцеплена с этой регуляторной последовательностью или находиться под влиянием этой регуляторной последовательности. Эта регуляторная последовательность в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения представляет собой промоторную последовательность и/или другие последовательности элементов контроля транскрипции или трансляции, например, цис-элементов. Регуляторная последовательность, контролирующая экспрессию гена, который включает молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения представляет собой последовательность, способную придавать или модулировать экспрессию в результате заражения патогеном. Этот промотор в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способен контролировать экспрессию последовательности ДНК конкретно в листьях растения. Регуляторная последовательность может быть гетерологичной по отношению к экспрессирующей последовательности. Преимущество такого подхода состоит в том, что специалист в данной области техники может лучше регулировать скорость экспрессии экспрессирующей последовательности, ткань, в которой происходит экспрессия, и временную точку, в которой происходит экспрессия, в том смысле, что он выбирает ту регуляторную последовательность, которая лучше всего подходит для использования в соответствующем случае. Последовательность гетерологичной ДНК в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения включает нуклеотидную последовательность, кодирующую компонент защиты растения от патогенов (например: гены устойчивости (R-гены) или гены, кодирующие ферменты, участвующие в передаче сигнала, такие как киназы или фосфатазы, и для G-белка, или которые кодируют патогенный эффектор (так называемые гены авирулентности (*avr*)). Последовательность гетерологичной ДНК может представлять собой одну из последовательностей ДНК по настоящему изобретению. Последовательность гетерологичной ДНК может также дополнительно кодировать другие компоненты защиты растения от патогенов. Следовательно, последовательность гетерологичной ДНК может быть спроектирована

таким образом, чтобы полицистронная мРНК создавалась после ее транскрипции.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к полипептиду, который может кодироваться молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, и к его функционально и/или иммунологически активному фрагменту, а также к антителу, которое специфически связывается с полипептидом или с его фрагментом. В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения полипептид имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 3. Производство рекомбинантных белков, полипептидов и фрагментов знакомо специалисту в данной области техники (Сэмбрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Инструкция по проведению лабораторных работ, 3-е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, 2001, или Вингфилд, П.Т., 2008, Производство рекомбинантных белков, текущие протоколы в науке о белках, 52:5.0:5.0.1-5.0.4). Поликлональные или моноклональные антитела к белку по настоящему изобретению могут быть произведены специалистом в данной области техники в соответствии с известными способами (Э. Харлоу *и соавт.*, редактор, Антитела: Инструкция по проведению лабораторных работ (1988)). Производство моноклональных антител, а также фрагментов Fab и F(ab')₂, которые также можно использовать в способах распознавания белков, можно осуществлять различными традиционными способами (Кодирование, моноклональные антитела: Принципы и практика, стр. 98-118, Нью-Йорк: Academic Press (1983)). Затем антитела можно использовать для скрининга экспрессионных библиотек кДНК, чтобы идентифицировать идентичные, гомологичные или гетерологичные гены посредством иммунологического скрининга (Сэмбрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Инструкция по проведению лабораторных работ, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, 1989, или Осубель *и соавт.*, 1994, «Текущие протоколы в молекулярной биологии». John Wiley & Sons), или их можно использовать для анализов Вестерн-блоттинга. В частности, настоящее изобретение относится к антителам, которые селективным образом распознают полипептид, кодируемый аллелем, придающим устойчивость к Церкоспоре, по настоящему изобретению, и по существу не распознают полипептид, кодируемый соответственно чувствительным аллелем, то есть, они распознают в 2 раза меньше, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - в 5 раз меньше, и в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, в 10 раз меньше, полипептидов, кодируемых соответственно чувствительным аллелем, чем полипептид, кодируемый аллелем, придающим устойчивость Церкоспоре, по настоящему изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело по

настоящему изобретению отличается тем, что оно представляет собой синтетический полипептид, который не встречается в природе.

Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут быть сцеплены с флуоресцентным красителем с тем, чтобы их можно было использовать, например, в иммуногистохимическом методе, и чтобы они могли вызвать окрашивание антител. Флуоресцентный краситель может представлять собой флуорохром. Антитела по настоящему изобретению также могут присутствовать будучи сцепленными с другими сигнальными молекулами. Среди них, например, биотин, радиоизотопы, репортерные ферменты, например, щелочная фосфатаза, или олигонуклеотиды.

Дополнительным объектом настоящего изобретения являются векторы или кассеты экспрессии, включающие молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу рекомбинантной ДНК по настоящему изобретению - возможно, под контролем регуляторных элементов и, в частности, под контролем функциональных регуляторных элементов в растениях, а также маркеров негативного и/или позитивного отбора. Таким образом, остов вектора является гетерологичным по отношению к молекуле нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, а это означает, что такой вектор не встречается в природе и не может быть выделен из природной среды. Вектор представляет собой плазмиду, космиду, бактериофаг или экспрессионный вектор, трансформирующий вектор, шаттл-вектор или клонирующий вектор; он может быть двухцепочечным или одноцепочечным, линейным или кольцевым; или он может трансформировать прокариотический или эукариотический организм либо посредством интеграции в его геном, либо экстрахромосомально. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты или молекула ДНК по настоящему изобретению функционально сцеплена в экспрессионном векторе или в кассете экспрессии, по меньшей мере, с одной регуляторной последовательностью, которая позволяет осуществлять транскрипцию и, необязательно, экспрессию в прокариотической или эукариотической клетке; (Сэмбрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Инструкция по проведению лабораторных работ, 3-е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, 2001). В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, эти регуляторные последовательности представляют собой промоторы или терминаторы, в частности, начальную точку инициации транскрипции, место связывания рибосом, сигнал процессинга РНК, место терминации транскрипции и/или сигнал полиаденилирования. Например, молекула нуклеотидной последовательности в настоящем документе находится под контролем подходящего промотора и/или терминатора. Подходящие промоторы могут быть конститутивными промоторами (пример: промотор 35S из «Вируса мозаики цветной капусты») (Оделл *и соавт.*, Nature 313 (1985), 810-812); особенно подходящими являются те

промоторы, которые являются патоген-индуцируемыми (пример: промотор PR1 из петрушки (Раштон *и соавт.*, ж. EMBO 15 (1996), 5,690-5,700)). Особенно подходящими патоген-индуцируемыми промоторами являются синтетические или химерные промоторы, которые не встречаются в природе, и которые состоят из множества элементов, а также содержат минимальный промотор, и выше минимального промотора у них имеется, по меньшей мере, один *цис*-регуляторный элемент, причем, по меньшей мере, один *цис*-регуляторный элемент служит местом связывания для специальных факторов транскрипции. Химерные промоторы могут быть спроектированы в соответствии с желаемыми требованиями и индуцированы или репрессированы посредством различных факторов. Примеры таких промоторов можно найти в документах WO 00/29592, WO 2007/147395 и WO 2013/091612. Например, подходящим терминатором является терминатор нопалин-синтазы (Демикер *и соавт.*, ж. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 561-573). Подходящими промоторами и терминаторами также могут являться нативный промотор и нативный терминатор, последовательности ДНК которых воспроизводятся в SEQ ID NOs: 7 и 8. Векторы или кассеты экспрессии дополнительно содержат традиционные индикаторные/репортерные гены или гены устойчивости для распознавания переноса желаемого вектора или молекулы ДНК/молекулы нуклеиновой кислоты, а также для отбора индивидуумов, которые их содержат, поскольку непосредственное распознавание посредством экспрессии гена является, по большей части, довольно трудным. Поскольку молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в рассматриваемом случае сама кодирует полипептид, придающий устойчивость к болезни пятнистость листьев, то предложение дополнительного гена устойчивости не является существенным для экспрессии в растительных клетках; однако это рекомендуется для быстрого отбора.

Примерами индикаторных/репортерных генов являются, например, ген люциферазы и ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP). Кроме того, они также позволяют проводить испытания на активность и/или регуляцию промотора гена. Примерами генов устойчивости - особенно для трансформаций растений - являются ген неомицинофосфотрансферазы, ген гигромицинофосфотрансферазы или ген, кодирующий фосфинотрицинацетилтрансферазу. Дополнительные маркеры позитивного отбора могут представлять собой ферменты, обеспечивающие трансформированному растению преимущество при отборе перед нетрансформированным растением, в частности, преимущество в плане наличия питательных веществ, например, маннозо-6-фосфат-изомеразу или ксилоизомеразу. Однако это не исключает присутствия дополнительных индикаторных/репортерных генов или генов устойчивости, известных специалисту в данной области техники. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вектор представляет собой вектор растения. Кроме того, кассета экспрессии

может присутствовать в виде кассеты, интегрированной в геном растения.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к клеткам, включающим векторы, молекулы рекомбинантной ДНК и/или молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. По смыслу настоящего изобретения, клетка может представлять собой прокариотическую (например, бактериальную) или эукариотическую клетку (например, растительную клетку или дрожжевую клетку). В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой агробактерию, например, *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes*, клетку *Escherichia coli* или растительную клетку; в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения растительная клетка представляет собой клетку растения рода *Beta*, вида *Beta vulgaris* или подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*. Клетка также может присутствовать в виде культуры. Следовательно, настоящее изобретение также охватывает культуру клеток, которая содержит такие клетки. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения культура клеток представляет собой чистую культуру или изолят, не содержащий клеток другого типа.

Специалисту в данной области техники известны как многочисленные способы, такие как конъюгация или электропорация, посредством которых он может вводить молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, молекулу рекомбинантной ДНК и/или вектор, или кассету экспрессии по настоящему изобретению в агробактерию, так и способы, такие как различные способы трансформации (биолистическая трансформация, трансформация, опосредованная агробактерией), посредством которых он может вводить молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, молекулу ДНК и/или вектор по настоящему изобретению в растительную клетку (Сэмбрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Инструкция по проведению лабораторных работ, 3-е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, 2001).

Кроме того, в предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к растению, устойчивому к Церкоспоре, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - к растению вида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* или к его сегменту, которое содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая придает устойчивость к Церкоспоре. Растение, устойчивое к Церкоспоре, может содержать молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в виде трансгена или эндогена. В рамках объема настоящего изобретения впервые были получены растения подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также включает растения подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в качестве эндогена.

Таким образом, сегмент может представлять собой клетку, ткань, орган или комбинацию множества клеток, тканей или органов. Комбинация нескольких органов представляет собой, например, цветок или семя. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения растение, устойчивое к Церкоспоре, по настоящему изобретению проявляет более высокую устойчивость к Церкоспоре, в частности, - к *Cercospora beticola*, чем соответствующее растение, которое не содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению (контрольное растение). Контрольное растение в идеале имеет тот же генотип, что и трансгенное растение, и его культивировали в идентичных условиях, но оно не содержит молекулы нуклеиновой кислоты, придающей устойчивость. Уровень устойчивости, например, к *Cercospora beticola*, может быть установлен качественным образом у растений рода Beta путем определения рейтинговых баллов. Более высокая устойчивость проявляется в повышении устойчивости, по меньшей мере, на один рейтинговый балл, по меньшей мере, на два рейтинговых балла и, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на три или более рейтинговых баллов.

Растительная клетка или растение, или его сегмент по настоящему изобретению, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, в частности, растение рода Beta, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения проявляет более высокую устойчивость к патогену, в частности, к *Cercospora beticola*, чем соответствующая растительная клетка или растение, или их сегмент, который не содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или содержит чувствительный аллельный вариант молекулы нуклеиновой кислоты. Уровень устойчивости, например, к *Cercospora beticola*, может быть установлен качественным образом у растений рода Beta путем определения рейтинговых баллов. Более высокая устойчивость проявляется в повышении устойчивости, по меньшей мере, на один рейтинговый балл, по меньшей мере, на два рейтинговых балла и, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на три или более рейтинговых баллов.

В случае трансгенной растительной клетки или растения, или его сегмента, он содержит молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу ДНК по настоящему изобретению в виде трансгена или вектора, или кассеты экспрессии по настоящему изобретению. Такая трансгенная растительная клетка или растение, или его сегмент представляет собой, например, растительную клетку или растение, или его сегмент, который трансформирован, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - стабильно трансформирован молекулой нуклеиновой кислоты, молекулой ДНК по настоящему изобретению или вектором, или кассетой экспрессии по настоящему

изобретению. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты функционально сцеплена, по меньшей мере, с одной регуляторной последовательностью, которая позволяет проводить транскрипцию и, необязательно, экспрессию в растительной клетке. Общая структура, состоящая из молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и регуляторной последовательности (последовательностей) в последствии представляет собой трансген. Такие регуляторные последовательности представляют собой, например, промотор или терминатор. Специалисту в данной области техники известны многочисленные функциональные промоторы и терминаторы, применяемые в растениях.

Изобретение также включает вакуоль клетки по настоящему изобретению и содержащиеся в ней вещества.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к клеточному экстракту, полученному из клетки, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – из растительной клетки, в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – из клетки *Beta vulgaris*, и в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – из клетки одной из следующих сельскохозяйственных культур: свеклы сахарной, мангольда или свеклы обыкновенной. Ни одно растение не может быть регенерировано из клеточного экстракта.

Аналогичным образом настоящее изобретение охватывает геном растения, содержащий нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению. Ни одно растение не может быть регенерировано из генома растения.

Таким образом, концентрация сахара из клеточного экстракта может быть увеличена относительно клетки, которая не является клеткой по настоящему изобретению, но которая относится к тому же виду или культуре. Это применимо, в частности, к условиям, когда происходит заражение *Церкоспорой*.

Также настоящее изобретение охватывает использование клеточного экстракта для производства сахара (сахарозы) или для производства сока, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – свекольного сока.

Аналогичным образом, настоящее изобретение охватывает сахар, в частности, сахарозу, содержащуюся в клетках по настоящему изобретению и в их вакуолях.

Дополнительным аспектом настоящего изобретения является семенной материал, содержащий семена, содержащие нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению. Нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может присутствовать в виде трансгена или эндогена. Семенной материал и семена могут быть технически обработаны. Таким образом, настоящее изобретение также содержит технически обработанный семенной материал и технически обработанные семена. Подробное объяснение различных

вариантов технически обработанного семенного материала приведено ниже, при этом, термин «семенной материал» также включает семена. Технически обработанный семенной материал может присутствовать в шлифованной форме. Таким образом, удаляется наружный слой семени, в результате чего семя принимает более округлую форму. Это полезно при посеве, поскольку оптимально однородная форма приводит к равномерному распределению зерен семенного материала. Кроме того, технически обработанный семенной материал охватывает дражированный семенной материал. Таким образом, семенной материал помещается в дражированную массу, которая защищает содержащийся в ней семенной материал и приводит к увеличению массы, в результате чего дражированный семенной материал проявляет большую устойчивость к сносу под воздействием ветра и, таким образом, менее подвержен сдуванию ветром, и в то же время обеспечивается более точное позиционирование во время посева. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения все дражированные зерна семенного материала серии или единицы поставки, предназначенной для продажи, имеют по существу одинаковую форму и одинаковую массу. Возможны отклонения 5% по диаметру и массе. Однако в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения отклонения не превышают 1%. В качестве одного из основных компонентов, дражированная масса может содержать, например, минеральное соединение, такое как, например, глина, бентонит, каолин, гумус и/или торф. Можно добавить адгезивный материал, такой как полиацетат. Дополнительные возможные компоненты указаны в публикации US 4,067,141. Кроме того, дражированная масса может содержать дополнительные химические агенты, которые положительно влияют на культивирование на практике. В данном случае, это могут быть вещества, которые относятся к числу удобряющих агентов. К ним относятся соединения, богатые, по меньшей мере, одним из следующих элементов: азотом, фосфором и калием (макронутриенты). Поэтому, ингредиенты удобряющих веществ могут содержать, например, нитратный азот, аммонийный азот, нитрат магния, кальций-аммиачную селитру, моноаммонийфосфат, монокалийфосфат и калиевую селитру. Кроме того, дражированная масса может содержать фунгициды, инсектициды и/или антифидинги. Фунгициды могут представлять собой тирам и/или гимексазол, и/или другие фунгициды. Инсектицид может представлять собой вещество из группы неоникотиноидов. Вещество из группы неоникотиноидов в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения представляет собой имидаклоприд (Код АТХ (Код по анатомической, терапевтической, химической системе классификации): QP53AX17) и/или клотианидин (номер CAS 210880-92-5). Кроме того, инсектицид может также представлять собой цифлутрин (номер CAS 68359-37-5), бета-цифлутрин или тефлутрин. Следует отметить, что соединения, входящие в состав

протравленной или дражированной массы, усваиваются растением и проявляют системный эффект, обеспечивая тем самым надлежащую защиту всего растения. Таким образом, растения, полученные из дражированного семени, включая, по меньшей мере, один пестицид, отличаются от растений природного происхождения и демонстрируют лучшую эффективность в условиях биотического стресса. В данном контексте, настоящее изобретение также охватывает смесь дражированной массы и семени по настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение также охватывает способ получения дражированного семени по настоящему изобретению, содержащий следующие этапы:

- a) предложение семени растения свеклы сахарной, содержащего нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению,
- b) внедрение семени растения свеклы сахарной в дражированную массу,
- c) сушку дражированной массы, при этом, семя, необязательно, может представлять собой семя, подвергнутое праймингу, или предварительно проросшее семя, или семя может быть подвергнуто праймингу на этапе b).

Дражированный семенной материал является конкретным вариантом осуществления протравленного семенного материала. В данном контексте, технически обработанный семенной материал также охватывает протравленный семенной материал. Однако настоящее изобретение не ограничивается дражированным семенным материалом, наоборот, оно может быть применено с любой формой протравленного семенного материала. Настоящее изобретение, таким образом, также относится к протравленному семенному материалу, который включает дражированный семенной материал, но этим не ограничивается. Таким образом, оно охватывает также сухое протравливание, влажное протравливание и суспензионное протравливание.

Таким образом, протравливание может также содержать, по меньшей мере, один краситель (окрашивание), в результате чего протравленный семенной материал можно быстро отличить от непротравленного семенного материала, и, кроме того, после посева, его хорошо видно в окружающей среде. Протравливание может также содержать те же агрохимикаты, которые описаны в контексте гранулированной массы. Настоящее изобретение включает, таким образом, такой протравленный семенной материал, при котором протравливание содержит, по меньшей мере, один антифидинг, в частности, инсектицид и/или, по меньшей мере, один фунгицид. Необязательно, может быть применено так называемое электроническое протравливание (протравливание с применением электрической энергии). Однако электронное протравливание не является протравливанием в строгом смысле этого слова.

Дополнительной формой технически обработанного семенного материала является инкрустированный семенной материал. В данном контексте также говорится о том, что

называют глазированием, а также о семенном материале, обработанном глазированием. Отличие от дражированного семенного материала заключается в том, что посевные зерна сохраняют свою первоначальную форму, при этом, этот способ является особенно экономичным. Этот способ описан, например, в публикации EP 0 334 258 A1. Дополнительной формой технически обработанного семенного материала является пророщенный или подвергнутый праймингу семенной материал. Пророщенный семенной материал предварительно обрабатывают предварительным проращиванием, в то время как семенной материал, подвергнутый праймингу, уже был предварительно обработан праймингом («проращивание»). Преимущество предварительно пророщенного и подвергнутого праймингу семенного материала заключается в более коротком сроке появления всходов. Кроме того, момент появления всходов после посева сильнее синхронизирован. Это обеспечивает лучшую агротехническую обработку при культивировании и особенно при сборе урожая, а также дополнительно увеличивает количество урожая. При предварительном проращивании, семенной материал проращивают до тех пор, пока корешок не выйдет из оболочки семенного материала, и процесс впоследствии прекращается. При прайминге, процесс прекращается до того, как корешок выйдет из оболочки семенного материала. По сравнению с предварительным проращиванием семенного материала, семенной материал, подвергнутый праймингу, нечувствителен к стрессу повторной сушки, и после такой повторной сушки он имеет более длительный срок хранения, по сравнению с предварительно пророщенным семенным материалом, для которого повторная сушка обычно не рекомендуется. В данном контексте, технически предварительно обработанный семенной материал также включает подвергнутый праймингу и повторно высушенный семенной материал. Объяснение процесса предварительного проращивания приведено в публикации US 4,905,411 A. Объяснение различных вариантов осуществления прайминга приведено в публикации EP 0 686 340 A1. В дополнение к этому, в одном процессе также возможно одновременно провести гранулирование семенного материала и подвергнуть его праймингу. Этот способ описан в публикации EP 2 002 702 B1. Настоящее изобретение охватывает подвергнутый праймингу семенной материал, который при этом еще и дражирован.

Технически обработанный семенной материал может быть дополнительно наделен, по меньшей мере, одним типом устойчивости к гербицидам, как описано выше. Это позволяет дополнительно улучшить агротехническое культивирование, поскольку технически обработанный семенной материал можно использовать на поле, которое ранее было обработано средством для уничтожения сорняков и, следовательно, не содержит сорняков.

Кроме того, настоящее изобретение также охватывает смесь, содержащую семенной материал по настоящему изобретению или семена по настоящему изобретению, и протравленную массу, как определено выше. Таким образом, протравленная масса, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, воплощена в виде дражированной массы, как определено выше.

При хранении семенного материала по настоящему изобретению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, выбирают такие условия хранения, которые не оказывают отрицательного воздействия на стабильность или срок хранения семенного материала. Особенно неблагоприятный эффект могут оказывать колебания влажности. Частью настоящего изобретения является способ хранения семенного материала в мешке или контейнере, который является одновременно водоотталкивающим и воздухопроницаемым. Такой мешок или контейнер может быть выполнен в виде картонной коробки или упаковки. В такой картонной коробке или упаковке может дополнительно находиться внутренний паронепроницаемый слой. Если картонная коробка или упаковка выполнена в виде двухуровневой коробки, то стабильность хранения повышается. Контейнер, мешок, картонная коробка или упаковка, содержащая семенной материал по настоящему изобретению или технически обработанный семенной материал по настоящему изобретению, также является частью настоящего изобретения. Аналогичным образом, частью настоящего изобретения является хранение семенного материала по настоящему изобретению или технически обработанного семенного материала по настоящему изобретению в таком мешке, контейнере, упаковке или картонной коробке.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения растение по настоящему изобретению представляет собой гибридное растение или двойное гаплоидное растение. Гибридные растения и двойные гаплоидные растения не встречаются в природе, и их нельзя выделить из природного сырья. В другом варианте растения по настоящему изобретению молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению присутствует в гетерозиготной или гомозиготной форме. В случае гибридного растения, молекула нуклеиновой кислоты также может присутствовать в гемизиготной форме. Настоящее изобретение также охватывает гибридные семена и двойные гаплоидные семена, содержащие нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению или полипептид по настоящему изобретению.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения содержит растение, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - вида *Beta vulgaris*, отличающееся тем, что устойчивость к Церкоспоре у этого растения еще больше повышена. Например, это может быть реализовано посредством «стэкинга генов», то есть,

устойчивость повышается с помощью этого эффекта дозы. Для этого, растения по настоящему изобретению, содержащие аллель устойчивости к Церкоспоре, чрезмерно трансформируют этим аллелем устойчивости, чтобы увеличить уровень транскрипции гена в растении. Альтернативный подход включает редактирование генов/сайт-направленный мутагенез или TILLING-опосредованную модификацию нативного промотора аллеля, придающего устойчивость, для повышения частоты его экспрессии, или модификацию самого аллеля гена LRR, придающего устойчивость, для повышения его активности или стабильности. Такой способ повышения активности посредством модификации гена устойчивости описан, например, в документе WO 2006/128444 A2, и его можно выполнять посредством методик, известных специалисту в данной области техники. Дополнительный подход может включать слияние молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению с гетерологичным промотором, который демонстрирует более высокую активность по сравнению с нативным промотором, в частности, после заражения Церкоспорой.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения направлен на растение свеклы сахарной или дражированное семя такого растения, которое собирают перед стрелкованием, потому что в течение первых 10, 11, 12, 13, 14 или 15 месяцев после прорастания не происходит стрелкования у растения свеклы сахарной, и в этот период заканчивается развитие тела корнеплода свеклы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения растение свеклы сахарной или дражированное семя такого растения имеет геном, позволяющий развиваться телу корнеплода свеклы, наращивая массу, составляющую суммарно, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или даже 90% от общей массы полноценного взрослого растения.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения растение свеклы сахарной или дражированное семя такого растения имеют геном, позволяющий развиваться телу корнеплода свеклы, наращивая массу, минимально составляющую 200 г, 250 г, 300 г, 350 г, 400 г, 450 г или 500 г, и максимально составляющую 100 г, 1100 г, 1200 г, 1300 г, 1400 г, 1500 г, 1600 г, 1700 г, 1800 г, 1900 г или даже 2000 г, посредством фотосинтеза.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения направлен на растение свеклы сахарной или дражированное семя такого растения, при этом, геном растения свеклы сахарной позволяет развиваться телу корнеплода свеклы, наращивая концентрацию сахарозы, составляющую, по меньшей мере, 10%, 11%, 12 %, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или даже 20%.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения растение свеклы

сахарной или дражированное семя такого растения включает, по меньшей мере, один, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре, по меньшей мере, пять, по меньшей мере, десять, по меньшей мере, двадцать или даже, по меньшей мере, тридцать мутаций относительно SEQ ID NO: 4.

Способ продуцирования организма, содержащего мутированную версию молекулы нуклеиновой кислоты по вышеприведенному варианту осуществления настоящего изобретения [1] и/или мутированную версию промотора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из (a) SEQ ID NO: 7, (b) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся в жестких условиях с последовательностью, комплементарной последовательности в соответствии с пунктом (a), и (c) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 70% идентична последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 7, при этом, способ включает следующие этапы:

(I) Предложение организма или клетки, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты и/или промотор

(II) Увеличение частоты мутаций организма или клетки, или мутагенеза организма, или клетки

(III) Фенотипический отбор организма, который в результате мутации демонстрирует измененную устойчивость или измененный уровень устойчивости к *Cercospora beticola*, или Генотипический отбор организма, или клетки, содержащей мутацию в молекуле нуклеиновой кислоты и/или промотор, при этом, мутация была создана посредством этапа (II), и, необязательно,

(IV) Регенерацию организма из клетки, полученной на этапе (III).

Организм может представлять собой растение. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения растение представляет собой *Beta vulgaris*. Однако также можно использовать одноклеточные организмы, такие как бактерии. Бактерия может представлять собой *E.coli*. Если организм представляет собой растение, то способ можно применять как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro*. Если организмом представляет собой растение, и способ применяется в условиях *in vitro*, то может быть создана культура клеток растения, и в культуре клеток может произойти увеличение частоты мутаций или мутагенеза. Увеличение частоты мутаций охватывает, например, применение мутагенных агентов, таких как, например, 5-бромурацил или этилметансульфонат (EMS), или применение физических мутагенов, таких как ионизирующее излучение или ультрафиолетовый свет. Мутагенез охватывает также целенаправленный мутагенез. Целенаправленный мутагенез может быть достигнут с помощью точных методов, таких как редактирование генов (как описано ниже).

Объяснение регенерации организма из клеток приведено в различных стандартных справочниках по клеточной биологии. Объяснение регенерации растений приведено, например, в стандартном справочнике «Биотехнология растений: комплексная биотехнология, дополнение второе» (Майкл В. Фаулер, Грэм Уоррен, Мюррей Му-Янг, Pergamon Press, 1992). Регенерация *Beta vulgaris* из культуры клеток описана в работе Линдси и Галлуа «Трансформация свеклы сахарной (*Beta vulgaris*) посредством *Agrobacterium tumefaciens*». *Journal of experimental botany* 41.5 (1990): 529-536.

В этих справочниках также описано, как создаются культуры растительных клеток. Как было объяснено выше, мутированная версия молекулы нуклеиновой кислоты и, соответственно, промотора в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения характеризуются частотой экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, придающей устойчивость, которая повышается в результате мутации. Такой эффект также может зависеть и от наличия нескольких мутаций. Например, можно ввести две, три, четыре, пять или более мутаций в промотор или молекулу нуклеиновой кислоты.

Таким образом, благодаря введению мутаций, в клетке может быть построено больше белка, придающего устойчивость, или белок оказывает лучший эффект. Таким образом, устойчивость по сравнению с контрольным растением, содержащим неизмененную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, может быть повышена, например, по меньшей мере, на 1, 2, 3, 4, 5 или более процентов. Повышение можно измерить, как описано ниже. Более того, устойчивость из-за мутации или мутаций может быть повышена, по меньшей мере, на один рейтинговый балл. Объяснение рейтинговых баллов приведено в другом месте настоящего документа. Кроме того, белок устойчивости может проявлять - в результате мутаций - измененный эффект, а при некоторых обстоятельствах, он может проявлять эффект, направленный против тех патогенов, которые адаптировались к первичному механизму устойчивости. В данном контексте, настоящее изобретение охватывает также такие мутированные варианты нуклеиновых кислот по настоящему изобретению и мутированные варианты белка по настоящему изобретению. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение охватывает такие варианты, которые не встречаются в природе, и их нельзя выделить из природного сырья, чтобы убедиться, что патоген не имел возможности адаптироваться к таким вариантам. Кроме того, вышеописанный способ получения организма, содержащего мутированную версию молекулы нуклеиновой кислоты, может включать дополнительный этап, на котором идентифицируются те организмы или, соответственно, растения, которые имеют дополнительную повышенную устойчивость из-за мутации или мутаций. Определение факта повышения устойчивости возможно посредством объясненных в настоящем документе рейтинговых баллов или

измерения уровня устойчивости.

Помимо вышеописанного способа продуцирования организмов, содержащих мутированную версию молекулы нуклеиновой кислоты или промотора, также возможно модифицировать соответствующие нуклеиновые кислоты химическим путем в выделенном состоянии для достижения желаемых эффектов (например, тех, которые описаны выше). Преимущество такого подхода в том, что соединения можно редактировать еще более точно. Для этого предлагается следующий способ:

Продуцирование химически модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с приведенным выше вариантом осуществления настоящего изобретения [1] и/или химически модифицированного промотора, содержащего нуклеотидную последовательность, выбранную из

(a) SEQ ID NO: 7;

(b) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью в соответствии с пунктом (a);

(c) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 70% идентична последовательности, в соответствии с SEQ ID NO: 7;

при этом, способ содержит следующие этапы:

(I) Предложение молекулы нуклеиновой кислоты, как указано выше, в выделенной форме

(II) Химическую модификацию молекулы нуклеиновой кислоты или промотора посредством одного из следующих этапов:

(IIa) Мутагенизация

(IIb) Редактирование генов

(IIc) Рестрикция и лигирование, соответственно, вставка или делеция.

Кроме того, химические модификации могут быть сгенерированы такими подходами, как указано в другом месте настоящего документа в контексте аллельных вариантов. Редактирование генов, приведенное на этапе (II) выше, эквивалентно термину «редактирование генома». Необязательно, химически модифицированная молекула нуклеиновой кислоты или химически модифицированный промотор могут быть впоследствии введены в клетку, или они могут быть стабильно интегрированы. С помощью такой клетки, химически модифицированная молекула нуклеиновой кислоты и модифицированный промотор могут быть размножены в контексте клеточной пролиферации. Впоследствии, их можно будет выделить в большом количестве, и можно будет выполнить анализы экспрессии генов. Анализы экспрессии генов особенно подходят, когда химическая модификация касается промотора. Можно собрать клетки и

выделить химически модифицированный белок устойчивости для химических анализов. Если клетка, содержащая химически модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты или модифицированный промотор, представляет собой растительную клетку, то из этой клетки можно регенерировать целое растение. Подходы, описанные в представленном отрывке, могут быть выполнены после вышеуказанного способа продуцирования модифицированной формы молекулы нуклеиновой кислоты и/или модифицированного промотора, и полученные варианты также входят в состав настоящего изобретения. Кроме того, растение, содержащее химически модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты или модифицированный промотор, также входят в состав настоящего изобретения. Таким образом, настоящее изобретение также относится к растению, полученному этим способом. Кроме того, настоящее изобретение также относится к химически модифицированным молекулам нуклеиновой кислоты, полученным этим способом, и к кодируемым полипептидам. Эти соединения могут представлять собой оптимизированные версии исходных (немодифицированных) соединений, при этом, полученный уровень устойчивости - как было объяснено выше - может быть повышен, по меньшей мере, на 1, 2, 3, 4, 5 или более процентов, или он может быть повышен, по меньшей мере, на один рейтинговый балл. В этом отношении, способ получения химически модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты также представляет собой способ оптимизации молекулы нуклеиновой кислоты. Кроме того, способ оптимизации может содержать дополнительный этап, на котором идентифицируются те модифицированные варианты молекулы нуклеиновой кислоты, которые приводят, по сравнению с неизменными вариантами, к повышенной устойчивости растения.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения растение по настоящему изобретению дополнительно, в виде трансгена или эндогена, содержит вторую молекулу нуклеиновой кислоты в другом положении в геноме, которая кодирует полипептид, способный придавать устойчивость к Церкоспоре растению, в котором экспрессируется полипептид. Например, по меньшей мере, один ген устойчивости или локус устойчивости, описанные в предшествующем уровне техники, может - поскольку он еще не присутствует в исходном генотипе - быть введен в растение по настоящему изобретению посредством скрещивания, трансформации, гомологически направленной репарации или гомологической рекомбинации. К таким генам относится, например, ген устойчивости к Ризомании RZ1 (Левеллен, Р.Т., И.О. Скоен и А.В. Эриксен, «Селекция свеклы сахарной на предмет устойчивости к ризомании: Оценка реакций растений-хозяев, а также отбор и наследование устойчивости». *50-й Зимний конгресс Международного института исследований сахарной свеклы, Брюссель (Бельгия), 11-12 февраля 1987 г.* Международный институт исследований сахарной свеклы. Генеральный секретариат,

1987), или ген устойчивости к ризомании RZ3 (WO 2014/202044).

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу повышения устойчивости к Церкоспоре растения вида *Beta vulgaris*, при этом, повышение устойчивости происходит без участия гена, придающего устойчивость, по настоящему изобретению по сравнению с растением изогенной линии.

Повышение устойчивости может происходить посредством интеграции молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в геном, по меньшей мере, одной клетки растения вида *Beta vulgaris*, а также посредством возможной регенерации растения из растительной клетки. Интеграция может происходить как посредством скрещивания половым путем, например, с одним из вышеупомянутых растений *Beta vulgaris* subsp. *maritima* и последующего отбора, а также посредством гомологически направленной репарации или гомологической рекомбинации. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения два последних упомянутых способа опираются на сайт-направленные нуклеазы, которые могут быть выбраны, из следующих нуклеаз, но ими не ограничиваются: Нуклеаза CRISPR, включая нуклеазу Cas9, CasX, CasY или Cpf1, нуклеаза TALE, цинк-пальцевая нуклеаза, мегануклеаза, нуклеаза Argonaut, эндонуклеаза рестрикции, включая FokI или ее вариант, рекомбиназа или две сайт-специфические, никующие эндонуклеазы. Введение гена, придающего устойчивость, посредством CRISPR-опосредованной гомологической рекомбинации в растение *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* показано на Примере 1.

Альтернативный подход включает повышение экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в растении. Это может происходить посредством модификации нативного промотора, при этом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения модификация происходит посредством редактирования генов или сайт-направленного мутагенеза, который опосредуется сайт-направленными нуклеазами, и, необязательно, репарационными моделями. Примеры таких нуклеаз уже приводились выше. Повышение экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению также может происходить посредством слияния молекулы нуклеиновой кислоты с гетерологичным промотором, который демонстрирует более высокую активность по сравнению с нативным промотором, в частности, после заражения Церкоспорой. Слияние также может происходить посредством сайт-направленной нуклеазы и репарационных моделей, а также посредством прямой вставки после двухцепочечного разрыва.

Как уже упоминалось выше, способ повышения устойчивости к Церкоспоре также может приводить к повышению активности и/или стабильности полипептида по настоящему изобретению посредством модификации нуклеотидной последовательности

молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Такой способ повышения активности посредством модификации гена устойчивости описан, например, в документе WO 2006/128444 A2, и его можно выполнять посредством методик, известных специалисту в данной области техники. Подробное объяснение этого подхода приведено ниже.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения генотип, устойчивый к Церкоспоре, может быть продуцирован из генотипа, чувствительного к Церкоспоре, посредством случайного или направленного мутагенеза последовательности нуклеиновой кислоты гена чувствительности, и, таким образом, устойчивость к Церкоспоре может быть повышена. Примеры полиморфизмов, которые отличают аллель чувствительности от аллеля устойчивости, представлены на Фигуре 1.

Например, аллель чувствительности может быть модифицирован посредством генной мутации нуклеазами TALE (TALEN) или цинк-пальцевыми нуклеазами (ZFN), а также системами CRISPR/Cas, которые, среди прочего, описаны в качестве примера в документе WO 2014/144155 A1 (Геномная инженерия растений с использованием систем CRISPR/Cas) и в работе Осакабе и Осакабе, *Plant Cell Physiol.*, 56 (2015), 389-400. Этого также можно достичь посредством метода, обозначенного как TILLING (нацеливание на индуцированные локальные повреждения в геномах), при этом, описано, например, в заявке на патент Германии DE 10 2013 101617, как вызывают точечные мутации в гене чувствительности, и затем отбирают растения, демонстрирующие подходящую, то есть, придающую устойчивость, мутацию, например, ячмень, устойчивый к вирусу желтой мозаики; см. документ DE 10 2013 101617 на стр. 4, 8 и 12, в параграфах [0014], [0026] и [0038]. Метод TILLING также подробно описан в публикации Хеникоффа *и соавт.* (Хеникофф *и соавт.*, *Plant Physiol.* 135, 2004, 630-636).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения эти методы приводят к повышению устойчивости, по меньшей мере, на один рейтинговый балл, в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - к повышению устойчивости, по меньшей мере, на два, три или более рейтинговых балла. После мутагенеза растительных клеток и последующей регенерации растений из мутагенизированных растительных клеток или мутагенеза растений, можно идентифицировать растения, которые демонстрируют, по меньшей мере, одну мутацию, как показано на Фигуре 1, в эндогенной молекуле нуклеиновой кислоты. В данном контексте, уже упомянутое растение по настоящему изобретению может быть охарактеризовано тем, что устойчивость повышается, по меньшей мере, на один рейтинговый балл, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на два или более рейтинговых балла. В альтернативном варианте

осуществления настоящего изобретения устойчивость растений по настоящему изобретению может быть повышена, например, по меньшей мере, на 1, 2, 3, 4, 5 или более процентов по сравнению с контрольным растением, которое не содержит нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению. Повышение можно измерить путем инокуляции соответственно одного здорового листа изолятом патогена и определения зараженной поверхности через 15 дней. Сокращение площади зараженной поверхности на 5% соответствует повышению устойчивости на 5%. Другие параметры для проведения измерения могут быть получены из приведенного ниже варианта осуществления «гена устойчивости».

Дополнительным вариантом осуществления настоящего изобретения является способ продуцирования растения, устойчивого к Церкоспоре, который можно осуществлять посредством трансформации растительной клетки с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, молекулой рекомбинантной ДНК или вектором, или кассетой экспрессии, и регенерации трансгенного растения из трансформированной растительной клетки (см. Пример 2), а также, как описано выше, посредством случайного или целенаправленного мутагенеза последовательности нуклеиновой кислоты гена чувствительности для генерации генотипа, устойчивого к Церкоспоре, или посредством скрещивания и отбора, например, с одним из вышеупомянутых растений *Beta vulgaris* subsp. *maritima*. Векторы или кассеты экспрессии, а также способы трансформации растений уже были описаны выше.

Способ продуцирования растения, устойчивого к Церкоспоре, в альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения включает, как описано выше, введение сайт-направленной нуклеазы и репарационной матрицы в клетку растения вида *Beta vulgaris*, при этом, сайт-направленная нуклеаза способна генерировать, по меньшей мере, один двухцепочечный разрыв ДНК в геноме клетки, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - выше и/или ниже целевой области, и репарационная матрица содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Кроме того, способ включает культивирование этой клетки в условиях, допускающих гомологически направленную репарацию или гомологическую рекомбинацию, при этом, молекула нуклеиновой кислоты включена в геном растения из репарационной матрицы. Кроме того, способ охватывает регенерацию растения из модифицированной растительной клетки (см. Пример 1).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения целевая область представляет собой аллельный вариант молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, при этом, аллельный вариант кодирует полипептид, который не придает устойчивости к Церкоспоре. В другом предпочтительном варианте

осуществления настоящего изобретения аллельный вариант содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 6 и/или содержит кодируемую последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 5, или последовательность геномной ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 4.

Как описано в отношении молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, могут быть введены замещения, делеции, вставки, добавления и/или любые другие изменения, которые, либо по отдельности, либо в комбинациях, действительно изменяют нуклеотидную последовательность, но выполняют ту же функцию, что и исходная последовательность - в данном случае, нуклеотидная последовательность аллельного варианта молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Таким образом, другой вариант осуществления настоящего изобретения включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который представляет собой производное полипептида, который кодируется аллельным вариантом молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, или который содержит аминокислотную последовательность аллельного варианта молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Производная аминокислотная последовательность, которая имеет, по меньшей мере, одно замещение, делецию, вставку или добавление, по меньшей мере, одной аминокислоты, при этом, функциональность кодируемого полипептида/белка сохраняется, представляет собой производное полипептида. Таким образом, используя традиционные способы, известные в предшествующем уровне техники, в нуклеотидную последовательность могут быть введены, например, посредством сайт-направленного мутагенеза, ПЦР-опосредованного мутагенеза, транспозонного мутагенеза, редактирования генома и так далее, замещения, делеции, вставки, добавления и/или любые другие изменения, либо по отдельности, либо в комбинациях с геном, которые действительно изменяют нуклеотидную последовательность, но выполняют ту же функцию, что и исходная последовательность.

Что касается аминокислотной последовательности, то после модификации с помощью вышеупомянутого способа, у нее также имеется общий структурный домен, и/или она обладает общей функциональной активностью. Нуклеотидные последовательности или аминокислотные последовательности, которые, по меньшей мере, на, примерно, 80%, по меньшей мере, на, примерно, 85%, по меньшей мере, на, примерно, 90%, по меньшей мере, на, примерно, 91%, по меньшей мере, на, примерно, 92%, по меньшей мере, на, примерно, 93%, по меньшей мере, на, примерно, 94%, по меньшей мере, на, примерно, 95%, по меньшей мере, на, примерно, 96%, по меньшей мере, на, примерно, 97%, по меньшей мере, на, примерно, 98%, по меньшей мере, на, примерно, 99% или, по меньшей мере, на, примерно, 100% идентичны нуклеотидной

последовательности или аминокислотной последовательности указанного аллельного варианта молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, определены в настоящем документе как достаточно сходные. Соответственно, настоящее изобретение включает нуклеотидную последовательность, которая способна гибридизоваться, в жестких условиях, с нуклеотидной последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности аллельного варианта молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, или с нуклеотидной последовательностью, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность.

В другом предпочтительном варианте осуществления способ по настоящему изобретению отличается тем, что двухцепочечный разрыв происходит в аллельном варианте молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения по пункту [1], или тем, что, по меньшей мере, один двухцепочечный разрыв происходит в положении, равном, по меньшей мере, 10 000 пар оснований, выше или ниже аллельного варианта, при этом, аллельный вариант кодирует полипептид, который не придает устойчивости к Церкоспоре.

Для специалиста в данной области техники будет очевидно, что могут встречаться многочисленные различные чувствительные последовательности, которые являются производными молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, но не придают устойчивости к Церкоспоре, таким образом, вышеперечисленные последовательности (SEQ ID NOs: 4, 5 и 6) следует рассматривать только как пример последовательностей, и настоящее изобретение не ограничивается вышеупомянутым аллельным вариантом молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Такой аллельный вариант может содержать нуклеотидную последовательность, выбранную из:

(a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 6;

(b) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 5;

(c) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 4;

(d) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с комплементарной последовательностью в соответствии с пунктами (a), (b) или (c) в жестких условиях;

(e) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, который, посредством замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты аминокислотной последовательности, отличается от полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью в соответствии с пунктами (a), (b) или

(c);

(f) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 6;

(g) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5;

Как описано выше, при количественном наследовании QTL, зачастую в растение вводится не только желаемая устойчивость, но и зачастую скорее нежелательные признаки, такие как, например, снижение урожайности из-за наследования дополнительных генов, которые не сцеплены с позитивным признаком устойчивости. Это происходит все чаще, если, как в случае устойчивости к Церкоспоре, устойчивость наследуется от ранее имевшихся сортов посредством множества генов устойчивости с незначительным эффектом. Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения введение молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая уже сама по себе демонстрирует доминирующий эффект устойчивости, или вектора, или кассеты экспрессии, не связано с введением нежелательных признаков, при этом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения это не влияет отрицательным образом на урожайность. Кроме того, настоящее изобретение относится к растению, полученному таким способом.

Хотя анализы QTL, ранее известные из предшествующего уровня техники, могли распознать фактические QTL, нижележащие области генома, продемонстрировавшие эффект QTL, также опосредовали недостатки, описанные выше, поэтому в контексте настоящего документа обсуждается также и понятие «сцепленный груз». В то же время, QTL и связанные с ними эффекты не были описаны единообразно в соответствующем уровне техники и просто опосредовали слабый эффект, таким образом, использование этих результатов в селекции растений, устойчивых к Церкоспоре, было возможно только в ограниченной степени и было в значительной степени неопределенным. Целенаправленная селекция и контролируемая интеграция гена устойчивости в генофонд свеклы сахарной теперь возможны посредством идентификации гена устойчивости, описанного в настоящем документе. Это обеспечивает селекцию и генерацию совершенно новых сортов, устойчивых к Церкоспоре, которые демонстрируют высокую устойчивость к патогену, не оказывая отрицательного влияния на урожайность сахара.

Настоящее изобретение также относится к способу идентификации и, возможно, к предложению растения вида *Beta vulgaris*, устойчивого к патогену Церкоспора,

отличающемся тем, что способ включает этап распознавания присутствия и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или полипептида по настоящему изобретению в растении или его образце/сегменте. Испытание на присутствие и/или экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или полипептида по настоящему изобретению может быть проведено с помощью стандартных способов, известных специалисту в данной области техники, например, с помощью ПЦР, ОТ-ПЦР или Вестерн-блоттинга.

Кроме того, способ идентификации по настоящему изобретению также включает распознавание молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению посредством распознавания, по меньшей мере, одного полиморфизма между устойчивыми и чувствительными последовательностями, то есть, между последовательностями молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и последовательностями аллельного варианта молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, описанными выше, с использованием молекулярных маркеров, которые распознают, по меньшей мере, один полиморфизм. Как уже было описано выше, для специалиста в данной области техники очевидно, что существуют многочисленные чувствительные последовательности, то есть, многочисленные последовательности, которые кодируют аллельный вариант молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Одна из них представлена в качестве примера в сравнении последовательности с нуклеотидной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению на Фигуре 1. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способ по настоящему изобретению, следовательно, включает распознавание, по меньшей мере, одного полиморфизма, который представлен на Фигуре 1, с использованием молекулярных маркеров, которые распознают полиморфизмы - в частности, диагностические полиморфизмы. Такое распознавание в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения происходит с использованием, по меньшей мере, одного молекулярного маркера на полиморфизм - в частности, на диагностический полиморфизм. Специалистам в данной области техники известно, какие маркерные методики следует применять для распознавания соответствующего полиморфизма, и как для этого конструируют молекулярные маркеры (см. «Достижения в области семеноводства и технологии», Том I, Ванангамуди *и соавт.*, 2008). Кроме того, настоящее изобретение охватывает молекулярные маркеры, которые описывают или распознают полиморфизм в соответствии с Фигурой 1, например, использование молекулярного маркера для распознавания полиморфизма в соответствии с Фигурой 1. Таким образом, также возможно использовать маркеры, которые не различают разные полиморфизмы, до тех пор, пока эти маркеры способны распознавать такой полиморфизм, который

встречается в молекуле нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, но не содержится в чувствительном аллельном варианте.

В альтернативном или дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения способ идентификации по настоящему изобретению включает этап распознавания, по меньшей мере, одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или в ее косегрегационных областях. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения косегрегационная область представляет собой область генома в растении *Beta vulgaris*, которая косегрегируется с устойчивостью к Церкоспоре, которую придает полипептид по настоящему изобретению, или с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения косегрегационная область содержит и фланкируется маркерами *sxh0678s01* и *s4p0264s01*, маркерами *s4p4301s01* и *s4p2271s01*, маркерами *s4p4301s01* и *s4p4293s01*, или маркерами *s4p4301s01* и *s4p4295s01*. Таким образом, распознавание может происходить посредством этапа способа, на котором, по меньшей мере, один маркер или, по меньшей мере, одна пара праймеров связывается в локусе в соответствии с SEQ ID NO: 74 или 75, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - в локусе в соответствии с SEQ ID NO: 76 или 77, и, необязательно, в результате этого генерируется сигнал, например, сигнал флуоресценции или амплификат последовательности. Таким образом, в альтернативном или дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения косегрегационная область может содержать последовательность в соответствии с SEQ ID NO:74 и/или 75, или SEQ ID NO: 76 и/или 77. Кроме того, предшествующие способы идентификации также представляют собой способы отбора растения, которое демонстрирует устойчивость к Церкоспоре по настоящему изобретению. Способ отбора включает заключительный этап отбора устойчивого растения.

В данном контексте, настоящее изобретение также включает разработку или продуцирование молекулярных маркеров, которые подходят для распознавания вышеупомянутых полиморфизмов между молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению (устойчивый аллель) и чувствительным аллельным вариантом, при этом, маркеры в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения подходят для распознавания полиморфизмов, представленных на Фигуре 1, или конструирование гибридизационных зондов, которые специфически связываются с нуклеотидной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, или продуцирование пары молекул нуклеиновой кислоты, подходящей для амплификации, в ПЦР, области, являющейся специфической для молекулы нуклеиновой кислоты по

настоящему изобретению, и, таким образом, для их распознавания в растении или растительной клетке.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ продуцирования олигонуклеотидов, имеющих длину, составляющую, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 21, 22, 23, 24 или 25, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 30, 35, 40, 45 или 50, и в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 100, 200, 300, 500 или 1000 нуклеотидов, которые специфически гибридизируются с нуклеотидной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или молекулы нуклеиновой кислоты, которая комплементарна по отношению к ним, или пары молекул нуклеиновой кислоты, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - в форме олигонуклеотидов, которая подходит для присоединения в качестве прямого и обратного праймера к области, являющейся специфической для молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, и для ее амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР), или которая подходит для гибридизации в качестве прямого и обратного праймера с областью в геноме растения *Beta vulgaris*, в таком *Beta vulgaris*, которое имеет косегрегацию с устойчивостью к Церкоспоре, которую придает полипептид по настоящему изобретению, или с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Примеры подходящих праймеров для распознавания опосредующей устойчивости нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению приведены в SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99. Эти две последовательности образуют пару праймеров, которую можно использовать в ПЦР.

Изначально способ продуцирования олигонуклеотидов включает: сравнение нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению с нуклеотидной последовательностью соответствующей молекулы нуклеиновой кислоты, которая не придает устойчивости, или с чувствительным аллельным вариантом, который в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения имеет нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 4 или 5; идентификацию различий в последовательностях между двумя нуклеотидными последовательностями; и генерацию молекул нуклеиновых кислот - в данном случае, олигонуклеотидов - которые специфическим образом связываются с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, но не с молекулой нуклеиновой кислоты, которая не опосредует устойчивость.

Кроме того, олигонуклеотид по настоящему изобретению может быть связан с

флуоресцентным красителем для генерации сигнала флуоресценции, например, при возбуждении светом волны соответствующей длины. Флуоресцентный краситель может представлять собой флуорохром. Олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут быть сопряжены с другими соединениями, подходящими для генерации сигнала. Такие олигонуклеотиды не встречаются в природе, и их также нельзя выделить из природного сырья. Для получения таких маркированных олигонуклеотидов выполняется следующее: ДНК можно маркировать биоортогональным образом. Для этой цели, можно маркировать ДНК в условиях *in vivo* или *in vitro* аналогами нуклеозидов, которые, например, впоследствии могут быть сопряжены с флуорофором в результате реакции Штаудингера. В дополнение к этому, также можно наделить ДНК флуорофорами химическим путем. Олигонуклеотиды можно маркировать посредством синтеза фосфорамидита с помощью флуорофоров, которые, например, используются в количественной ПЦР, в секвенировании ДНК и гибридизации *in situ*. Кроме того, ДНК может быть сгенерирована ферментативным путем в ходе полимеразной цепной реакции с флуоресцентными нуклеотидами или маркирована лигазой, или концевой дезоксинуклеотидилтрансферазой. Косвенно распознать ДНК также можно посредством биотинилирования и флуоресцирующего авидина. Для сопряжений, в качестве флуорофоров используют, среди прочего, флуоресцеин, флуоресцентные лантаниды, наночастицы золота, углеродные нанотрубки или квантовые точки. Одним из наиболее часто используемых флуоресцентных веществ является FAM (карбоксифлуоресцеин). Следовательно, олигонуклеотиды и, в частности, праймеры, которые обладают FAM-маркировкой, охватываются настоящим изобретением. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения FAM присутствует в виде 6-FAM, при этом, однако, - в зависимости от желаемой длины волны излучения и возбуждения - также могут использоваться и другие варианты FAM, например, 5-FAM. Примерами дополнительных флуоресцентных маркеров являются AlexaFluor, ATTO, Dabcyl, HEX, Rox, TET, Texas Red и Yakima Yellow. В зависимости от области применения, олигонуклеотиды могут быть наделены модификациями оснований или сахарофосфатного остова. Среди них, среди прочего, аминок-dT, азид-dT, 2-аминопурин, 5-Br-dC, 2'-дезоксиинозин (INO), 3'-дезоксидA, C, G, 5-Met-dC, 5-OH-Met-dCN6-Met-dA и другие.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к маркерному чипу («ДНК-чипу» или микрочипу), который содержит, по меньшей мере, один олигонуклеотид по настоящему изобретению, который подходит для распознавания. Маркерный чип подходит для применения, по меньшей мере, в одном способе распознавания по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также включает способ продуцирования белка по

настоящему изобретению. Способ включает предложение или культивирование культуры клеток, которая содержит SEQ ID NO: 2, и последующую экспрессию белка, кодируемого SEQ ID NO: 2.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к растению, устойчивому к Церкоспоре, или к его сегменту, который был идентифицирован и, если применимо, отобран посредством способа, описанного выше. В частности, настоящее изобретение относится к популяции растений, содержащей растения, которые доступны в соответствии с одним из способов по настоящему изобретению, как описано выше, и которые в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения устойчивы к болезни пятнистость листьев или к заражению Церкоспорой, и характеризуются присутствием молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения популяция насчитывает, по меньшей мере, 10, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 50, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 100, в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 500 растений и, в частности, популяция, используемая в сельском хозяйстве, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения насчитывает, по меньшей мере, 1000 растений. Доля растений в популяции, которые не несут молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и/или подвержены болезни пятнистость листьев, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения составляет менее 25%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - менее 20%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - менее 15%, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - 10% и, в частности, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - менее 5%, если они вообще присутствуют.

При тонком картировании, описанном выше, положение гена, придающего устойчивость к Церкоспоре, в геноме *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, можно было бы определить, и можно было бы идентифицировать и сам ген, и окружающие области последовательности. Это, в свою очередь, является основой для разработки гибридизационных зондов ДНК или генетических маркеров в целевой области, с помощью которых можно было бы распознать ген, опосредующий устойчивость к Церкоспоре, или можно было бы отличить его от гена, который не придает устойчивости.

Гибридизационные зонды ДНК могут быть получены из последовательности гена, придающего устойчивость к Церкоспоре, и использоваться для скрининга геномных банков и/или банков кДНК желаемого организма. Зонды можно использовать для

амплификации идентифицированных гомологичных генов посредством известного процесса полимеразной цепной реакции (ПЦР) и для проверки того факта, присутствует ли ген, придающий устойчивость к Церкоспоре, в организме в виде эндогена, или он был успешно введен гетерологичным образом.

В данной ситуации, специалист в данной области техники может прибегнуть к обычным методам гибридизации, клонирования и секвенирования, которые, например, перечислены в работе Сэмбрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Инструкция по проведению лабораторных работ, 3-е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, 2001. Специалист в данной области техники может также синтезировать и использовать олигонуклеотидные праймеры для амплификации последовательностей гена, придающего устойчивость к Церкоспоре. Для достижения специфической гибридизации, такие зонды должны быть специфическими и иметь в длину, по меньшей мере, 15 нуклеотидов, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 20 нуклеотидов. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в работе Тийссена, «Лабораторные методики в биохимии и молекулярной биологии - Гибридизация с использованием зондов нуклеиновых кислот», в Части 1, Главе 2 работы «Обзор принципов гибридизации и стратегия количественного определения нуклеиновых кислот», Эльзевьера, Нью-Йорк (1993); и в серии лабораторных руководств «Текущие протоколы в молекулярной биологии», Глава 2, Осубель *и соавт.*, под ред., Greene Publishing и Wiley Interscience, Нью-Йорк (1995).

Следовательно, молекула нуклеиновой кислоты длиной, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 21, 22, 23, 24 или 25, в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 30, 35, 40, 45, или 50, и в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 100, 200, 300, 500 или 1000 нуклеотидов является объектом настоящего изобретения, при этом, эта молекула нуклеиновой кислоты специфически гибридизируется с ранее описанной нуклеотидной последовательностью по настоящему изобретению, которая содержит ген, придающий устойчивость к Церкоспоре. Она также явно охватывает диапазон нуклеотидов от 15 до 35.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к маркерам в виде олигонуклеотидов, в частности, к олигонуклеотидам в виде праймеров. Они содержат молекулу нуклеиновой кислоты длиной, по меньшей мере, 15 нуклеотидов, которая специфически гибридизируется с нуклеотидной последовательностью, определенной как указано выше.

В частности, настоящее изобретение охватывает пару молекул нуклеиновой кислоты, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - в форме олигонуклеотидов, или набор, содержащий эту пару олигонуклеотидов, которая подходит для гибридизации в качестве прямого и обратного праймера с областью, являющейся специфической для молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, и для ее амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР), или которая подходит в качестве прямого и обратного праймера для гибридизации с областью в геноме растения *Beta vulgaris*, такого *Beta vulgaris*, которое демонстрирует косегрегацию с устойчивостью к Церкоспоре, придаваемой полипептидом по настоящему изобретению, или с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

Посредством настоящего изобретения также можно достичь указанных ниже преимуществ в области селекции и разработки новых устойчивых линий растений рода *Beta*. Информация о последовательностях, а также идентифицированные полиморфизмы, которые позволяют устанавливать различия между аллелями устойчивости и аллелями чувствительности распознанного гена, то есть, между аллелями, которые придают устойчивость к Церкоспоре, и аллелями, которые не способны придавать эту устойчивость, позволяет разрабатывать маркер непосредственно в гене, как описано выше, а также в областях, расположенных выше и ниже, что существенно облегчает работу селекционеру-растениеводу, в частности, в рамках разработки оптимизированных элитных линий без «сцепленного груза». Более того, сведения о структуре последовательности могут быть использованы для идентификации дополнительных генов устойчивости, в частности, к Церкоспоре, которые, например, являются гомологичными или ортологичными.

Таким образом, настоящее изобретение охватывает способ идентификации дополнительных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептиды, или дополнительных белков, которые способны придавать устойчивость к Церкоспоре растению, в котором экспрессируется полипептид. Таким образом, специалист в данной области техники может использовать базы данных, применяя подходящие профили поиска и компьютерные программы для скрининга гомологичных последовательностей или для сравнения последовательностей. Более того, с помощью традиционных методик молекулярной биологии специалист в данной области техники может самостоятельно получить дополнительные последовательности ДНК, кодирующие белки устойчивости к Церкоспоре, и использовать их в рамках настоящего изобретения. Например, подходящие гибридизационные зонды могут быть получены из последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и использованы для скрининга геномных банков и/или банков кДНК желаемого организма. В данной ситуации,

специалист в данной области техники может прибегнуть к обычным методам гибридизации, клонирования и секвенирования, которые, например, перечислены в работе Сэмбрук и соавт., Молекулярное клонирование: Инструкция по проведению лабораторных работ, 3-е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, 2001. Используя известные последовательности, специалист в данной области техники может также синтезировать и использовать олигонуклеотидные праймеры для амплификации последовательностей молекул нуклеиновой кислоты, придающих устойчивость к Церкоспоре.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, таким образом, охватывается способ идентификации молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, способный придавать устойчивость к Церкоспоре растению вида *Beta vulgaris*, в котором экспрессируется полипептид. Таким образом, способ включает сравнение аминокислотной последовательности полипептида по настоящему изобретению, который придает устойчивость к Церкоспоре растению *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* с помощью аминокислотных последовательностей из базы данных последовательностей, или с помощью последовательностей аллельных вариантов полипептида по настоящему изобретению в генотипах растений вида *Beta vulgaris*. Кроме того, способ по настоящему изобретению включает идентификацию аминокислотной последовательности или аллельного варианта, который, по меньшей мере, на 80% идентичен аминокислотной последовательности полипептида по настоящему изобретению, а также введение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей идентифицированную аминокислотную последовательность или аллельный вариант, в растение вида *Beta vulgaris*, экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в растении; и, необязательно, последующую верификацию устойчивости к Церкоспоре.

Как описано выше, дополнительные белки, придающие устойчивость к Церкоспоре, или гены, кодирующие их, то есть, гомологи, аналоги и ортологи, которые идентичны, по меньшей мере, на 70%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 80%, в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 90%, в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 95% или даже на 98%, идентичны аминокислотной последовательности полипептида, который кодируется молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, могут быть идентифицированы посредством классических биоинформационных подходов (поиски в базе данных и компьютерные программы для скрининга гомологичных последовательностей).

Термин «гомолог(и)», таким образом, означает, что рассматриваемые гены (из двух

разных видов растений) имеют по существу одинаковую функцию и общего предка, и, следовательно, обычно демонстрируют значительную идентичность в своих последовательностях нуклеиновых кислот или кодируемых аминокислотных последовательностях. Однако имеется также множество генов, гомологичных друг другу, без белковых последовательностей, приводящих к значимому парному выравниванию. В отличие от этого, термин «аналог(и)» описывает гены или белки, которые (аналогичным образом) имеют идентичную или сходную функцию, но не созданы из одной и той же структуры, то есть, не имеют общего предка. В данном случае, зачастую невозможно установить значительную идентичность в их последовательности нуклеиновой кислоты или кодируемой аминокислотной последовательности, или, в лучшем случае, в специфичных функциональных доменах.

В контексте секвенирования генома, гомологи классифицируются более точно для аннотации. Для этого, были введены термины «ортология» и «паралогия». Ортологи представляют собой гены, связанные посредством события видообразования. Паралоги представляют собой гены, которые восходят к событию дупликации.

Таким образом, ген, главным образом, представляет собой гомолог, аналог или ортолог по смыслу настоящего изобретения, если он способен придавать растению устойчивость к Церкоспоре. Для проверки, используются способы, которые уже были описаны выше, известные специалисту в данной области техники, например, амплификация идентифицированного гомолога или аналога, или ортолога посредством ПЦР, клонирование в векторах экспрессии, введение в растение-мишень или растительную клетку-мишень и проверка устойчивости.

Как было описано выше, использование описанного в настоящем документе аллеля гена устойчивости в цис- или трансгенетических подходах открывает возможность появления новых устойчивых видов растений рода Beta, которые, используя эффект дозы, демонстрируют более высокую устойчивость, или у которых можно избежать нарушения устойчивости и оптимизировать развитие устойчивости посредством объединения распознанного гена с другими генами устойчивости. Также возможны модификации гена посредством метода TILLING или целенаправленной инженерии для оптимизации отбора кодонов с целью повышения экспрессии или для развития новых, или модифицированных аллелей устойчивости. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, кодон-оптимизированные последовательности или модифицированные аллели устойчивости не встречаются в природе, а являются искусственными. Пример модифицированной последовательности генома представлен посредством SEQ ID NO: 94, при этом, кодон в положении 16-18 является модифицированным, но кодируемая аминокислотная последовательность не изменилась и

соответствует SEQ ID NO: 3. Пример модифицированной последовательности кДНК представлен SEQ ID NO: 95, при этом, кодон в положении 55-57 является модифицированным, но кодируемая аминокислотная последовательность не изменилась и соответствует SEQ ID NO: 3. Пример модифицированного аллеля, придающего устойчивость, представлен аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 96, при этом, аминокислота валин была заменена на аминокислоту лейцин в положении 209. Аминокислотная последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 96 кодируется модифицированной кДНК в соответствии с SEQ ID NO: 97. Эти последовательности не встречаются в природе, а являются искусственными. При замене аминокислот, например, в последовательности, опосредующей устойчивость в соответствии с SEQ ID NO: 3, рекомендуется заменять аминокислоты в следующих группах:

- a) глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин
- b) серин, цистеин, селеноцистеин, треонин, метионин
- c) фенилаланин, тирозин, триптофан
- d) гистидин, лизин, аргинин
- e) аспарат, глутамат, аспарагин, глутамин.

Настоящее изобретение также относится к применению в растении аллеля идентифицированного гена, придающего устойчивость к Церкоспоре, в генетическом или молекулярном объединении с другими генетическими элементами, которые могут придавать выгодные агрономические свойства. Таким образом, экономическая ценность культивируемых растений может быть заметно повышена за счет того, что, например, повышается урожайность по сравнению с растениями, обладающими такой же генетикой, но не наделенными нуклеиновой кислотой по настоящему изобретению. Кроме того, могут быть открыты новые посевные площади для растения, которые ранее были недоступны для культивирования этого растения из-за биотических факторов, таких как сильное давление патогенов. В частности, настоящее изобретение относится к использованию аллеля идентифицированного гена, придающего устойчивость к Церкоспоре, в способах борьбы с заражением патогеном *Cercospora beticola* в сельскохозяйственном или садоводческом культивировании растений рода *Beta*, охватывая, например, идентификацию и отбор растений рода *Beta* с помощью одного из способов, описанных выше, и/или культивирование отобранных таким образом растений, или их потомков. Таким образом, настоящее изобретение включает способ культивирования растений вида *Beta vulgaris*, включая, на первом этапе, предложение устойчивых к Церкоспоре растений вида *Beta vulgaris* по настоящему изобретению, или продуцирование растений вида *Beta vulgaris* с помощью способа продуцирования по

настоящему изобретению, или идентификацию и отбор растений вида *Beta vulgaris* с помощью способа идентификации по настоящему изобретению, который был описан выше; и включая, на втором этапе, культивирование растений из первого этапа, или размещение семенного материала растений из первого этапа, или выращивание растений из первого этапа. Таким образом, способ культивирования предотвращает заражение культивируемых растений Церкоспорой. Способ культивирования может быть частью способа производства сахара. Способ производства сахара включает этапы способа культивирования и, дополнительно, в качестве предпоследнего этапа, сбор культивируемых растений и, в качестве последнего этапа, извлечение сахара из вышеупомянутых растений.

Способ культивирования также может быть частью способа производства сахара. Способ продуцирования семенного материала включает этапы способа культивирования и, дополнительно, в качестве предпоследнего этапа, яровизацию культивируемых растений и, в качестве последнего этапа, извлечение семян из вышеупомянутых растений.

Извлеченные семена можно, необязательно, дражировать, чтобы получить дражированный семенной материал растения вида *Beta vulgaris*. В данном случае, это способ продуцирования дражированного семенного материала.

Более того, способ продуцирования семенного материала может быть разработан, как способ продуцирования семенного материала, устойчивого к Церкоспоре. Способ продуцирования семенного материала, устойчивого к Церкоспоре, включает этапы описанного выше способа продуцирования семенного материала, и дополнительно, в качестве последнего этапа, верификацию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, по меньшей мере, в одном из извлеченных семян, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, в 0,1% или, по меньшей мере, в 1% извлеченных семян. В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения верификацию проводят таким образом, чтобы семена оставались всхожими. Это означает, что извлечение необходимой для верификации ДНК из семян не нейтрализует всхожесть семян. В данном случае, верификация нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могла быть проведена с охватом особенно большой доли всех извлеченных семян. Например, верификация может проводиться, по меньшей мере, у 2%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, у 3%, в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, у 4% всех извлеченных семян.

Растения по настоящему изобретению, их клетки или семена, или семенной материал по настоящему изобретению могут обладать дополнительными, выгодными

агрономическими свойствами или быть наделены ими. Одним из примеров является толерантность или устойчивость к гербицидам, таким как глифосат, глюфоцинат или ингибиторы ALS. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - толерантность к глифосату или гербициду-ингибитору ALS. Конкретный вариант осуществления устойчивости к глифосату раскрыт в патенте US 7,335,816 B2. Такая устойчивость к глифосату, например, доступна из семенного материала, хранящегося в NCIMB (Национальные коллекции промышленных, пищевых и морских бактерий), Абердин (Шотландия, Великобритания) под номером доступа NCIMB 41158 или NCIMB 41159. Такие семена можно использовать для получения толерантных к глифосату растений свеклы сахарной. Устойчивость к глифосату также можно ввести в растение другого вида рода *Beta* путем скрещивания.

Таким образом, настоящее изобретение также охватывает растения, их клетки или семена, или семенной материал, отличающиеся тем, что они содержат нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, и, кроме того, тем, что

а) фрагмент ДНК геномной ДНК растения, его сегментов или семян может быть амплифицирован посредством полимеразной цепной реакции с первым праймером, который имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 81, и со вторым праймером, который имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 82, при этом, фрагмент ДНК, по меньшей мере, на 95% идентичен, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - на 100%, нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 83, и/или

b) фрагмент ДНК геномной ДНК растения, его сегментов или семян можно амплифицировать посредством полимеразной цепной реакции с первым праймером, который имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 84, и со вторым праймером, который имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 85, при этом, фрагмент ДНК, по меньшей мере, на 95% идентичен, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - на 100%, нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 86, и/или

c) фрагмент ДНК геномной ДНК растения, его сегментов или семян можно амплифицировать посредством полимеразной цепной реакции с первым праймером, который имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 87, и со вторым праймером, который имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 88, при этом, фрагмент ДНК, по меньшей мере, на 95% идентичен, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - на 100%, нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 89.

Конкретный вариант осуществления устойчивости к гербициду-ингибитору ALS

раскрыт в документе WO2012/049268 A1. Например, такую устойчивость к гербициду-ингибитору ALS можно получить из хранилища NCIMB, Абердин, Великобритания, под номером NCIMB 41705. Кроме того, такую устойчивость к ингибитору ALS можно получить посредством TILLING или сайт-направленного мутагенеза, например, посредством редактирования генов, например, посредством использования CRISPR/Cas, CRISPR/Cpf1, TALENS или цинк-пальцевых нуклеаз. Таким образом, настоящее изобретение также охватывает растения, их клетки или семена, или семенной материал, отличающиеся тем, что они содержат нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, и, кроме того, они демонстрируют мутацию в эндогенном гене ацетолактатсинтазы, при этом, ген ацетолактатсинтазы кодирует белок ацетолактатсинтазы, который, в результате мутации в положении 569, имеет аминокислоту, отличную от триптофана. В результате мутации, аминокислота в положении 569 в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения представляет собой аланин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, валин или аргинин. Положение 569 в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения определяется через положение 569 SEQ ID NO: 90. Кроме того, предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является конкретная последовательность мутированного гена ацетолактатсинтазы SEQ ID NO: 91. Последовательность мутированного гена ацетолактатсинтазы, или последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 91, не встречается в природе, и ее нельзя выделить из природного сырья. Кроме того, мутация может присутствовать как в гетерозиготном виде, так и в гомозиготном виде в растениях, их клетках или семенах, или в семенном материале. Мы рекомендуем, чтобы присутствие мутации было в гомозиготном виде, поскольку это способствует более стабильному или более интенсивному фенотипическому проявлению устойчивости.

Многочисленные дополнительные гербициды и их применимость известны специалисту в данной области техники из предшествующего уровня техники. Он может обратиться к предшествующему уровню техники, чтобы получить информацию о том, какие генетические элементы и каким образом следует использовать для воплощения соответствующей толерантности у растений.

Более того, толерантность к гербицидам имеет синергетический эффект, заключающийся в сокращении роста сорняков за счет использования гербицидов. Это является преимуществом в борьбе с Церкоспорой, поскольку известно, что конидии (беспольные споры) или псевдострома (мицелий) *Cercospora beticola* могут выживать на растительном материале до 2 лет.

Еще одним примером выгодного агрономического свойства является дополнительная устойчивость к патогенам, при этом, патогенами могут быть, например,

насекомые, вирусы, нематоды, бактерии или грибы. Например, масштабная защита растения от патогенов может быть достигнута за счет комбинации различных типов устойчивости/толерантности к патогенам, поскольку генетические элементы могут проявлять аддитивные эффекты по отношению друг к другу. Например, многочисленные гены устойчивости к патогенам известны специалисту в данной области техники как генетические элементы. Например, в патенте US 20160152999A1 раскрыт ген RZ, устойчивый к болезни Ризомания. Эту болезнь вызывает возбудитель «Вирус некротического пожелтения жилок свеклы». Несколько типов устойчивости к болезни, содержащиеся в одном растении, оказывают синергетическое воздействие друг на друга. Если растение заражено патогеном впервые, то его иммунная система обычно ослаблена, а эпидермис, будучи внешним барьером, зачастую поврежден, в результате чего вероятность дальнейшего распространения заражения возрастает. Дополнительным примером выгодного агрономического свойства является холодостойкость или морозостойкость. Растения, которые демонстрируют это свойство, можно сеять уже в начале года, или их можно оставить в поле на более длительный срок, что может привести, например, к повышению урожайности. В данном случае, специалист в данной области техники может также обратиться к предшествующему уровню техники и найти подходящие генетические элементы. Дополнительными примерами выгодных агрономических свойств являются эффективное использование воды, эффективное использование азота и урожайность. Генетические элементы, которые могут использоваться для придания таких свойств, можно найти в предшествующем уровне техники.

Кроме того, специалисту в данной области техники известны многочисленные модификации защиты от патогенов. В дополнение к часто описываемым семействам R-генов, может быть успешно использован Avg/R-подход, комплементация Avg-гена (WO 2013/127379), самоактивация R-гена (WO 2006/128444) или HIGS-подход (сайленсинг гена, индуцируемый растением-хозяином) (например, WO2013/050024). В частности, для настоящего изобретения может иметь значение самоактивация R-гена. Для этого необходимо создать нуклеиновую кислоту, которая кодирует самоактивированный белок устойчивости для генерации в растениях устойчивости к патогенам. Однако эта нуклеиновая кислота имеет только ограниченный сегмент гена устойчивости класса NBS-LRR, такой как *wb*-R-ген, который простирается ниже от 5'-конца кодирующей области гена устойчивости класса NBS-LRR до начала кодирования домена NBS гена устойчивости класса NBS-LRR.

В данном контексте, также охватывается способ, который содержит этап удаления той области нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая кодирует N-

концевую область, и которая начинается с р-петли в домене NBS и простирается вверх до конца N-концевой области.

Белки устойчивости, которые кодируются такими укороченными нуклеиновыми кислотами, обычно самоактивируются, поскольку эти белки устойчивости запускают иммунную реакцию в растении, даже в отсутствие ассоциированного патогена и, таким образом, повышают основной иммунитет растения. Кроме того, настоящее изобретение охватывает такую укороченную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению и кодируемый ею полипептид.

Кроме того, настоящее изобретение также включает использование аллеля гена, придающего устойчивость Церкоспоре, идентифицированного вышеописанным способом, для комбинации с одной из предыдущих модификаций или с генетическим элементом, описанным выше, который может передавать растению, по меньшей мере, одно выгодное агрономическое свойство.

Помимо того, что настоящее изобретение относится к растению по настоящему изобретению, настоящее изобретение также относится к семенам или к потомкам, или к органу, части растения, ткани или его клетке, которые используются при производстве продуктов, которые обычно производятся из экологически чистого сырья, таких как продукты питания и корм для животных, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - сахар или сироп (меласса), при этом, меласса также используется для промышленного применения, например, для производства алкоголя или в качестве питательной среды для производства биотехнологических продуктов, для производства материалов или веществ для химической промышленности, например, очищенных химических веществ, фармацевтических препаратов или их предшественников, средств диагностики, косметики, биоэтанола или биогаза. Пример использования свеклы сахарной в качестве биогенного сырья в установках для получения биогаза описан в заявке DE 10 2012 022 178 A1; см., например, параграф 10.

Представленные ниже примеры объясняют изобретение, но не ограничивают объект изобретения. Если не указано иное, использовались стандартные способы молекулярной биологии; см., например, Сэмбрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Инструкция по проведению лабораторных работ, 3-е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, 2001, Фрич *и соавт.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989; Майер *и соавт.*, Иммунохимические способы в клеточной и молекулярной биологии, под ред., Academic Press, Лондон, 1987, и Вейр *и соавт.*, Справочник по экспериментальной иммунологии, Тома I-IV, Blackwell, под ред., 1986.

Подробное объяснение некоторых из наиболее важных последовательностей по настоящему изобретению приведено ниже:

- SEQ ID NO: 1: последовательность геномной ДНК гена, придающего устойчивость к Церкоспоре, из растения *Beta vulgaris* subsp. *maritima*.
- SEQ ID NO: 2: последовательность кДНК гена, придающего устойчивость Церкоспоре, в том виде, в котором она не встречается в природе.
- SEQ ID NO: 3: аминокислотная последовательность белка, придающего устойчивость к Церкоспоре, в том виде, в котором она кодируется последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.
- SEQ ID NO: 4: последовательность геномной ДНК чувствительного Варианта гена, придающего устойчивость к Церкоспоре
- SEQ ID NO: 5: кДНК чувствительного Варианта гена, придающего устойчивость к Церкоспоре
- SEQ ID NO: 6: аминокислотная последовательность чувствительного Варианта гена, придающего устойчивость к Церкоспоре
- SEQ ID NO: 7: нативный промотор гена, придающего устойчивость к Церкоспоре, из растения *Beta vulgaris* subsp. *maritima*.
- SEQ ID NO: 8: нативный терминатор гена, придающего устойчивость к Церкоспоре, из растения *Beta vulgaris* subsp. *maritima*.
- SEQ ID NO: 53: последовательность локуса из растения *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, содержащего ген, придающий устойчивость к Церкоспоре, в соответствии с SEQ ID NO: 1.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Введение гена, придающего устойчивость, посредством CRISPR-опосредованной гомологической рекомбинации, в растение *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*

Проектирование и отбор крПНК:

Подходящие крПНК для Crpf1-опосредованной индукции двухцепочечных разрывов были спроектированы с помощью инструментов CRISPR RGEN (Парк Дж., Бей С. и Ким Дж.-С. Cas-Designer: Веб-инструмент для выбора сайтов-мишеней системы CRISPR-Cas9. *Bioinformatics* 31, 4014-4016 (2015); Бэй С., Парк Дж. и Ким Дж.-С. Cas-OFFinder: Быстрый и универсальный алгоритм, который ищет потенциальные нецелевые сайты эндонуклеаз Cas9, направляемых РНК. *Bioinformatics* 30, 1473-1475 (2014)). Для этой цели искали подходящие протоспейсеры в последовательностях геномной ДНК длиной 500-1300 пар оснований, которые фланкируют 5'-конец и 3'-конец гена устойчивости к Церкоспоре из растения *Beta vulgaris* subsp. *maritima*. Для того, чтобы гарантировать функциональность эндонуклеазы Crpf1 из *Lachnospiraceae bacterium* ND2006 (Lb), были отобраны протоспейсеры длиной 24 нуклеотида, у которых связывающая последовательность

генома на 5'-конце была фланкирована необходимым мотивом, примыкающим к протоспейсам (РАМ), имеющим последовательность 5'-ТТТV-3' (V = G или C, или A). Подходящие протоспейсеры были отобраны в соответствии с заранее определенными критериями качества инструмента и сверены в отношении потенциальных нецелевых сайтов с эталонным геномом *B. vulgaris* subsp. *vulgaris*. Для непрерывных испытаний были выбраны исключительно крРНК, которые, помимо фактической последовательности-мишени, имеют не более 15 идентичных оснований с функциональным РАМ. Поскольку первые 18 нуклеотидов протоспейсера необходимы для распознавания и разрезания последовательности-мишени, то таким образом можно было бы предотвратить нежелательное разрезание в других последовательностях генома (Тан, Х., Л.Г. Лоудер, Т. Чжан, А.А. Мальзан, Х. Чжэн, Д.Ф. Войтас, З. Чжун, Ю. Чен, К. Рен, К. Ли, Э.Р. Киркланд, Й. Чжан и Й. Ци (2017), «Система CRISPR-Cpf1 для эффективного редактирования генома и транскрипционной репрессии в растениях». *Nat Plants* 3: 17018). Таким образом, могут быть идентифицированы четыре потенциальные крРНК в 5'-фланкирующей области (5'крРНК № 1-4) и три крРНК в 3'-фланкирующей области (3'крРНК № 1-3) гена устойчивости (см. Таблицу А).

Таблица А: Отобранные последовательности-мишени в 5'- и 3'-фланкирующих последовательностях ДНК гена устойчивости в растении *B. vulgaris*. РАМ подчеркнут.

Название крРНК	Последовательность-мишень генома с 5'-фланкирующим РАМ (подчеркнута)	Связывание на +/- цепи
5'крРНК №1	<u>ТТТА</u> ТТТCGАТТТCGАТТСТТGGАТТАТ (SEQ ID NO: 16)	-
5'крРНК №2	<u>ТТТ</u> СААСССAGТАТССТТАТССGТССАТ (SEQ ID NO: 17)	-
5'крРНК №3	<u>ТТТА</u> ТТТАААСАТGАТАСGТАТСАТАТТ (SEQ ID NO: 18)	+
5'крРНК №4	<u>ТТТА</u> ААСАТGАТАСGТАТСАТАТТGAGТ (SEQ ID NO: 19)	+
3'крРНК №1	<u>ТТТ</u> GТGGGТGGGТGGТТТТССGТGТGТ (SEQ ID NO: 20)	-
3'крРНК №2	<u>ТТТ</u> ССССТСССТТТGССGТGССGАAGТТ (SEQ ID NO: 21)	-
3'крРНК №3	<u>ТТТ</u> СТТСТТТGСТТССАССАТААСАС (SEQ ID NO: 22)	-

Клонирование генетических элементов: Для клонирования кассеты *cpfl*-экспрессии

и кассеты крРНК-экспрессии, сначала последовательность распознавания рестрикционного фермента BbsI, который предотвращает клонирование, удаляли из вектора-мишени pZFNnptII посредством введения точечной мутации (Т в G). Мутагенез выполняли с помощью набора для мутагенеза в соответствии со спецификацией изготовителя, используя два мутагенезных праймера (см. Таблицу В).

Таблица В: Мутагенезный праймер, используемый для введения точечной мутации (Т в G, подчеркнуто) для удаления последовательности распознавания BbsI.

Название	Последовательность 5'→3'
Мутагенезный праймер 1	TCAGTGCAGCCGTC <u>G</u> TCTGAAAACGACA (SEQ ID NO: 23)
Мутагенезный праймер 2	TGTCGTTTTTCAGAC <u>G</u> ACGGCTGCACTGA (SEQ ID NO: 24)

Для экспрессии гена *Lbcpfl* в *B. vulgaris*, последовательность ДНК, кодон-оптимизированную для *A. thaliana*, с 5'-фланкирующей промоторной последовательностью PcUbi из *Petroselinum crispum* (SEQ ID NO: 79) и 3'-фланкирующей терминирующей последовательностью 3A из *Pea sp.*, в качестве фрагмента ДНК, продуцировали синтетическим путем. Рестрикционный интерфейс (HindIII), который имеет отношение к клонированию в *Lbcpfl*-кодирующей последовательности (CDS) [SEQ ID NO: 78], был удален путем введения молчащей мутации (замена оснований без модификации аминокислотной последовательности), чтобы избежать непреднамеренного разрезания в кодирующей области. Оптимизацию кодонов выполняли с помощью алгоритма GeneArt компании Invitrogene/ThermoScientific. Для обеспечения транспорта Cpfl в ядре клетки, кодирующая последовательность сигнала ядерной локализации (NLS) вируса SV40 была интегрирована в *cpfl* CDS на 5'-конце, а NLS нуклеоплазмина был интегрирован на 3'-конце. Для лигирования в бинарном векторе-мишени pZFNnptII (Фигура 2), кассету экспрессии фланкировали двумя рестрикционными интерфейсами HindIII, а затем лигировали в pZFNnptII_LbCpfl. Успешная вставка кассеты экспрессии PcUbi::Cpfl::TPea была верифицирована посредством секвенирования, при этом, связывающие области праймеров, используемых для секвенирования, были расположены как во фланкирующих областях вектора, так и внутри кассеты экспрессии (см. Таблицу С).

Таблица С: Праймер, используемый для секвенирования кассеты экспрессии PcUbi::Cpfl::Tpea, интегрированной в pZFNnptII

Название	Последовательность 5'→3'
pSeq_CRBM4_F1	SEQ ID NO: 25
pSeq_CRBM4_R1	SEQ ID NO: 26
pSeq_CRBM4_F2	SEQ ID NO: 27
pSeq_CRBM4_R2	SEQ ID NO: 28
pSeq_CRBM4_F3	SEQ ID NO: 29
pSeq_CRBM4_R3	SEQ ID NO: 30
pSeq_CRBM4_F4	SEQ ID NO: 31
pSeq_CRBM4_R4	(SEQ ID NO: 32)

После транскрипции в растительную клетку, крРНК должны быть вырезаны посредством двух фланкирующих рибозимов. Для этого, предшественник крРНК фланкировали посредством кодирующих последовательностей молотоголового рибозима и рибозима HDV (Тан, Х., Л.Г. Лоудер, Т. Чжан, А.А. Мальзан, Х. Чжэн, Д.Ф. Войтас, З. Чжун, Ю. Чен, К. Рен, К. Ли, Э.Р. Киркланд, Й. Чжан и Й. Ци (2017), «Система CRISPR-Cpfl для эффективного редактирования генома и транскрипционной репрессии в растениях». Nat Plants 3: 17018).

Для идеального лигирования отдельных протоспейсеров в кодирующей последовательности повтора крРНК, две последовательности распознавания *BbsI* интегрировали между повтором крРНК и рибозимом HDV, при этом, «липкие» концы, которые использовались для клонирования, были адаптированы соответствующим образом. Для того, чтобы гарантировать одинаковую силу экспрессии *cpfl* и крРНК, кассету рибозима крРНК ограничили, на 5'-конце - промоторной последовательностью PcUbi и на 3'-конце - терминирующей последовательностью 3A. Для последующего лигирования в векторе-мишени pZFNnptII Cpfl, кассету экспрессии крРНК фланкировали двумя интерфейсами *PstI* и упорядочили в виде фрагмента синтетической ДНК. Протоспейсеры синтезировали в виде комплементарных олигонуклеотидов и отождили в соответствии со стандартным протоколом. Фрагмент ДНК длиной 24 пары оснований, который был сгенерирован таким образом, фланкировали «липкими» концами из 4 нуклеотидов, которые имеют отношение к лигированию (см. Таблицу D).

Таблица D: Последовательность олигонуклеотидов, которые были использованы для генерации коротких протоспейсеров, длиной 24 пары оснований. «Липкие» концы из 4 нуклеотидов, которые используются для лигирования, представляют собой соответствующие четыре первых нуклеотида каждой перечисленной последовательности.

Название крРНК	Последовательность 5'→3'
5'крРНК №1	SEQ ID NO: 33
	SEQ ID NO: 34
5'крРНК №2	SEQ ID NO: 35
	SEQ ID NO: 36
5'крРНК №3	SEQ ID NO: 37
	SEQ ID NO: 38
5'крРНК №4	SEQ ID NO: 39
	SEQ ID NO: 40
3'крРНК №1	SEQ ID NO: 41
	SEQ ID NO: 42
3'крРНК №2	SEQ ID NO: 43
	SEQ ID NO: 44
3'крРНК №3	SEQ ID NO: 45
	SEQ ID NO: 46

Эффективность четырех крРНК испытывали с помощью опосредованного агробактериями переноса гена в листьях *B. vulgaris*. Плазмиду pZFNtDTnptII котрансформировали для проверки эффективности трансформации. Трансформация листового эксплантата происходила посредством вакуумной инфльтрации в соответствии со стандартным протоколом. Флуоресценцию tDT проверяли через шесть дней с помощью флуоресцентной микроскопии, и листовые эксплантаты с гетерогенной флуоресценцией отбрасывали. Через десять дней после инфльтрации, листовые эксплантаты быстро замораживали в жидком азоте, растирали пестиком и выделяли геномную ДНК методом СТАВ (Кларк, Джозеф Д., «Быстрое, мелкомасштабное выделение плазмидной ДНК на основе цетилтриметиламмонийбромид (СТАВ) для выделения ДНК растений». Cold Spring Harbor Protocols 2009.3 (2009): pdb-prot5177). Эффективность отдельных крРНК определялась внешним поставщиком услуг с использованием частоты вставленных редакций (например, вставок, делеций или обмена оснований) в сравнении с неотредактированными последовательностями в геномной ДНК, с помощью NGS.

В качестве синтетической конструкции ДНК, наиболее эффективные крРНК - 5'крРНК № 3 и 3'крРНК № 1 - с ранее описанными рибозимами, промоторными и терминирующими последовательностями были упорядочены в виде кассет экспрессии с обратной ориентацией. Всю конструкцию ДНК фланкировали двумя рестрикционными интерфейсами PstI для клонирования в векторе-мишени pZFNnptII_LbCpfl. После того, как произошла вставка крРНК, кассеты экспрессии *LbCpfl* и крРНК были лигированы из вектора pZFNnptII_LbCpfl_крРНК в вектор pUbitDTnptII посредством HindIII.

В качестве репарационной матрицы, которая должна быть интегрирована в геном *B. vulgaris* посредством гомологической рекомбинации, кассета экспрессии гена устойчивости была фланкирована связывающей последовательностью на 5'-конце - посредством 5'крРНК №3 и на 3'-конце - посредством 3'крРНК №1. Это позволило вырезать кассету экспрессии гена устойчивости из плазмиды посредством Cpfl. Матрица всей ДНК была синтезирована в виде фрагмента синтетической ДНК длиной 87 326 пар оснований (SEQ ID NO: 80) и использована непосредственно в остоле вектора для трансформации. Плазида гена устойчивости и плазида pUbitDTnptII_LbCpfl_крРНК были введены в каллусные культуры *B. vulgaris* с помощью генной пушки.

Эффективность трансформации определяли с использованием транзientной флуоресценции tDT через сутки после трансформации с помощью флуоресцентной микроскопии. Каллусные культуры культивировали на среде для индукции побегов без давления отбора (без канамицина), а затем регенерированные побеги проверяли на сайт-направленную интеграцию кассеты гена устойчивости, придающего устойчивость. Для этого, геномную ДНК выделяли посредством СТАВ. Интеграцию гена, придающего устойчивость, амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров pCRBM4_F1, в соответствии с SEQ ID NO: 47, и pCRBM4_R1, в соответствии с SEQ ID NO: 48 (см. Таблицу E), и впоследствии продукты ПЦР секвенировали с использованием обоих праймеров. Побеги, в которых успешная вставка кассеты экспрессии могла быть верифицирована таким образом, были идентифицированы в следующих анализах сайта интеграции гена устойчивости. Для того, чтобы верифицировать вставку в пределах желаемой последовательности-мишени в геноме, фланкирующие области кассеты экспрессии гена устойчивости амплифицировали посредством ПЦР. В данном случае, связывание праймера происходило в пределах последовательности ДНК гена устойчивости; связывание второго праймера происходило за пределами 5'- или 3'-фланкирующей области гомологии вставленной кассеты экспрессии (см. Таблицу E). Амплифицированные последовательности ДНК были секвенированы с использованием одних и тех же праймеров, и интеграция в желаемом месте была подтверждена таким образом. Для того, чтобы исключить связывание праймеров pCRBM4_F1 (SEQ ID NO: 47),

pCRBM4_R1 (SEQ ID NO: 48), pCRBM4_R2 (SEQ ID NO: 50) и pCRBM4_F3 (SEQ ID NO: 51) в областях со сходными последовательностями генома, все последовательности праймеров предварительно сравнивали с геномом *B. vulgaris*. Для праймера pCRBM4_F3 (SEQ ID NO: 51) было невозможно выбрать нуклеотидную последовательность таким образом, чтобы можно было исключить связывание с последовательностью дикого типа. Поэтому 3'-фланкирующую область амплифицировали во всех побегах, которые при испытании на ген устойчивости показали позитивный результат, и сайт-специфическая вставка была верифицирована исключительно посредством последующего секвенирования. Таким образом, сгенерированный продукт ПЦР отличается от последовательности дикого типа 18 парами оснований. Для того, чтобы обеспечить полное секвенирование амплифицированных последовательностей, продукты ПЦР дополнительно секвенировали посредством третьего праймера по месту связывания в амплифицированной последовательности (pCRBM4_S2, pCRBM4_S3; см. Таблицу E). Для того, чтобы исключить неспецифическое связывание праймеров pCRBM4_F1 (SEQ ID NO: 47), pCRBM4_R1 (SEQ ID NO: 48) и pCRBM4_R2 (SEQ ID NO: 50) в геноме дикого типа, нуклеотидные последовательности сравнивали с внутренним эталонным геномом *B. vulgaris*. Посредством ПЦР, праймеры подвергали дополнительному испытанию на связывание в геномных последовательностях растений *B. vulgaris* дикого типа.

Для того, чтобы исключить интеграцию гена устойчивости в другие области генома, была проведена целенаправленная амплификация целевого местоположения (Амплификация целевого локуса, TLA).

Таблица E: Праймер, используемый для верификации вставки кассеты экспрессии гена устойчивости в желаемом сайте интеграции.

Название	Последовательность 5'→3'	Размер продукта ПЦР	Связывание
pCRBM4_F1	SEQ ID NO: 47	450 пар оснований	в пределах кассеты экспрессии гена устойчивости
pCRBM4_R1	SEQ ID NO: 48		в пределах кассеты экспрессии гена устойчивости
pCRBM4_F2	SEQ ID NO: 49	1140 пар оснований,	верхняя цепь 5'-фланкирующей области гомологии
pCRBM4_R2	SEQ ID NO: 50		в пределах промоторной последовательности гена устойчивости

pCRBM4_S2	SEQ ID NO: 66		
pCRBM4_F3	SEQ ID NO: 51	1280	в пределах терминирующей последовательности гена устойчивости
pCRBM4_R3	SEQ ID NO: 52		нижняя цепь 3'-фланкирующей области гомологии
pCRBM4_S3	SEQ ID NO: 67		

В дополнение к верификации и успешной вставке кассеты экспрессии гена устойчивости в геном *B. vulgaris*, также была проверена нежелательная интеграция плазмидной ДНК. Для этого, геномную ДНК, в которой верификация уже подтвердила успешную вставку гена устойчивости в желаемый сайт-мишень, проверили на наличие плазмидной ДНК посредством ПЦР. Области последовательности в пределах *cpfl*, кассеты рибозима крРНК и *tDT* были, таким образом, амплифицированы с использованием праймеров, перечисленных в Таблице F, и впоследствии секвенированы.

Таблица F: Праймеры, используемые для верификации стабильно интегрированных, специфических для плазмид последовательностей в геноме регенерированных побегов *B. vulgaris*

Название	Последовательность 5'→3'	Размер продукта ПЦР	Связывание
pSeq_LbCpfl_F4	SEQ ID NO: 68	214	Cpfl
pSeq_LbCpfl_R3	SEQ ID NO: 69		
pSeq_Рибозим_F	SEQ ID NO: 70	172	кассета рибозима крРНК
pSeq_Рибозим_R	SEQ ID NO: 71		
pSeq_tDT_F	SEQ ID NO: 72	400	<i>tDT</i> (концевая дезоксинуклеотидилтрансфераза)
pSeq_tDT_R	SEQ ID NO: 73		

Пример 2: Введение гена, придающего устойчивость, в качестве трансгена посредством трансформации гена в растение *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*

Трансгенный подход к продуцированию устойчивых к *Церкоспоре* растений служил не только в качестве альтернативной валидации гена LRR, выступающего как ген, придающий устойчивость, но и в качестве средства продуцирования событий трансгенной устойчивости, которые придают новый тип устойчивости к *Церкоспоре* или улучшают уже существующие типы устойчивости к *Церкоспоре*.

Бинарный вектор pZFN-nptII-LRR был сгенерирован с помощью следующих стандартных процедур клонирования: В пределах Т-ДНК этого вектора, кДНК гена

устойчивости в соответствии с SEQ ID NO: 2 была клонирована вместе с ее нативной промоторной последовательностью. Кроме того, Т-ДНК включала ген неомицинофосфотрансферазы II (*nptII*), который придает устойчивость к широкому спектру аминогликозидных антибиотиков, таких как канамицин или паромомицин. Эти типы устойчивости к антибиотикам были использованы для отбора трансгенных растительных клеток и тканей. Промотор *NOS* и терминатор *pAG7* фланкировали ген *nptIII*. Кроме того, остов бинарного вектора содержал источник *colE1* и *pVS1* для репликации плазмиды в *Escherichia coli* или *Agrobacterium tumefaciens*. Ген *aadA* придает устойчивость к стрептомицину / спектиномицину для отбора бактерий. Плазмиду pZFN-nptII-LRR трансформировали в штамме агробактерии AGL-1 посредством стандартной процедуры.

Трансформация свеклы сахарной происходила в соответствии с описанным в работе Линдси и Галлуа (1990), «Трансформация свеклы сахарной (*Beta vulgaris*) посредством *Agrobacterium tumefaciens*». *Journal of Experimental Botany* 41.5, 529-536.). Для этого, в качестве исходного материала использовали «полученные микроразмножением побеги» генотипа 04E05B1DH5, которые не несли ген устойчивости по настоящему изобретению. Побеги размножали в соответствующей среде в соответствии с описанным в работе Линдси и Галлуа (1990). Для того, чтобы индуцировать как можно больше меристем, «побеги» переносили в другую среду (см. Линдси и Галлуа (1990)) и инкубировали в темноте в течение нескольких недель при температуре, примерно, 30 °С. Штамм агробактерий AGL-1 с вектором pZFN-nptII-LRR (Фигура 3) культивировали в дополнительной среде (см. Линдси и Галлуа (1990)), дополнительно наделенной соответствующими антибиотиками для отбора. Срезы меристемной ткани на основе побега, подлежащего обработке, инкубировали с агробактериями в течение нескольких часов в дополнительной среде (см. Линдси и Галлуа (1990)). Эксплантаты растения и агробактерии совместно культивировали в темноте в течение, по меньшей мере, 2 дней в среде (см. Линдси и Галлуа (1990)), а затем инокулированные эксплантаты инкубировали в темноте в течение, примерно, 2 недель в дополнительной среде (см. Линдси и Галлуа (1990)). Затем эксплантаты были дополнительно размножены в дополнительной среде (см. Линдси и Галлуа (1990)) и подвергнуты субкультивированию для обеспечения возможности отбора трансгенной ткани. Для завершения фазы отбора и уменьшения уровня образования химер, зеленые «побеги» перенесли в среду H, и всех их размножали в течение 2 недель. Затем листовой материал извлекали из зеленых, растущих «побегов» и исследовали посредством РСТ на наличие трансгена. Подходящие «побеги» были укоренены в среде I, и впоследствии их перенесли в теплицу для получения семенного материала T1. Кроме того, листовой материал, полученный из этих «побегов», был использован для анализа экспрессии

трансформированного гена устойчивости.

Анализ уровня экспрессии

РНК была выделена из листьев «побегов» в условиях *in vitro* и использована в рамках qRT-ПЦР. qRT-ПЦР проводили в соответствии с описанным в работе Вельтмейер *и соавт.* 2011 (см. Предпосылки создания изобретения). Измеренные значения были нормализованы относительно эталонного гена PLT3_075_F09 (см. Вельтмейер *и соавт.* 2011). Экспрессию определяли посредством использования следующих последовательностей праймеров:

Последовательность	Размер [NO: нуклеотидов]	Tm (температура плавления) [C°]	Размер продукта амплификации [NO: нуклеотидов]
SEQ ID NO: 92	21	59,8	170
SEQ ID NO: 93	21	58,9	170

Испытание на устойчивость свеклы сахарной после инокуляции *Cercospora beticola* в условиях теплицы:

Чистую культуру *Cercospora beticola* с известной высокой вирулентностью размножали на агаре с овощным соком в чашках Петри (диаметром 9 см) при температуре 20 °C в условиях ближней области ультрафиолетового спектра (NUV). Через 14 дней поверхность агара, на которой выращивали плесень, заливали из расчета 10 мл стерильной воды на чашку Петри, и фрагменты конидий и мицелия тщательно соскабливали с помощью носителя субъекта. Для инокуляции растений использовали инокулят плотностью 20 000 фрагментов конидий/мицелия на мл, плюс 0,1% TWEEN 20. На момент инокуляции, растения были культивированы в течение 8-9 недель в условиях теплицы. Верхняя сторона и нижняя сторона листьев были обработаны инокулятом. Затем растения инкубировали в течение 5-7 дней при температуре 25 °C, 18 час/6 час при свете/в темноте и при влажности, составляющей, примерно, 100%. Первые симптомы Церкоспороза на листьях свеклы сахарной появились через 12-14 часов. Оценка симптомов отдельных растений проводили регулярно с использованием оценки на основании рейтинговых баллов, приведенных в Таблице 1 А. Результаты приведены ниже.

Таблица G: Результаты верификации в отношении трансгенов функции гена устойчивости по настоящему изобретению в трансформированных растениях;

LSD = минимальное значимое различие; dpi = количество дней, прошедших после заражения

Группа испытуемых	Количество индивидуумов	Среднее значение рейтингового балла				Функция	Уровень экспрессии гена устойчивости по настоящему изобретению
		8 dpi	11 dpi	13 dpi	15 dpi		
1	57	1,60	3,82	5,24	6,46	негативный контроль	0,0
2	38	1,28	3,07	4,42	6,04	валидация в отношении трансгенов	4,6
3	60	1,26	2,83	4,38	6,20	валидация в отношении трансгенов	12,5
4	45	1,50	3,40	4,62	6,18	валидация экспрессии в условиях <i>in vitro</i> отсутствует	0,0
5	60	1,44	3,62	5,29	6,38	валидация в отношении трансгенов	2,6
6	57	1,68	3,69	5,30	6,52	валидация в отношении трансгенов	3,3
7	66	1,58	3,84	5,43	6,57	валидация в отношении трансгенов	2,9
8	60	1,31	2,81	4,19	5,48	валидация в отношении трансгенов	11,3
9	72	1,25	3,07	4,61	5,97	валидация в отношении трансгенов	26,8
10	60	1,44	3,26	4,77	6,00	валидация в отношении трансгенов	10,7
11	57	1,60	3,83	5,48	6,64	валидация в отношении трансгенов	4,4
12	72	1,34	2,62	3,75	5,19	растение, являющееся источником устойчивости	не определено
итоговое среднее	58,66	1,44	3,32	4,8	6,13		
Значение LSD	-	0,17	0,47	0,48	0,4		

Результаты валидации в отношении трансгенов гена устойчивости по настоящему изобретению (см. Таблицу G)

Группа испытуемых 1 представляет негативный контроль. Генотип такой же, как и у групп испытуемых 2-11, но никакой трансформации не произошло. Таким образом, никакую экспрессию невозможно было распознать. Группа испытуемых 4 была трансформирована, но никакую экспрессию невозможно было распознать. Группы испытуемых 2, 3 и 5-11 представляют трансформанты, которые несут ген устойчивости по настоящему изобретению только благодаря трансформации. Группа испытуемых 12 представляет линию скрещивания, содержащую ген устойчивости по настоящему изобретению в нетрансгенной версии. Рейтинговые баллы всех линий были установлены после инокуляции растительного материала *Cercospora beticola*, как описано выше. Группа испытуемых 12 демонстрирует самую высокую устойчивость, о которой свидетельствует итоговое значение 5,19.

Трансгенные линии показали рейтинговый балл в соответствии со следующей таблицей:

Таблица Н: Рейтинговые баллы трансгенных линий таблицы G

	8 dpi	11 dpi	13 dpi	15 dpi
среднее значение валидации в отношении трансгенов	1,42	3,33	4,87	6,2
среднее значение валидации в отношении трансгенов для линий с уровнем экспрессии > 10	1,315	2,99	4,48	5,91

В Таблице Н показано, что рейтинговые баллы относятся только к группам валидации в отношении трансгенов. Сначала показаны средние значения для всех трансгенных групп испытуемых (за исключением группы 4). Ниже приведены рейтинговые баллы только для тех трансгенных линий, которые продемонстрировали уровень экспрессии, составляющий, по меньшей мере, 10 (группы 3, 8, 9, 10; см. Таблицу G). В данном случае, итоговый рейтинговый балл составляет 5,91. Это значительно более высокая устойчивость, чем у группы негативного контроля 1, у которой рейтинговый балл составляет всего 6,46 (наименьшая значимая разница = 0,4; см. Таблицу G). Лучшая трансгенная группа испытуемых (группа 8) демонстрирует еще лучшую устойчивость, благодаря рейтинговому баллу, составляющему 5,48 (см. Таблицу G).

Стоит отметить, что на уровень экспрессии трансгенных вставок может влиять локус интеграции. Поскольку уровень экспрессии был измерен в условиях *in vitro*, фактический уровень экспрессии в условиях заражения мог бы быть выше - особенно в тех случаях, когда ген устойчивости находится под контролем патоген-индуцируемого промотора.

Статистическая оценка результатов валидации в отношении трансгенов

Таблица I: Статистическая кластеризация

Группа испытуемых	Кластер 8 dpi	Кластер 11 dpi	Кластер 13 dpi	Кластер 15 dpi
1	ab	a	a	ab
2	e	de	bc	cd
3	e	ef	c	bcd
4	bc	bcd	bc	bcd
5	cd	abc	a	abc
6	a	ab	a	ab
7	ab	a	a	a
8	de	ef	c	e
9	e	de	bc	d
10	cd	cd	b	d
11	ab	a	a	a
12	de	f	d	e

В Таблице I показана статистическая оценка рейтинговых баллов, содержащихся в Таблице G. Каждая буква символизирует отнесение к статистической группе. Например, очевидно, что после итоговой оценки (15 dpi) группа испытуемых 8 (верификация в отношении трансгенов) находится в том же кластере, что и группа испытуемых 12 (источник устойчивости), но в кластере, отличном от кластера группы испытуемых 1 (негативный контроль). В соответствии с этим, группа испытуемых 8 существенно отличается от группы испытуемых 1, но не существенно отличается от группы испытуемых 12.

Дополнительно был проведен анализ в виде коробчатой диаграммы. Иллюстрация коробчатых диаграмм представлена на Фигурах 4-7.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, который способен придавать устойчивость к *Cercospora* растению, в котором экспрессируется полипептид, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая выбрана из

(a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 3;

(b) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 2;

(c) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 53;

(d) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с комплементарной последовательностью нуклеотидной последовательности по пункту (a), (b) или (c), в жестких условиях;

(e) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, который, посредством замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты аминокислотной последовательности, отличается от полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью по пункту (a), (b) или (c);

(f) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 70 % идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3.

(g) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 70 % идентична последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2;

при этом, устойчивость к *Cercospora*, предпочтительно, представляет собой устойчивость к *Cercospora beticola*, или растение относится к подвиду *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*.

2. Полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по пункту 1.

3. Вектор или кассета экспрессии, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по пункту 1.

4. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по пункту 1 или полипептид по пункту 2.

5. Устойчивое к *Cercospora* растение или его сегмент, отличающееся тем, что растение или его сегмент содержит молекулу нуклеиновой кислоты по пункту 1, в виде

Формула изначально поданная

эндогена или трансгена, при этом, растение, в виде эндогена содержащее молекулу нуклеиновой кислоты, относится к подвиду *Beta vulgaris subsp. vulgaris*.

6. Семя или потомок растения по пункту 5, отличающееся тем, что семя или потомок содержит молекулу нуклеиновой кислоты по пункту 1 в виде трансгена или эндогена.

7. Семя по пункту 6, прошедшие техническую обработку, отличающееся тем, что техническая обработка выбрана из группы, состоящей из:

- (a) Полировки
- (b) Протравливания, предпочтительно, дражирования
- (c) Инкрустации
- (d) Окрашивания

8. Способ повышения устойчивости к *Cercospora* растения вида *Beta vulgaris*, включающий следующие этапы:

(i) интеграцию молекулы нуклеиновой кислоты по пункту 1 посредством гомологически направленной репарации или гомологической рекомбинации - предпочтительно, стимулируемой сайт-направленной нуклеазой - в геном, по меньшей мере, одной клетки растения вида *Beta vulgaris* и, необязательно, регенерацию растения из растительной клетки; или

(ii) повышение экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по пункту 1 в растении - предпочтительно, посредством модификации нативного промотора в соответствии с SEC ID NO: 7 или посредством слияния молекулы нуклеиновой кислоты с гетерологичным промотором, который демонстрирует более высокую активность по сравнению с нативным промотором - в частности, после заражения *Cercospora*; или

(iii) повышение активности и/или стабильности полипептида по пункту 3 посредством модификации нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по пункту; или

(iv) трансформацию растительной клетки с молекулой нуклеиновой кислоты по пункту 1, или вектором, или кассетой экспрессии по пункту 3, и регенерацию трансгенного растения из трансформированной растительной клетки.

9. Способ продуцирования растения, устойчивого к *Cercospora*, по пункту 5, включающий следующие этапы:

(Ia) трансформацию растительной клетки с молекулой нуклеиновой кислоты по пункту 1, или вектором, или кассетой экспрессии по пункту 3; и

(Ib) регенерацию трансгенного растения из трансформированной растительной

Формула изначально поданная

клетки, или

(IIa) введение сайт-направленной нуклеазы и репарационной матрицы в клетку растения рода *Beta vulgaris*, отличающийся тем, что сайт-направленная нуклеаза способна генерировать, по меньшей мере, один двухцепочечный разрыв ДНК в геноме клетки, и репарационная матрица содержит молекулу нуклеиновой кислоты по пункту 1;

(IIb) культивирование клетки из этапа (IIa) в условиях, допускающих гомологически направленную репарацию или гомологическую рекомбинацию, при этом, молекула нуклеиновой кислоты интегрирована из репарационной матрицы в геном растения; и

(IIc) регенерацию растения из клетки, модифицированной на этапе (b).

10. Способ по пункту 9, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один двухцепочечный разрыв происходит в чувствительном аллельном варианте молекулы нуклеиновой кислоты по пункту 1, или тем, что, по меньшей мере, один двухцепочечный разрыв происходит в положении, охватывающем не более 10 000 пар оснований выше или ниже чувствительного аллельного варианта, при этом, аллельный вариант кодирует полипептид, который не придает устойчивости к *Cercospora*.

11. Способ по пункту 10, отличающийся тем, что чувствительный аллельный вариант содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из

(a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 6

(b) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 5

(c) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 4,

(d) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с последовательностью, комплементарной одной из нуклеотидных последовательностей по пункту (a), (b) или (c) в жестких условиях

(e) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, который отличается от полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью по пункту (a), (b) или (c) путем замещения, путем делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислотной последовательности

(f) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 70% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 6, или

Формула изначально поданная

(g) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 70% идентична последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

12. Способ идентификации, и, необязательно, предложения, растения вида *Beta vulgaris*, устойчивого к *Cercospora*, отличающийся тем, что способ включает, по меньшей мере, этап (i) или (ii):

(i) определение присутствия и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по пункту 1, или присутствия полипептида по пункту 2, в растении или сегменте растения; и/или

(ii) определение, по меньшей мере, одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по пункту 1 или в косегрегационной области, и

(iii) необязательно, отбор растения, устойчивого к *Cercospora*, предпочтительно при этом, чтобы косегрегационная область представляла собой геномную область в *Beta vulgaris*, которая косегрегирует с устойчивостью к *Cercospora*, придаваемой полипептидом по пункту 2, или с молекулой нуклеиновой кислоты по пункту 1, более предпочтительно, чтобы косегрегирующая область

a) содержала и фланкировалась маркером *sxh0678s01* и *s4p0264s01*, или

b) содержала аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 74 и/или 75.

13. Способ культивирования растений вида *Beta vulgaris*, включающий

(i) предложение растений по пункту 5, продуцирование растений вида *Beta vulgaris* с помощью способа по одному из пунктов 8-12, или идентификацию и отбор растений рода *Beta* с помощью способа по пункту 12, и

(ii) культивирование растений из пункта (i) или их потомков, отличающийся тем, что способ предотвращает заражение культивируемых растений *Cercospora*

14. Олигонуклеотид, состоящий из, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 - предпочтительно, из, по меньшей мере, 21, 22, 23, 24 или 25, особенно предпочтительно, из, по меньшей мере, 30, 35, 40, 45 или 50, и, особенно предпочтительно, из, по меньшей мере, 100, 200, 300 или 500 - нуклеотидов в длину, при этом, олигонуклеотид специфически гибридизируется с нуклеотидной последовательностью, как определено пункте 1.

15. Способ продуцирования организма, содержащего мутированную версию молекулы нуклеиновой кислоты по пункту 1 и/или мутированную версию промотора,

Формула изначально поданная

содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из

(a) SEQ ID NO: 7

(b) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся в жестких условиях с последовательностью, комплементарной последовательности по пункту (a)

(c) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 70 % идентична последовательности, в соответствии с SEQ ID NO: 7;

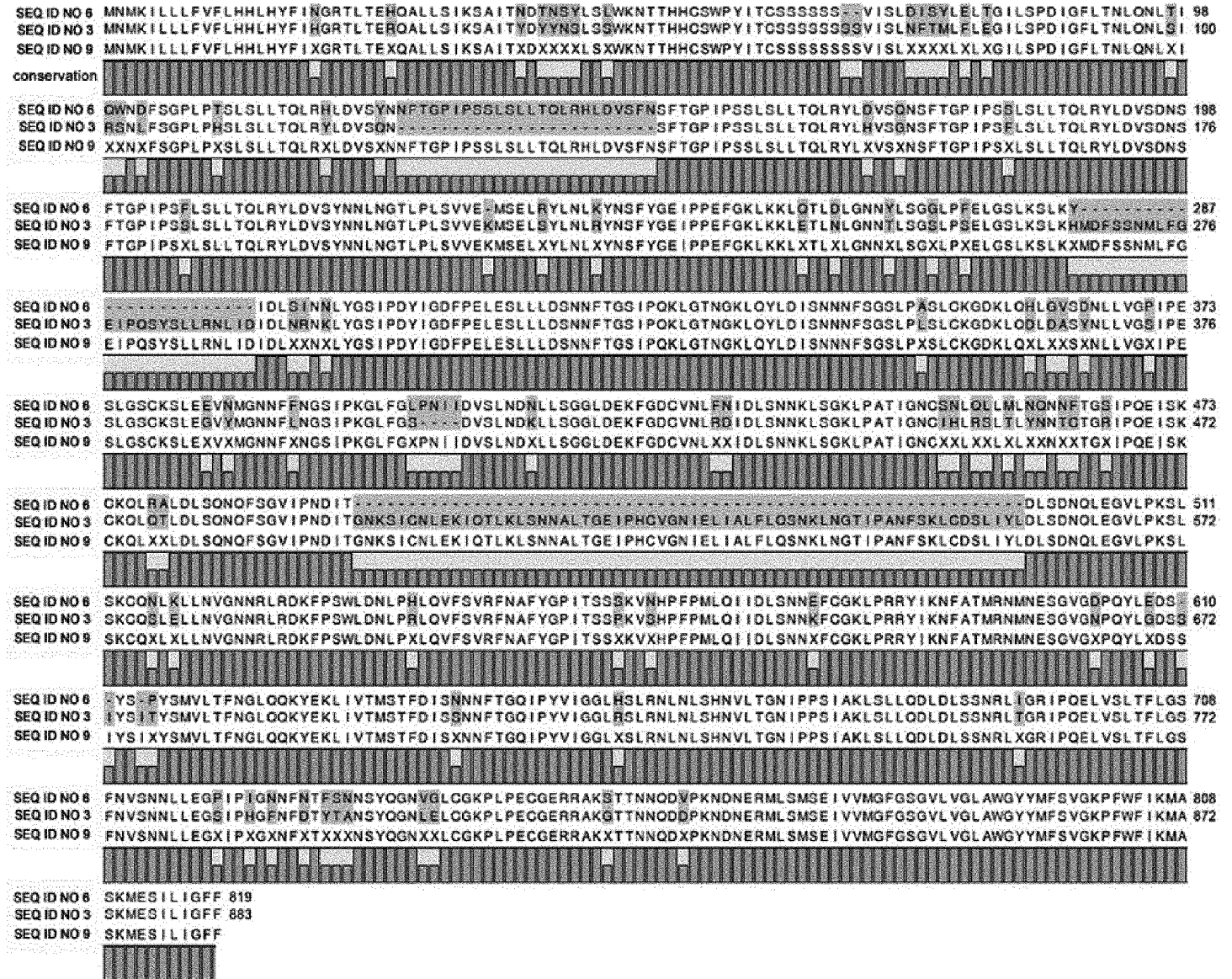
отличающийся тем, что способ включает следующие этапы:

(I) Предложение организма или клетки, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты и/или промотор

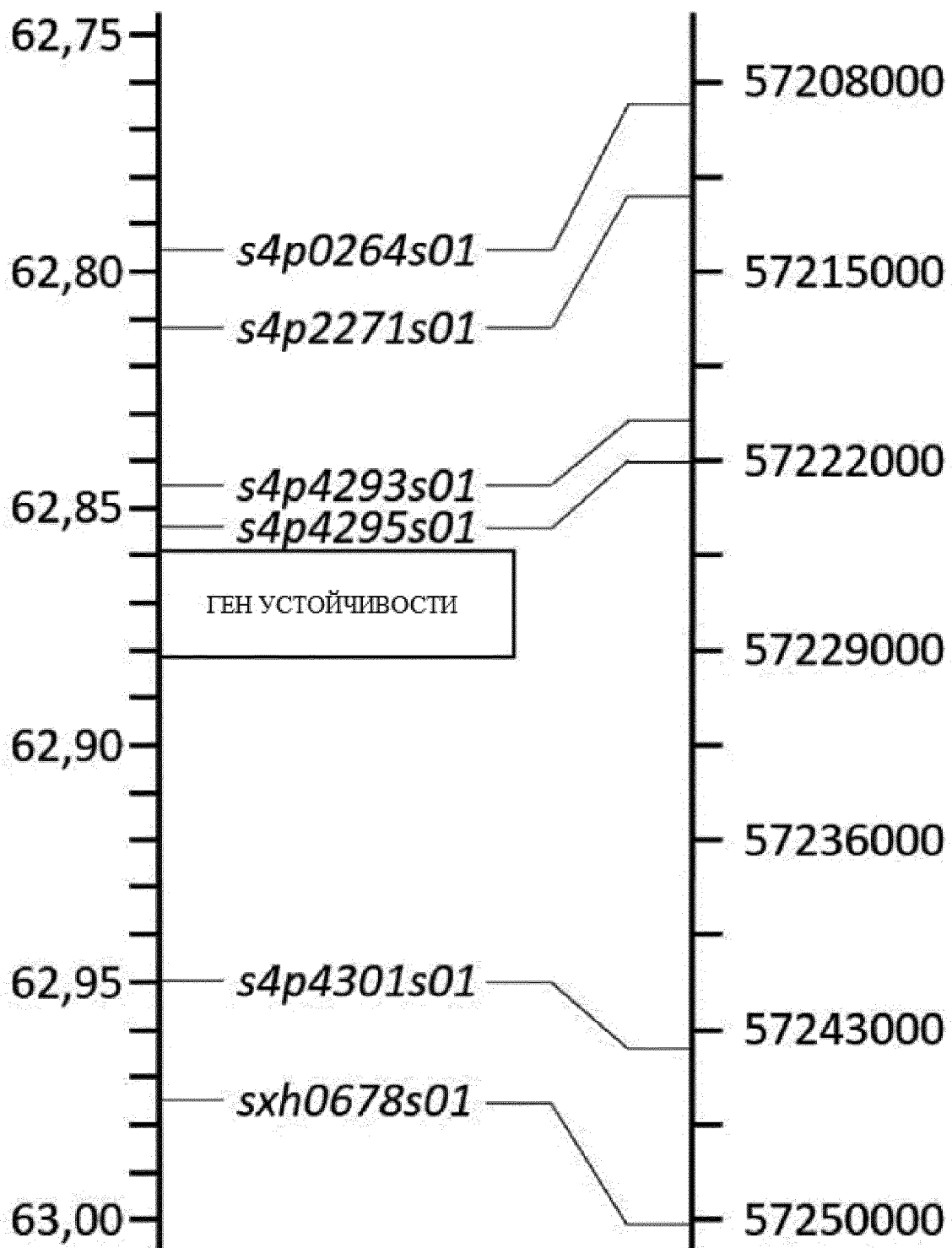
(II) Увеличение частоты мутаций организма или клетки, или мутагенеза организма, или клетки

(III) Фенотипический отбор организма, который в результате мутации демонстрирует измененную устойчивость или измененный уровень устойчивости к *Cercospora beticola*, или генотипический отбор организма или клетки, содержащей мутацию в молекуле нуклеиновой кислоты и/или промотор, при этом, мутация была создана на этапе (II), и, необязательно,

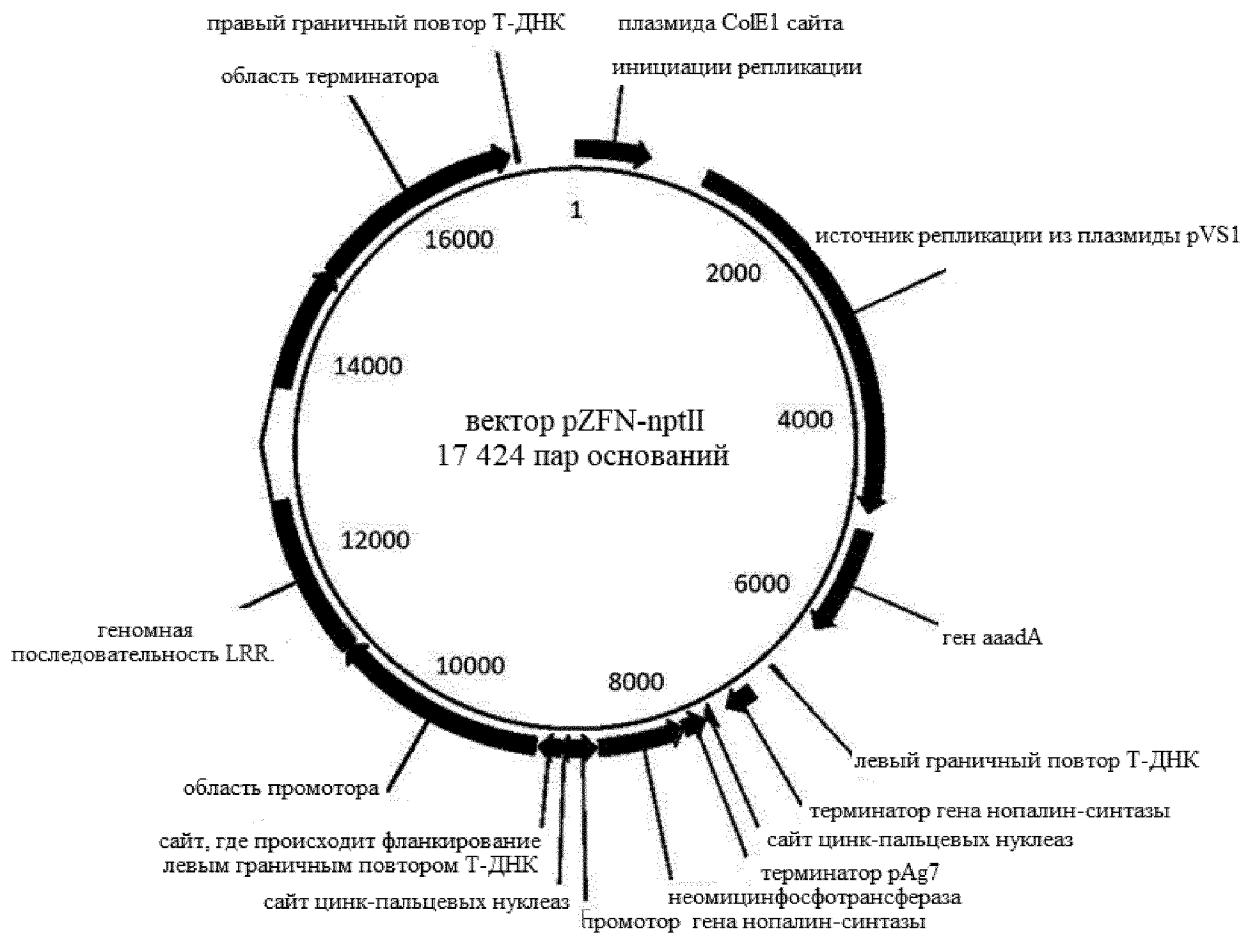
(IV) Регенерацию организма из клетки, полученной на этапе (III).



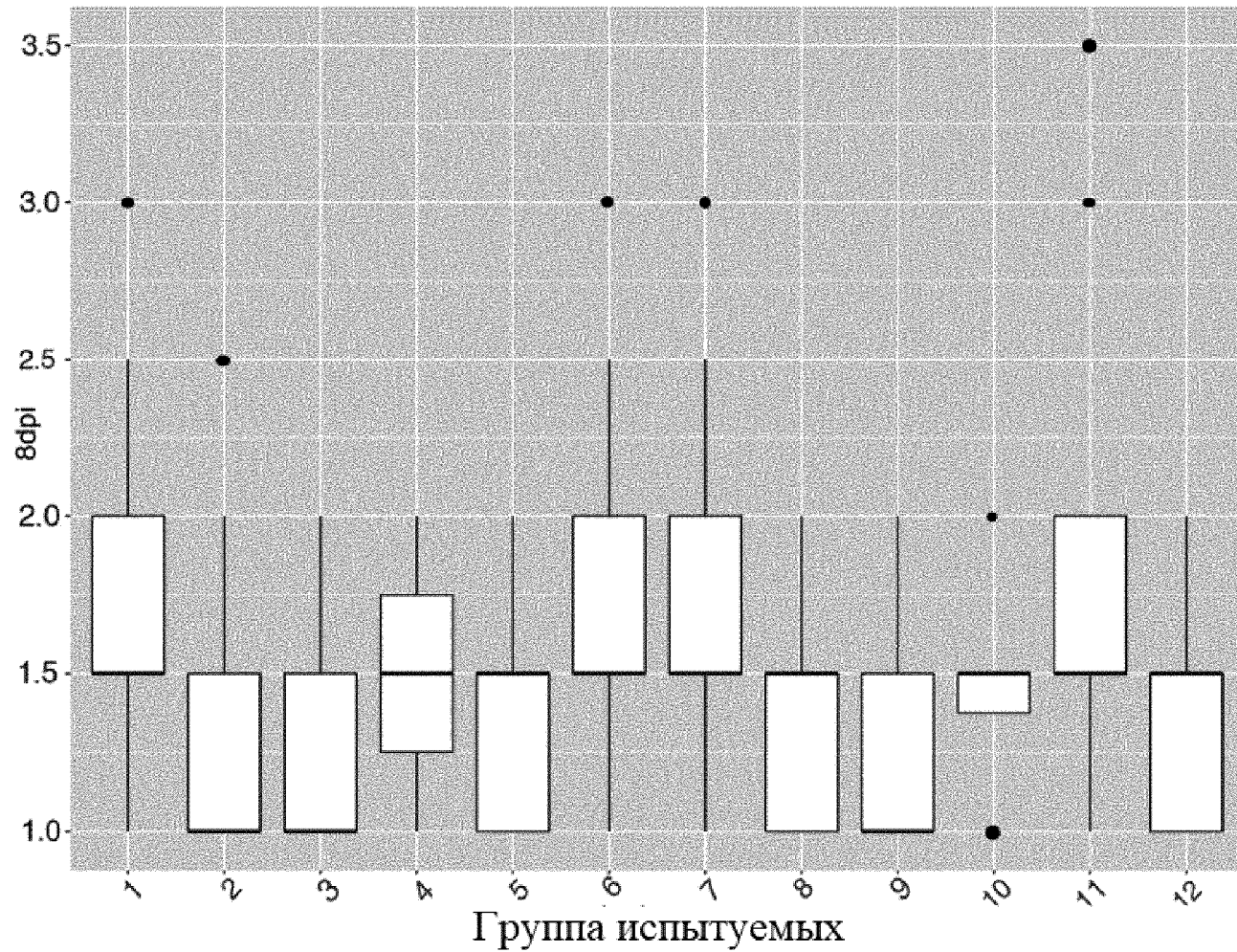
Фиг. 1



Фиг. 2

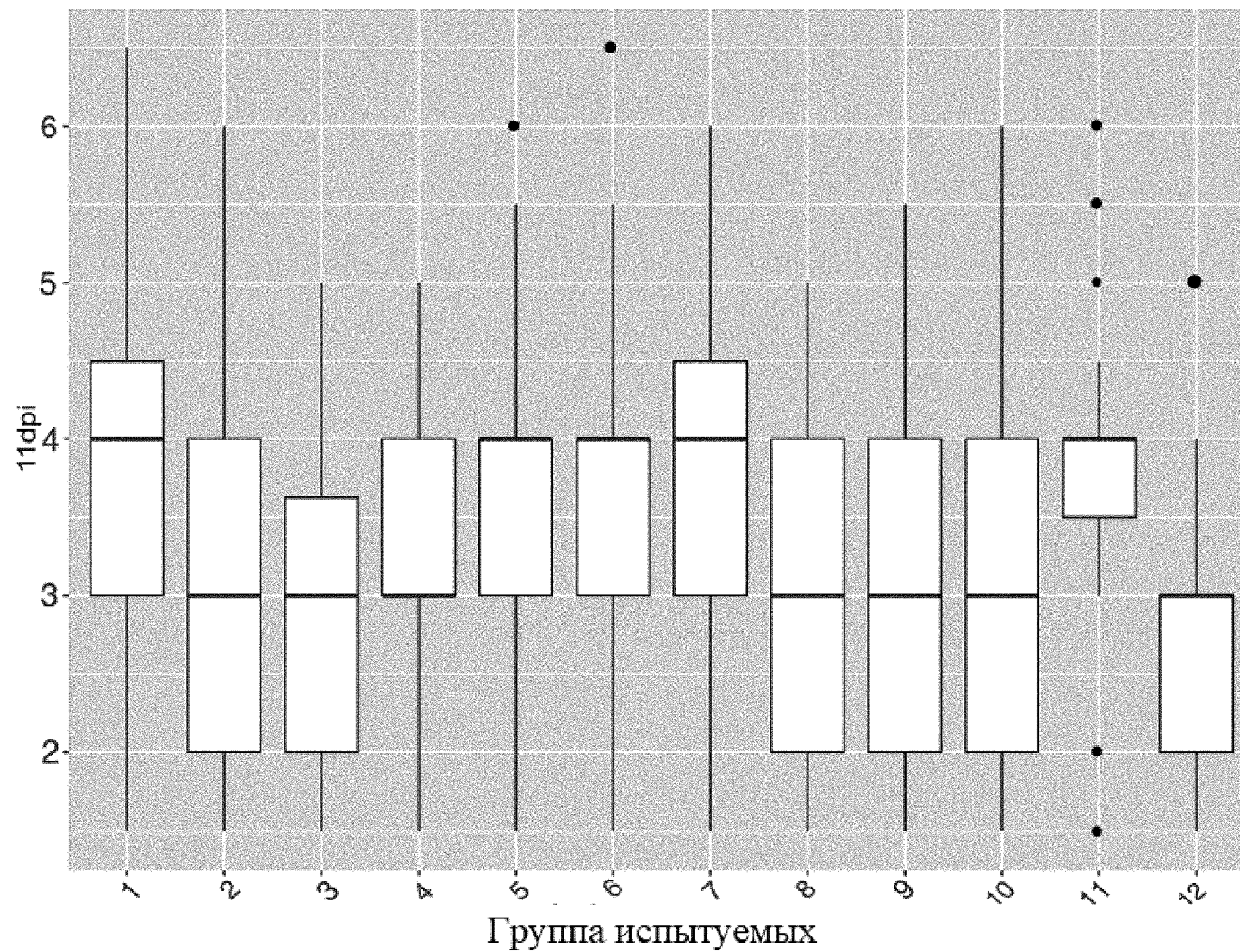


Фиг. 3

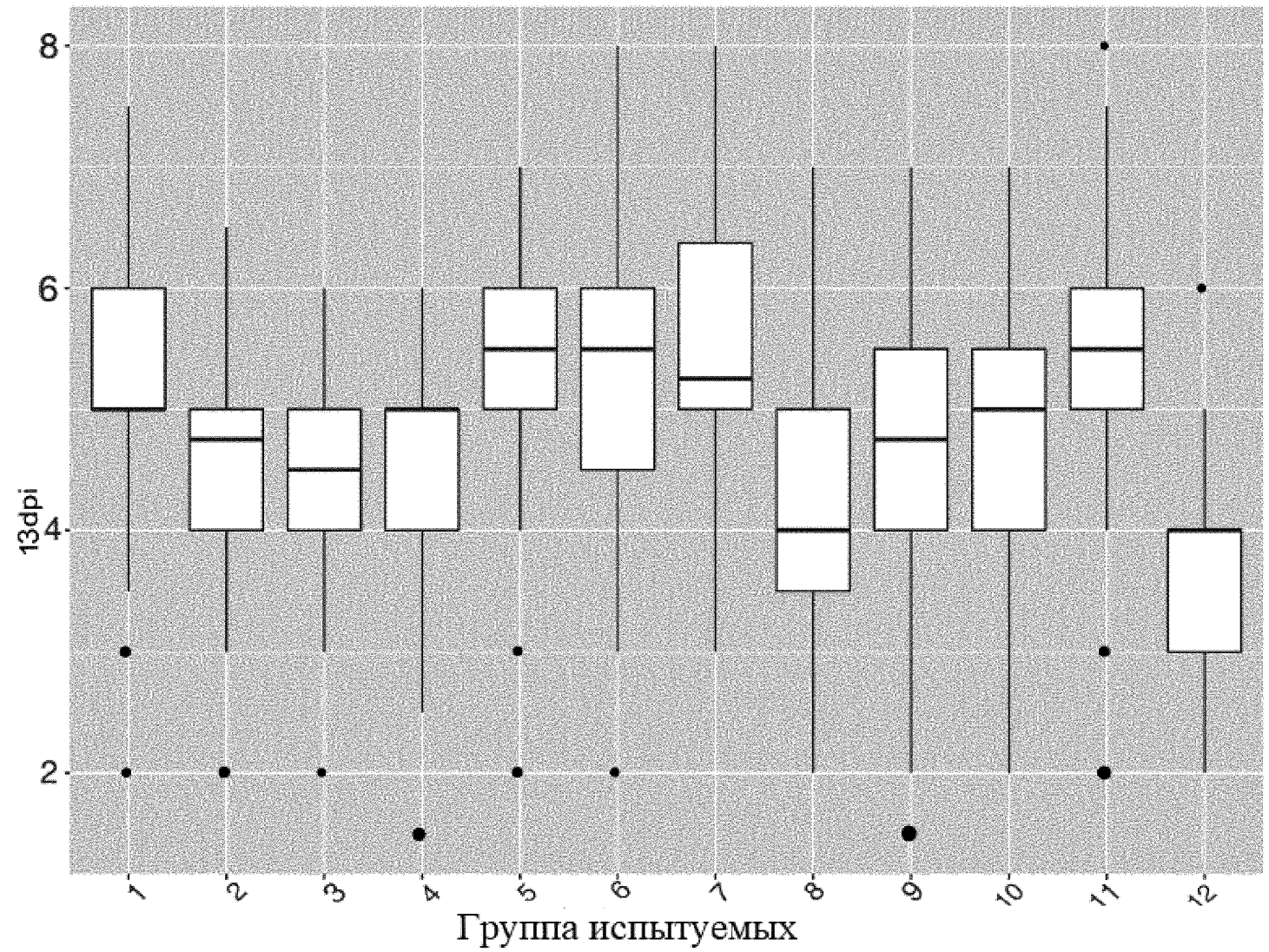


Фиг. 4

5

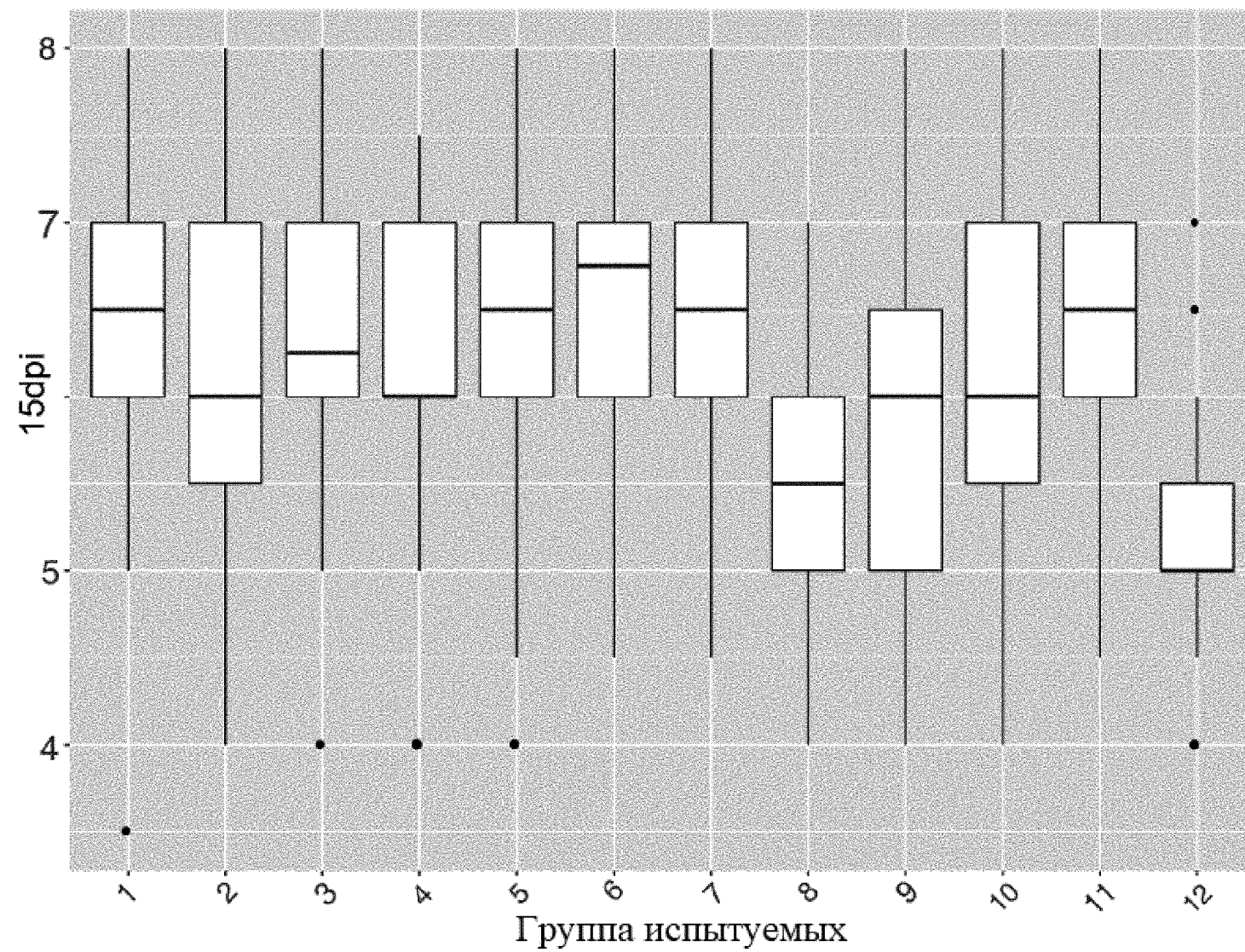


Фиг. 5



Фиг. 6

L



Фиг. 7