

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192341** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.12.08

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

(22) Дата подачи заявки
2020.03.01

(54) УСТОЙЧИВОСТЬ К ПАТОГЕНАМ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

(31) **19160408.1**

(32) **2019.03.01**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2020/055380**

(87) **WO 2020/178215 2020.09.10**

(71) Заявитель:
КВС ЗААТ СЕ & КО. КГАА (DE)

(72) Изобретатель:

**Штиривайс Даниэль Фабиан,
Шталь Дитмар, Фишер Урс Конрад,
Клаппродт Кристина (DE)**

(74) Представитель:
Зуйков С.А. (RU)

(57) Изобретение относится к области биотехнологии растений. А конкретнее, предложены способы и последовательности нуклеиновой кислоты для получения устойчивости к патогенам у растений и для генерирования устойчивых растений. В частности, изучена роль центральной молекулы в иммунитете растений. Основываясь на исследованных механизмах, настоящее изобретение предлагает стратегии для специфической модуляции указанной молекулы члена семейства фосфатазоподобных белков посредством различных транзистентных и/или стабильных методов, отдельно или в комбинации, для достижения надежного повышения устойчивости к патогенам у различных растений-мишеней для получения растений и растительных материалов, обладающих природной устойчивостью к патогенам, чтобы избежать серьезных потерь урожая, вызванных основными патогенами растений, биологическими средствами вместо обработки гербицидами или пестицидами.

A1

202192341

202192341

A1

Устойчивость к патогенам сельскохозяйственных растений

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии растений. А конкретнее, предложены способы и последовательности нуклеиновых кислот для получения устойчивости к патогенам у растений и для генерирования устойчивых растений. В частности, изучена роль центральной молекулы в иммунитете растений. Основываясь на исследованных механизмах, настоящее изобретение предлагает стратегии для специфической модуляции молекулы члена семейства фосфатазоподобных белков или экспрессии указанной молекулы члена семейства фосфатазоподобных белков посредством различных транзистентных и/или стабильных методов, по отдельности или в комбинации, для достижения надежного повышения устойчивости к патогенам у различных растений-мишеней для получения растений и растительных материалов, обладающих природной устойчивостью к патогенам, чтобы избежать серьезных потерь урожая, вызванных основными патогенами растений, биологическими средствами вместо обработки гербицидами или пестицидами.

Предпосылки создания изобретения

У растений, в отличие от млекопитающих, отсутствует иммунная система, основанная на мобильных циркулирующих защитных клетках, и отсутствуют такие механизмы, как адаптивная иммунная система. Тем не менее, растения обладают высокоэффективной двухуровневой врожденной иммунной системой, которая позволяет им реагировать на инфекции, например, заражение микробными патогенами (Джонс и Дангл, (2006). Иммунная система растений. *Nature*, 444(7117), 323). Первый уровень защиты основан на распознавании эволюционно консервативных молекулярных паттернов, ассоциированных с патогенами или микроорганизмами (PAMP или MAMP), так называемыми паттерн-распознающими рецепторами (PRR). PAMP или MAMP представляют собой инвариантные структуры, широко представленные среди таксонов микроорганизмов, и они играют важную роль в физиологии микроорганизмов. Было установлено, что только очень специфичная группа молекул функционирует как PAMP (Годе и Грей-Оуэн, (2016). Гептоза бьет тревогу: врожденное распознавание бактериального сахара стимулирует иммунитет. *PLoS pathogens*, 12(9), e1005807). Также было установлено, что консервативные молекулы из нематод могут создать защиту растений и устойчивость к патогенам (Маносальва и соавт., (2015). Консервативные

сигнальные молекулы нематод создают защиту растений и устойчивость к патогенам. *Nature communications*, 6, 7795.). Соответственно, такие молекулы были определены как молекулярные структуры, ассоциированные с нематодами (NAMP).

Помимо молекулярных паттернов, происходящих от патогена, растения также могут распознавать молекулярные паттерны, ассоциированные с разрушением клеточной стенки или повреждением клетки, так называемые молекулярные паттерны, ассоциированные с опасностью/повреждением (DAMP).

PRR обычно представляют собой рецепторы плазматической мембраны, которые зачастую связаны с внутриклеточными киназными доменами, или им требуется корецептор для обеспечения сигнальной функции. В зависимости от наличия домена сигнальной трансдукции, PRR растений классифицируются либо как рецептор-подобные киназы (RLK), либо как рецептор-подобные белки (RLP), как описано в работе Мачо и Зипфель ((2014). PRR растений и активация врожденной иммунной сигнализации. *Molecular cell*, 54(2), 263-272.). Распознавание PAMP, MAMP, NAMP или DAMP в апопласте паттерн-распознающими рецепторами (PPR) инициирует сложные сигнальные каскады от рецептора в плазматической мембране к ядру, приводящие к иммунитету, запускаемому PRR (PTI). В качестве эволюционной адаптации, патогены конкурируют с защитной системой и могут быть способны подавлять первый защитный уровень посредством секреции эффекторных белков, которые мешают сигнализации (Джонс и Дангл, 2006).

Второй уровень защиты растения, иммунитет, запускаемый эффектором (ETI), в основном создается внутри клетки растения. ETI основывается на специфическом распознавании эффекторов устойчивости к болезни на патогене, при этом, эффектор устойчивости к болезни, как известно на сегодняшний день, обычно распознается распознающими белками растения, содержащими полиморфный нуклеотид-связывающий домен (NB) и домен лейцин-богатого повтора (LRR). Это распознавание приводит к сильному защитному ответу, который зачастую ассоциируется с локальной запрограммированной гибелью клеток, реакцией гиперчувствительности. Поскольку патогенные эффекторы зачастую являются видоспецифичными или изолятспецифичными, этот второй уровень иммунитета эффективен только против изолятов, несущих распознанный эффектор, который затем называется геном авирулентности.

Способен ли потенциальный патоген преодолеть первый уровень защиты, PTI, и эффективно размножиться, зависит от его внутренней способности подавлять ответы PTI растения. Но это также зависит и от способности растений эффективно и быстро

индуцировать и, при необходимости, поддерживать защитные ответы выше определенного порога для эффективной устойчивости (Джонс и Дангл, 2006). Ответы РТІ обычно консервативны и включают активацию митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), генерацию активных форм кислорода, активацию сигнальных путей салициловой кислоты (SA) и жасмоновой кислоты (JA) и усиленную экспрессию защитных генов растения, таких как гены, связанные с патогенезом.

Активацию транскрипции, индуцированную механизмом РТІ или ЕТІ, можно измерить очень быстро, обычно в течение нескольких минут или часов после заражения, и она снижается после эффективного защитного ответа. Транскрипция генов, кодирующих белок, у эукариот сложно управляется РНК-полимеразой II (RNAPII), общими факторами транскрипции, медиаторами и ген-специфическими факторами транскрипции. Комплекс мультисубъединичных RNAPII эволюционно сохраняется от дрожжей до человека. Его самая большая субъединица Rpb1 содержит карбоксиконцевой домен (CTD), состоящий из консервативных гептапептидных повторов с консенсусной последовательностью $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$ (Буратовски, (2009). Прохождение по циклу CTD РНК-полимеразы II. *Molecular cell*, 36(4), 541-546.). Количество повторов варьируется от 26 у дрожжей, 34 у *Arabidopsis* и 52 у млекопитающих (Хайхэйдари и соавт., (2013). Новые роли CTD РНК-полимеразы II у *Arabidopsis*. *Trends in plant science*, 18(11), 633-643.). Комбинаторную сложность посттрансляционных модификаций CTD составляет так называемый «CTD-код», который считывается CTD-связывающими белками для регулирования цикла транскрипции, модификации структуры хроматина и модуляции кэпирования РНК, сплайсинга и полиаденилирования. В частности, CTD подвергается волнам событий фосфорилирования и дефосфорилирования SER, регулируемых различными CTD-киназами, зачастую членами циклинзависимых киназ (CDK) и фосфатазами во время инициации, удлинения и терминации транскрипции. Взаимодействие между различными CTD-киназами и фосфатазами обеспечивает средства для связывания и координации определенных стадий транскрипции путем рекрутирования других факторов, необходимых для правильной экспрессии генов (Буратовски, 2009).

У *Arabidopsis* к настоящему времени описаны пять членов семейства фосфатазоподобных белков (CPL1-5) с CTD (Койва и соавт. (2002). Члены семейства фосфатазоподобных белков с С-концевым доменом (AtCPL), по-разному регулируют у *Arabidopsis thaliana* сигнализирование абиотического стресса, рост и развитие. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10893-10898.; и Фукудоме и соавт. (2014). CPL4

Arabidopsis является важной Ser2-специфической CTD-фосфатазой, регулирующей общую и чувствительную к ксенобиотикам экспрессию генов (617.2). *The FASEB Journal*, 28(1_дополнение), 617-2.). Было доказано, что они обладают предпочтениями к различным фосфорилированным серинам в гептапептидных повторах и участвуют в различных биологических процессах. Было доказано, что AtCPL1 *Arabidopsis* является отрицательным регулятором чувствительной к стрессу экспрессии генов в различных стрессовых условиях (холод, абсцизовая кислота (ВА), обработка солью и дефицит железа) (Койва и соавт., 2002) и отрицательно регулирует гены JA-биосинтеза, индуцированного раной. Было описано, что AtCPL2 *Arabidopsis* участвует в регуляции осмотического стресса и ауксиновых ответов, и влияет на развитие растения (Уэда и соавт., (2008). У *Arabidopsis thaliana* карбоксиконцевой домен фосфатазоподобный 2 регулирует рост растения, стресс и ауксиновые ответы. *Plant molecular biology*, 67(6), 683.). Было доказано, что AtCPL3 *Arabidopsis* является отрицательным регулятором ВАВА-индуцированной экспрессии генов (Койва и соавт., 2002). Полный нокаут AtCPL3 посредством вставки Т-ДНК или мутаций раннего стоп-кодона привел к снижению роста и раннему цветению (Койва и соавт., 2002). AtCPL4 *Arabidopsis* был описан как важный ген, участвующий в регуляции ответов ксенобиотиков на стресс (Фукудоме и соавт., 2014), развитии боковых корней, и его сайленсинг индуцирует сверхчувствительный к цитокининам органогенез *de novo* побегов (Фукудоме и соавт., (2018). У *Arabidopsis* сайленсинг КАРБОКСИКОНЦЕВОГО ДОМЕНА ФОСФАТАЗОПОДОБНОГО 4 индуцирует сверхчувствительный к цитокининам органогенез побегов *de novo*. *The Plant Journal*, 94(5), 799-812.). Сообщалось, что AtCPL5 *Arabidopsis* кодирует уникальный белок семейства CPL, который положительно регулирует АВА-опосредованное развитие и ответы на засуху у *Arabidopsis* (Джин и соавт., (2011). AtCPL5, новая Ser-2-специфическая фосфатаза С-концевого домена РНК-полимеразы II, положительно регулирует АВА и ответы на засуху у *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 190(1), 57-74.). К настоящему времени определенные члены семейства CPL генов/белков были идентифицированы у *Arabidopsis*, но необходимо провести дополнительную работу над специфической функцией указанных белков, в частности, в контексте сложной сети иммунитета растений.

Таким образом, в настоящее время понимание иммунитета растений углубляется. В частности, были исследованы определенные аспекты сигнализирования PRR и ETI-ответов у растений, однако очень мало известно о сложном взаимодействии между растениями и патогенами, стремящимися подорвать иммунную систему растений

коэволюционным образом. Примечательно, что в зависимости от жизненного цикла и способа заражения, каждый патоген будет иметь индивидуальную стратегию защиты, поэтому бесчерешковым растениям необходимы индивидуальные защитные механизмы для борьбы с инфекцией.

Инфекции и заражение сельскохозяйственных растений патогенами, в том числе вирусами, бактериями, грибами, нематодами и насекомыми, и вызванные этим повреждения приводят к значительным потерям урожая культивируемых растений. У маиса или кукурузы (*Zea mays*), указанные термины используются в настоящем документе взаимозаменяемо, как у одного из основных сельскохозяйственных растений, распространенных во всем мире, существует большое количество патогенных грибов, вызывающих болезни листьев. Гриб, который может причинить гораздо больше вреда в тропических, а также в умеренных климатических условиях, таких как, условия, имеющиеся на большей части Европы и Северной Америки, а также в Африке и Индии, известен под названием *Helminthosporium turcicum* или как синоним *Exserohilum turcicum* (телеоморф: *Setosphaeria turcica*). *H. turcicum* является причиной заболевания пятнистостью листьев, известной под названием «Северный гельминтоспориоз листьев кукурузы» (NCLB), который может возникать в эпидемических масштабах в период влажных лет, поражая уязвимые сорта кукурузы и причиняя большой ущерб и значительные потери урожая, которые могут составлять 30% площади посевов, и он может поражать даже более обширные площади посевов (Перкинс и Педерсен, 1987. Развитие болезни и потери урожая, связанные с Северным гельминтоспориозом листьев кукурузы. *Plant Disease*, 71(10), 940-943.; Раймундо и Хукер, 1981. Влияние гена HtN на развитие эпидемий Северного гельминтоспороза листьев кукурузы. *Plant disease*.). С 1970-х годов ведутся поиски природной устойчивости в генетическом материале. Конечно, болезни растений вызывают не только грибы. Другими патогенами растений также являются бактерии, вирусы, нематодные черви (например, круглые черви), тли и насекомые. Серьезные болезни растений вызывают все эти другие вредители, но грибы, вероятно, вызывают самые серьезные потери среди основных сельскохозяйственных растений во всем мире. Меры защиты сельскохозяйственных растений включают борьбу с сорняками, которой можно управлять механическим или химическим образом, и борьбу с вредителями или болезнями животных, которая в значительной степени основана на синтетических химикатах. Использование гербицидов позволило фермерам модифицировать производственные системы для повышения урожайности сельскохозяйственных растений, сохраняя при этом

определенную степень контроля над разрушительным действием вредителей. К сожалению, несмотря на значительное увеличение использования пестицидов, потери урожая за последние 40 лет существенно не сократились.

Гонка за определением и созданием новых стратегий устойчивости к патогенам в отношении основных сельскохозяйственных растений все более ускоряется из-за нарастающих характеристик патогенов, нарушающих устойчивость, то есть, из-за эволюционной стратегии патогенов по адаптации и выживанию под давлением агентов защиты растений и/или по разрушению эндогенных механизмов защиты иммунитета растений, представленных выше.

Таким образом, до сих пор существует большая потребность в передаче основных знаний о механизмах защиты растений и иммунитете растений, исследованных на моделях растений, таких как *Arabidopsis thaliana*, основным сельскохозяйственным растениям. Поэтому целью настоящего изобретения была идентификация новых генов, специфически присутствующих в сельскохозяйственных растениях, которые могут быть ассоциированы с устойчивостью к патогенам. Другой целью настоящего изобретения была передача знаний о консервативных механизмах сигнализирования в иммунитете растений на более специфический уровень для идентификации специфических взаимодействий и представления новых стратегий для создания обширной устойчивости к патогенам у различных сельскохозяйственных растений на основе биологических средств, то есть, стратегий борьбы с болезнями на основе создания и выращивания устойчивых сортов, чтобы предложить более эффективную и экологически безопасную борьбу с болезнями, при этом, центральное место в этом деле занимает получение сортов растений с большей устойчивостью к патогенам.

Таким образом, другая цель настоящего изобретения состояла в исследовании функциональной основы устойчивости к патогенам, включая патогенные грибы, а также другие виды патогенов растений, чтобы предложить новые стратегии борьбы с инфекцией, вызванной патогенами, или заражением, основанные на использовании эндогенных защитных механизмов растений в качестве источника устойчивости или толерантности к патогенам. Был поставлена цель не основываться на противогрибковых химикатах, а создать новые, крайне необходимые стратегии устойчивости для ряда важных сельскохозяйственных растений, охарактеризовав молекулярных игроков, участвующих в устойчивости растения к болезням, а затем модулировать указанные пути эндогенной устойчивости растения целенаправленным образом, в частности, получить повышенную

устойчивость к патогенам, сохраняя при этом нормальный рост растения с учетом того факта, что модулирование центральных эффекторов иммунной системы растения без надлежащего понимания регуляторных механизмов обычно сопровождается серьезными побочными эффектами, например, снижением развития или роста растения, которых следует избегать в соответствии с настоящим изобретением.

Краткое изложение сущности изобретения

Вышеупомянутая цель была достигнута путем идентификации молекулярной роли генов CPL, в частности, CPL3, в устойчивости к патогенам, а также путем изучения эффекта целенаправленных мутаций или модуляций указанных генов, или генных продуктов, или их экспрессии, или трансляции, что создает преимущества по сравнению с генерацией линий полного нокаута.

В первом аспекте, предложено растение, обладающее устойчивостью к патогенам, при этом, устойчивость к патогенам придается или повышается посредством модуляции нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный фосфатазоподобный белок 3 (CPL3) с С-концевым доменом или его регуляторную последовательность, или посредством модуляции транскрипции эндогенного белка CPL3, при этом, модуляция достигается посредством, (i) по меньшей мере, одной мутации нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, по меньшей мере, одна мутация имеет доминантно-отрицательный эффект, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, по меньшей мере, одна мутация вызывает изменение аминокислотной последовательности консервативного каталитического домена белка CPL3, содержащего мотив DXDXT/V; и/или, (ii) по меньшей мере, одной сайленсирующей конструкции, направленной, по меньшей мере, на одну эндогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок CPL3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, направленной на все эндогенные нуклеотидные последовательности, кодирующие белок CPL3; и/или (iii) модификации нативной регуляторной последовательности, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный белок CPL3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, всех нативных регуляторных последовательностей нуклеотидных последовательностей, кодирующих эндогенный белок CPL3, при этом, модификация вызывает снижение скорости экспрессии, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный белок CPL3.

В другом аспекте, предложены клетка, ткань, орган, семя или материал растения, обладающего устойчивостью к патогенам, при этом, устойчивость к патогенам придается или повышается посредством модуляции нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный фосфатазоподобный белок 3 (CPL3) с С-концевым доменом или его регуляторную последовательность, или посредством модуляции транскрипции эндогенного белка CPL3, как подробно описано в первом аспекте выше.

Во втором аспекте, предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую фосфатазоподобный белок 3 (CPL3) с С-концевым доменом, при этом, нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из: (а) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2-10, или ее гомологичной, ортологичной или паралогичной последовательности; (b) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с одной из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2-10, (с) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11-19; (d) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-19, или (е) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с нуклеотидной последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности, как определено в (а)-(d), при жестких условиях, при этом, нуклеотидная последовательность содержит, по меньшей мере, одну мутацию, способную придавать или повышать устойчивость к патогену в растении, в котором экспрессируется молекула нуклеиновой кислоты, при этом, патоген представляет собой, по меньшей мере, одно из следующих: патогенный грибок, патоген оомицет, бактериальный патоген, вирус, патоген нематода или насекомое, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, патоген представляет собой гемибiotрофный грибок, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, патоген представляет собой гемибiotрофный грибок, выбранный из группы, состоящей из: *Zymoseptoria tritici*, *Setosphaeria turcica*, *Fusarium spp.* *Fusarium graminearum*,

Colletotrichum spp., такого как *Colletotrichum graminicola*, *Magnaporthe grisea*, *Magnaporthe oryzae*, *Phytophthora infestans*, или, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, патоген представляет собой грибок, выбранный из *Cercospora spp.*, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, *Cercospora beticola* или *Cercospora zeae-mayidis*.

В еще одном аспекте, предложен способ придания или усиления устойчивости к патогенам в растении или генерирования растения, обладающего устойчивостью к патогенам, или его растительной клетки, ткани, органа, семени или растительного материала, содержащий этапы: (i) предложение, по меньшей мере, одной сайленсирующей конструкции или, по меньшей мере, одной последовательности, кодирующей последовательность; (ii) модификация растительной клетки, ткани, органа, растения, семени или растительного материала посредством введения, по меньшей мере, одной сайленсирующей конструкции или последовательности, кодирующей последовательность из (i), в геном указанной растительной клетки, ткани, органа, растения, семени или растительного материала; и (iii) получение модифицированной растительной клетки, ткани, органа, растения, семени или растительного материала, (iv) необязательно, регенерация растения из растительной клетки, ткани, органа или растительного материала или выращивание семени из растения, полученного в (iii), при этом, растительная клетка, ткань, орган, растение, семя или растительный материал, полученные в (iii), растение, регенерированное в (iv), или семя, выращенное в (iv), содержат введенную, по меньшей мере, одну сайленсирующую конструкцию или последовательность, кодирующую последовательность, и, таким образом, обладает устойчивостью к патогенам.

В другом аспекте, предложен способ придания или усиления устойчивости к патогенам в растении или генерирования растения, обладающего устойчивостью к патогенам, или его растительной клетки, ткани, органа, семени или растительного материала, содержащий этапы: (i) предложение, по меньшей мере, одного сайт-направленного фермента, модифицирующего ДНК, или последовательности, кодирующей последовательность, и необязательно, по меньшей мере, одной матрицы для репарации ДНК, при этом, по меньшей мере, один сайт-направленный фермент, модифицирующий ДНК, и, необязательно, по меньшей мере, одна матрица для репарации ДНК: (a) направлена или нацелена на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок CPL3; или (b) направлена или нацелена на регуляторную последовательность, по меньшей мере, одного белка CPL3, кодирующего нуклеотидную последовательность; (ii) введение, по меньшей

мере, одного сайт-направленного фермента, модифицирующего ДНК, или последовательности, кодирующей последовательность, и, необязательно, по меньшей мере, одной матрицы для репарации ДНК в растительную клетку, ткань, орган, растение или растительный материал; (iii) мутация или модификация нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3 или его регуляторную последовательность, в геноме растительной клетки, ткани, органа, растения или растительного материала и получение мутантной или модифицированной популяции растительных клеток, тканей, органов, растений или растительных материалов; (iv) необязательно: скрининг популяции на предмет доминантно-отрицательной мутации, тем самым придавая или повышая устойчивость к патогенам, или скрининг популяции на предмет мутации или модификации в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3 или его регуляторную последовательность; (v) идентификация и, тем самым, получение растительной клетки, ткани, органа, растения или растительного материала, обладающего устойчивостью к патогенам.

В другом аспекте, предложен способ придания или усиления устойчивости к патогенам в растении или генерирования растения, обладающего устойчивостью к патогенам, или его растительной клетки, ткани, органа, семени или растительного материала, содержащий этапы: (i) воздействие на растительную клетку, ткань, орган, растение или растительный материал, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, на семена растения, эффективным количеством мутагенного агента, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, этилметансульфонатом, N-этил-N-нитрозомочевинной или облучением, (ii) получение мутагенизированной популяции растительных клеток, тканей, органов, растений или растительных материалов, необязательно, посредством выращивания растений из мутагенизированной популяции; (iii) скрининг мутагенизированной популяции на устойчивость к патогенам, необязательно, посредством выделения и анализа геномной ДНК из растений, обладающих устойчивостью к патогенам; (iv) идентификация и получение модифицированной растительной клетки, ткани, органа, растения или растительного материала, обладающего устойчивостью к патогенам.

В еще одном аспекте, предложен способ придания или усиления устойчивости к патогенам в растении или генерирования растения, обладающего устойчивостью к патогенам, или его растительной клетки, ткани, органа, семени или растительного материала, содержащий этапы: (i) трансформация, по меньшей мере, одной растительной клетки, по меньшей мере, одной молекулой нуклеиновой кислоты, как определено во

втором аспекте выше; и (ii) регенерация и, таким образом, получение растительной клетки, ткани, органа, растения или растительного материала, обладающего устойчивостью к патогенам.

В дополнительном аспекте, предложен способ идентификации растения, обладающего устойчивостью к патогенам, или его растительной клетки, ткани, органа, семени или растительного материала, содержащий этапы: (i) выделение ДНК из, по меньшей мере, одной клетки растения или его ткани, органа, семени или растительного материала, и (ii) определение, по меньшей мере, одной молекулы нуклеиновой кислоты, как определено во втором аспекте выше, и, необязательно, (iii) выбор растения, содержащего, по меньшей мере, одну молекулу нуклеиновой кислоты, как определено во втором аспекте выше, на основании определения, произведенного на этапе (ii), и, необязательно, (iv) размножение потомства, обладающего устойчивостью к патогенам, путем скрещивания растения, выбранного на этапе (iii), с другим растением, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, того же вида, и, таким образом, введение, по меньшей мере, одной молекулы нуклеиновой кислоты, определенной на этапе (ii), в геном потомства.

В другом аспекте, предложено использование молекулы нуклеиновой кислоты, как определено во втором аспекте выше, или использование сайленсирующей конструкции, как определено в первом аспекте выше, для генерирования растительной клетки, ткани, органа, целого растения или растительного материала, обладающего устойчивостью к патогенам, или для придания или повышения устойчивости к патогенам в растении, растительной клетке, ткани, органе, целом растении или растительном материале.

Определения

Термин «аллель» или «аллельный вариант», в контексте настоящего документа относится к вариантной форме данного гена. Поскольку большинство многоклеточных организмов имеют два набора хромосом; то есть, они диплоидные (или, если присутствует больше наборов хромосом, они являются полиплоидными), эти хромосомы называются гомологичными хромосомами. Если оба аллеля в гене (или локусе) на гомологичных хромосомах одинаковы, то они и организм являются гомозиготными по отношению к этому гену (или локусу). Если аллели различны, то они и организм являются гетерозиготными по отношению к этому гену. Аллели могут приводить к одному и тому же или другому наблюдаемому фенотипу. Таким образом, термин «аллель» относится к одной или к двум, или к большему количеству нуклеотидных последовательностей в определенном локусе в

геноме. Первый аллель находится на одной хромосоме, второй аллель – на второй хромосоме в том же самом положении. Если эти два аллеля различны, то они – гетерозиготны, а если они одинаковы, то они – гомозиготны. Различные аллели гена (аллели гена) отличаются, по меньшей мере, одним SNP (однонуклеотидным полиморфизмом). Кроме того, плоидность дает число полных наборов хромосом в клетке и, следовательно, число возможных аллелей. Родовой термин «полиплоид» используется для описания клеток с тремя или более наборами хромосом. Например, около половины всех известных родов растений содержат полиплоидные виды, и около двух третей всех трав являются полиплоидными.

Термин «анаморф» или «анаморфы», используемый в настоящем документе в контексте микологии, относится к бесполой репродуктивной стадии (морфа), зачастую похожей на плесень гриба. Когда один гриб производит несколько морфологически различных анаморфов, они называются синанаморфами. «Телеоморфная» форма гриба представляет собой половую репродуктивную стадию (морфа), обычно плодовое тело. «Голоморф» означает целый гриб, то есть, включая анаморфы и телеоморфы.

Термин «каталитически активный фрагмент» или «функциональный фрагмент», в контексте настоящего документа, применительно к аминокислотным последовательностям, обозначает сердцевинную последовательность, полученную из данной матричной аминокислотной последовательности, или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность, содержащую весь или часть активного сайта матричной последовательности при условии, что полученный каталитически активный фрагмент все еще обладает активностью, характеризующей матричную последовательность, за которую отвечает активный сайт нативного фермента или его варианта. Указанные модификации подходят для создания менее громоздких аминокислотных последовательностей, все еще обладающих той же активностью, что и матричная последовательность, что делает каталитически активный фрагмент более универсальным или более стабильным инструментом, являющимся стерически менее требовательным. Для аминокислотных последовательностей, не представляющих ферменты, термин «функциональный фрагмент» может также подразумевать ту часть или домен аминокислотной последовательности, который участвует во взаимодействии с другой молекулой и/или участвует в любой структурной функции внутри клетки.

Используемый в настоящем документе термин «комплементарный» или «комплементарность» описывает взаимоотношения между двумя ДНК, двумя РНК или, относительно гибридных последовательностей по настоящему изобретению, между областью РНК и ДНК нуклеиновой кислоты. Определяемые нуклеиновыми основаниями ДНК или РНК, две области нуклеиновой кислоты могут гибридизоваться друг с другом по типу ключ-замок. С этой целью применяются принципы спаривания оснований по Уотсону-Крику на основе аденина и тимина/урацила, а также гуанина и цитозина, соответственно, в качестве комплементарных оснований. Кроме того, термин «комплементарный», используемый в настоящем документе, также содержит такое понятие, как спаривание оснований не по Уотсону-Крику, такое как обратимое спаривание оснований по Уотсону-Крику, спаривание оснований по Хугстену, обратимое спаривание оснований по Хугстену и спаривание неоднозначных пар оснований, при условии, что соответствующие пары оснований могут образовывать водородные связи друг с другом, то есть, две разные цепи нуклеиновой кислоты могут гибридизоваться друг с другом на основе указанной комплементарности.

Термин «конструкция», «рекомбинантная конструкция» или «экспрессионная конструкция», особенно «сайленсирующая конструкция» относится к рекомбинантной конструкции или экспрессионной конструкции и, в контексте настоящего документа, относится к конструкции, содержащей, среди прочего, плазмиды или плазмидные векторы, и может содержать кассету экспрессии, выделенные одноцепочечные или двухцепочечные последовательности нуклеиновой кислоты, содержащие последовательности ДНК и/или РНК, или аминокислотные последовательности, вирусные векторы, включая модифицированные вирусы, и их комбинацию или смесь, для введения или трансформации, трансфекции или трансдукции в целевую клетку или растение, растительную клетку, ткань, орган или материал по настоящему изобретению.

Термин «конструкция доставки» или «вектор доставки», используемый в настоящем документе, относится к любому биологическому или химическому средству, используемому в качестве груза для транспортировки нуклеиновой кислоты, содержащей РНК и/или ДНК, и/или интересующей аминокислотной последовательности в клетку-мишень, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в эукариотическую клетку. Термин «конструкция доставки» или «вектор», используемый в настоящем документе, относится к средству транспортировки для доставки генетической или рекомбинантной конструкции по настоящему изобретению в целевую клетку, ткань,

орган или организм. Таким образом, вектор может содержать последовательности нуклеиновых кислот, необязательно, содержащие последовательности, такие как регуляторные последовательности или последовательности локализации для доставки, непосредственно или опосредованно, в интересующую клетку-мишень или в структуру-мишень растения в желаемом клеточном компартменте растения. Вектор также может быть использован для введения аминокислотной последовательности или рибонуклео-молекулярного комплекса в клетку-мишень или в структуру-мишень. Как правило, вектор, используемый в настоящем документе, может представлять собой плазмидный вектор. Кроме того, непосредственное введение интересующей конструкции, последовательности, или комплекса может быть осуществлено, например, химическими средствами трансфекции. Термин «введение» в данном контексте подразумевает как непосредственное, так и опосредованное введение. Термин «непосредственное введение» подразумевает, что желаемая клетка-мишень или структура-мишень, содержащая последовательность ДНК-мишени, которая должна быть модифицирована по настоящему изобретению, непосредственно трансформируется или трансдуцируется, или трансфицируется в интересующую специфическую клетку-мишень, где материал, доставленный вектором доставки, будет оказывать свое действие. Термин «опосредованное введение» подразумевает, что введение осуществляется в структуру, например, в клетки листьев или клетки органов, или тканей, которые сами по себе не представляют интересующую фактическую клетку-мишень или структуру-мишень, которая должна быть трансформирована, но эти структуры служат основой для системного распространения и переноса вектора или конструкции в фактическую структуру-мишень. В случае использования термина «вектор» в контексте трансфекции аминокислотных последовательностей и/или последовательностей нуклеиновых кислот в клетку-мишень, термин «вектор» подразумевает подходящие агенты для пептидной или белковой трансфекции, такие как, например, смеси ионных липидов, проникающие в клетки пептиды (CPP), или бомбардировку частицами. В контексте введения материала нуклеиновой кислоты, термин «вектор» подразумевает не только плазмидные векторы, но также и подходящие материалы-носители, которые могут служить основой для введения нуклеиновой кислоты и/или доставки аминокислотной последовательности в интересующую клетку-мишень, например, посредством бомбардировки частицами. Указанный материал-носитель содержит, среди прочего, частицы золота или вольфрама. Вирусные векторы, как более подробно описано ниже, и бактериальные векторы, такие как,

например, *Agrobacterium spp.*, такие как, например, векторы *Agrobacterium tumefaciens*, могут быть использованы, например, бинарные и супербинарные векторы. Наконец, термин «вектор» также подразумевает подходящие химические транспортные агенты для введения линейных последовательностей нуклеиновых кислот (одноцепочечных или двухцепочечных) или аминокислотных последовательностей, или их комбинации в клетку-мишень в сочетании с физическим способом введения, включая полимерные конструкции для доставки или конструкции доставки на основе липидов. Подходящие «конструкции доставки» или «векторы доставки», таким образом, содержат биологические средства для доставки нуклеотидных и/или аминокислотных последовательностей в клетку-мишень, включая вирусные векторы, *Agrobacterium spp.*, или химические конструкции доставки, включая наночастицы, например, мезопористые наночастицы диоксида кремния (MSNP), катионные полимеры, включая подходы на основе полимеров PEI (полиэтилениминовых) или таких полимеров, как DEAE-декстран, или нековалентное поверхностное присоединение PEI для генерирования катионных поверхностей, липидных или полимерных пузырьков, или их комбинаций. Липидные или полимерные пузырьки могут быть выбраны, например, из липидов, липосом, систем липидной инкапсуляции, наночастиц, составов из малых частиц нуклеиновой кислоты и липидов, полимеров и полимерсомов.

Используемый в настоящем документе термин «производное» или «потомок», или «потомство» по настоящему изобретению относится к потомкам такой клетки или материала, которые являются результатом естественного репродуктивного размножения, включая размножение половым и бесполом путем. Специалисту в данной области техники хорошо известно, что указанное размножение может привести к введению мутаций в геном организма в результате природных явлений, что приводит к появлению потомка или потомства, которое, в геномическом смысле, отличается от родительского организма или клетки, однако, оно все еще принадлежит к тому же роду/виду и обладает, в основном, теми же характеристиками, что и родительская рекомбинантная клетка-хозяин. Такие производные или потомки, или потомство, возникающие в результате природных явлений во время репродукции или регенерации, таким образом, включены в термин настоящего изобретения.

Кроме того, используемые в настоящем документе термины «полученный», «полученный из» или «производное», в контексте выделенной биологической последовательности (нуклеиновой кислоты или аминокислоты) или молекулы, или

комплекса – они не относятся к целой клетке или организму – могут подразумевать, что соответствующая последовательность основана на эталонной последовательности, например, из списка последовательностей, или на последовательности под учетным номером из базы данных, или на соответствующей структуре скаффолда, то есть, она происходит из указанной последовательности, тогда как эталонная последовательность может содержать больше последовательностей, например, весь геном или полноразмерную последовательность, кодирующую полипротеин, вирус, тогда как последовательность, «полученная из» нативной последовательности, то есть, последовательности, встречающейся естественным образом в клетке или организме, может содержать только один свой выделенный фрагмент или свой когерентный фрагмент. В данном контексте, можно сказать, что молекула сДНК или РНК «получена из» последовательности ДНК, служащей в качестве молекулярной матрицы. Таким образом, специалист в данной области техники может легко определить последовательность, «полученную из» эталонной последовательности, которая, посредством выравнивания последовательности на уровне ДНК или аминокислоты, будет иметь высокую идентичность с соответствующей эталонной последовательностью, и которая будет иметь когерентные удлинения ДНК/аминокислот совместно с соответствующей эталонной последовательностью ($> 75\%$ запрашиваемой идентичности для заданной длины выровненной молекулы при условии, что полученная последовательность является запрошенной, а эталонная последовательность представляет собой субъект во время выравнивания последовательности). Таким образом, специалист в данной области техники может клонировать соответствующие последовательности на основе изобретения, предложенного в настоящем документе, посредством полимеразных цепных реакций и тому подобного, в интересующую подходящую векторную систему, или использовать последовательность в качестве векторного скаффолда. Термин «полученный из», таким образом, не представляет произвольную последовательность, но он представляет последовательность, соответствующую эталонной последовательности, из которой она получена, в то время как определенные различия, например, определенные мутации, естественным образом возникающие во время репликации рекомбинантной конструкции в клетке-хозяине, не могут быть исключены и, таким образом, включены в термин «полученный из». Кроме того, некоторые удлинения последовательности из родительской последовательности могут быть последовательно соединены в последовательность, полученную из родительской последовательности. Различные удлинения будут иметь высокую или даже 100% идентичность с родительской последовательностью.

Термин «эндогенный» в контексте последовательностей нуклеиновых кислот и/или аминокислотных последовательностей относится к нуклеиновой кислоте и/или аминокислоте, обнаруженным и/или экспрессированным в геноме растения в его естественной форме в виде ДНК/РНК или белка. Как известно специалисту в данной области техники, несколько вариантов, например аллельных вариантов, последовательности нуклеиновой кислоты гена могут существовать в данной популяции растений.

Термин «гриб» или «патогенный гриб», в контексте настоящего документа, означает любой патогенный гриб растения на любой стадии развития, включая споры, или любую часть такого гриба, которая может взаимодействовать с растением или частью растения, или с клеткой, и индуцировать ответ в указанном растении или части растения, или в клетке.

Используемый в настоящем документе термин «слияние», например, в контексте редактора основания или системы CRISPR/Cas, может относиться к белку и/или нуклеиновой кислоте, содержащей, по меньшей мере, одну ненативную последовательность (например, фрагмент молекулы). Слияние может быть на N-концевом или C-концевом конце модифицированного белка, или на них обоих, или в пределах молекулы в виде отдельного домена. В отношении молекул нуклеиновой кислоты, молекула слияния может быть присоединена на 5'- или 3'-конце, или в любом подходящем положении между ними. Слияние может представлять собой транскрипционное и/или трансляционное слияние. Слияние может содержать, по меньшей мере, одну одинаковую ненативную последовательность. Слияние может содержать одну 10 или более неодинаковых ненативных последовательностей. Слияние может представлять собой химеру. Слияние может содержать аффинную метку нуклеиновой кислоты. Слияние может содержать штрих-код. Слияние может содержать пептидную аффинную метку. Слияние может предложить субклеточную локализацию сайт-специфического эффектора или редактора основания (например, сигнал ядерной локализации (NLS) для нацеливания на ядро, сигнал митохондриальной локализации для нацеливания на митохондрию, сигнал хлоропластной локализации для нацеливания на хлоропласт, сигнал удержания эндоплазматического ретикулума (ER) и тому подобное). Слияние может предложить ненативную последовательность (например, аффинную метку), которую можно использовать для отслеживания или очистки. Слияние может представлять собой малую молекулу, такую как, биотин или краситель, такой как, красители Alexa Fluor, краситель

Цианин-3, краситель Цианин-5. Слияние может предложить повышенную или пониженную стабильность. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, слияние может содержать определяемую метку, включая фрагмент молекулы, который может предложить определяемый сигнал. Подходящие определяемые метки и/или фрагменты молекулы, которые могут предложить определяемый сигнал, могут включать, но этим не ограничиваются, фермент, радиоизотоп, участника специфической связывающейся пары; флуорофор; флуоресцентный репортер или флуоресцентный белок; квантовую точку; и тому подобное. Слияние может содержать участника пары белков для резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) или донорную/акцепторную пару флуорофорной/квантовой точки. Слияние может содержать фермент. Подходящие ферменты могут включать, но этим не ограничиваются, пероксидазу хрена, люциферазу, бета-галактозидазу и тому подобное. Слияние может содержать флуоресцентный белок. Подходящие флуоресцентные белки могут включать, но этим не ограничиваются, зеленый флуоресцентный белок (GFP) (например, GFP из *Aequoria victoria*, флуоресцентные белки из *Anguilla japonica*, или их мутант, или производное), красный флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок, желто-зеленый флуоресцентный белок (например, mNeonGreen, полученный из тетрамерного флуоресцентного белка из головолохордового *Branchiostoma lanceolatum*), любой из множества флуоресцентных и окрашенных белков. Слияние может содержать наночастицу. Подходящие наночастицы могут включать флуоресцентные или люминесцентные наночастицы, а также магнитные наночастицы или наноалмазы, необязательно, сцепленные с наночастицей. Любое оптическое или магнитное свойство, или характеристику наночастицы(наночастиц) можно определить. Слияние может содержать геликазу, нуклеазу (например, FokI), эндонуклеазу, экзонуклеазу (например, 5'-экзонуклеазу и/или 3'-экзонуклеазу), лигазу, нуклеазу, нуклеазу-геликазу (например, Cas3), ДНК-метилтрансферазу (например, Dam), или ДНК-деметиلاзу, гистонметилтрансферазу, гистондеметилазу, ацетилазу (включая, например, и этим не ограничиваясь, гистонацетилазу), деацетилазу (включая, например, и этим не ограничиваясь, гистондеацетилазу), фосфатазу, киназу, (ко)активатор транскрипции, (ко)фактор транскрипции, субъединицу РНК-полимеразы, репрессор транскрипции, ДНК-связывающий белок, ДНК-структурирующий белок, длинную некодирующую РНК, репарационный белок ДНК (например, белок, участвующий в репарации либо одноцепочечных, и/или двухцепочечных разрывов, например, белки, участвующие в эксцизионной репарации оснований, эксцизионной репарации нуклеотидов, репарации

ошибочно спаренных оснований, NHEJ, HR, микрогомологически опосредованном соединении концов (MMEJ) и/или в альтернативном негомологичном соединении концов (ANHEJ), таком как, например, и этим не ограничиваясь, регуляторы HR и сигналы сборки комплекса HR), маркерный белок, репортерный белок, флуоресцентный белок, лиганд-связывающий белок (например, mCherry или белок, связывающий тяжелые металлы), сигнальный пептид (например, Tat-сигнальная последовательность), нацеливающий белок или пептид, последовательность субклеточной локализации (например, последовательность ядерной локализации, последовательность хлоропластной локализации) и/или эпитоп антитела, или любую их комбинацию.

Термин «модификация» или «генетическая модификация» используется в настоящем документе в широком смысле и означает любую модификацию последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, целевой клетки, ткани, органа или организма, которая осуществляется путем вмешательства человека, либо непосредственно, либо опосредованно, для воздействия на эндогенный генетический материал или транскриптом, или протеом целевой клетки, ткани, органа или организма для модификации его целенаправленно, в результате чего он отличается от своего состояния, в котором он находился без вмешательства человека. Вмешательство человека может происходить либо *in vitro*, либо *in vivo/in planta*, либо в обоих случаях. Могут быть включены дополнительные модификации, например, по меньшей мере, одна точечная мутация, например, для целенаправленной белковой инженерии или для оптимизации кодонов, делеция (делеции) и, по меньшей мере, одна вставка или делеция, по меньшей мере, одна молекула нуклеиновой кислоты или аминокислоты (включая также гомологичную рекомбинацию), модификация последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, или их комбинация. Термины также должны содержать молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу аминокислоты, или клетку-хозяина, или организм, включая растение или его растительный материал, который подобен/подобны сопоставимой последовательности, организму или материалу природного происхождения, но которые были сконструированы, по меньшей мере, посредством одного этапа целенаправленной манипуляции. Модификация может быть осуществлена транзientным образом или стабильным, наследуемым образом.

Термин «геном» относится ко всему комплементу генетического материала, включая гены и некодирующие последовательности, ядерные и необязательно

присутствующие другие геномы, например, геном органелл, который присутствует в каждой клетке организма или в органелле, и/или полный набор хромосом, унаследованных как (гаплоидная) единица от одного родителя, или который кодирует вирус. Таким образом, геном также определяет «генотип», являющийся частью генетического состава данной клетки и, следовательно, организма или индивидуума, который определяет специфическую характеристику (фенотип) этой клетки/организма/индивидуума.

Термины «редактирование генома», «геномная инженерия» или «редактирование генов/геновая инженерия» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к стратегиям и методам целенаправленной, специфической модификации любой генетической информации или генома живого организма. Как таковые, эти термины включают редактирование генов, а также и редактирование областей, отличных от областей генома, кодирующих гены. Они также включают редактирование или инженерию ядра (если имеется), а также другую генетическую информацию (например, транскриптом РНК) клетки. Кроме того, термины «редактирование генома» и «геномная инженерия» также включают эпигенетическое редактирование или инженерию, то есть, целенаправленную модификацию, например, метилирование, модификацию гистонов или некодирующих РНК, возможно, вызывающих наследственные изменения в экспрессии генов.

Термин «идиоплазма», в контексте настоящего документа, используется для описания генетических ресурсов или, точнее, ДНК организма и коллекций этого материала. В технологии размножения термин «идиоплазма» используется для обозначения коллекции генетического материала, из которого может быть создано новое растение или сорт растения.

Термины «направляющая РНК», «gРНК» или «одноцепочечная направляющая РНК», или «sgРНК» используются взаимозаменяемо в настоящем документе, и либо относятся к синтетическому слиянию CRISPR РНК (крРНК) и трансктивирующей крРНК (tracrРНК), либо этот термин относится к молекуле одноцепочечной РНК, состоящей только из крРНК и/или tracrРНК, либо этот термин относится к gРНК, отдельно содержащей фрагмент молекулы крРНК или tracrРНК. Таким образом, фрагменты молекулы tracr и крРНК не обязательно должны присутствовать на одной ковалентно присоединенной молекуле РНК, но они также могут присутствовать в двух отдельных молекулах РНК, которые могут ассоциироваться, или они могут быть ассоциированы посредством нековалентного или ковалентного взаимодействия для предложения gРНК по

настоящему изобретению. Термины «gДНК» или «sgДНК», или «направляющая ДНК» используются в настоящем документе взаимозаменяемо, и оба относятся к молекуле нуклеиновой кислоты, взаимодействующей с нуклеазой Аргонавтом. Как gРНК, так и gДНК, раскрытые в настоящем документе, называются «направляющими нуклеиновыми кислотами» или «гидовыми нуклеиновыми кислотами» вследствие их способности взаимодействовать с сайт-специфической нуклеазой и содействовать нацеливанию указанной сайт-специфической нуклеазы на сайт-мишень в геноме.

Термин «гемибиотроф» или «гембиотрофный» относится к организму, который частично (геми) паразитирует в живой ткани в течение некоторого времени и, таким образом, зависит от начальной биотрофной фазы. За этой фазой следует некротрофическая фаза, то есть, организм может индуцировать гибель клеток-хозяев и/или может сохраняться в мертвых тканях без необходимости в живом хозяине или клетке-хозяине.

Используемый в настоящем документе термин «гибридизация» относится к спариванию комплементарных нуклеиновых кислот, то есть, ДНК и/или РНК, с использованием любого процесса, с помощью которого цепь нуклеиновой кислоты соединяется с комплементарной цепью посредством спаривания оснований с образованием гибридизированного комплекса. На гибридизацию и силу гибридизации (то есть, на силу ассоциации между нуклеиновыми кислотами) влияют такие факторы, как степень и длина комплементарности между нуклеиновыми кислотами, жесткость условий, при которых сопровождается процесс, T_m образованного гибрида и соотношение G:C в пределах нуклеиновых кислот. Термин «гибридизированный комплекс» относится к комплексу, образованному между двумя последовательностями нуклеиновых кислот в результате образования водородных связей между комплементарными основаниями G и C, и между комплементарными основаниями A и T/U. Гибридизованный комплекс или соответствующая гибридная конструкция может образовываться между двумя молекулами нуклеиновой кислоты ДНК, между двумя молекулами нуклеиновой кислоты РНК или между молекулой нуклеиновой кислоты ДНК и молекулой нуклеиновой кислоты РНК. Для всех констелляций, молекулы нуклеиновой кислоты могут представлять собой молекулы нуклеиновой кислоты природного происхождения, сгенерированные *in vitro* или *in vivo*, и/или молекулы искусственной или синтетической нуклеиновой кислоты. Гибридизация, как подробно описано выше, например, пары оснований Уотсона-Крика, которые могут образовываться между последовательностями ДНК, РНК и ДНК/РНК, обусловлена шаблоном специфических водородных связей, которая, таким образом, представляет собой

нековалентную форму присоединения по настоящему изобретению. В контексте гибридизации, под термином «жесткие условия (гибридизации)» следует понимать такие условия, при которых гибридизация происходит преимущественно только между гомологичными молекулами нуклеиновой кислоты. Термин «условия гибридизации» в этом аспекте относится не только к фактическим условиям, преобладающим во время фактической агломерации нуклеиновых кислот, но также и к условиям, преобладающим во время последующих этапов промывки. Примерами жестких условий гибридизации являются условия, при которых гибридизации подвергаются в основном 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% идентичности последовательности. Жесткими условиями гибридизации являются, например: гибридизация в 4 X SSC при 65° С с последующими многократными промывками в 0,1 X SSC при 65° С в течение, приблизительно, 1 часа. Используемый в настоящем документе термин «жесткие условия гибридизации» также может означать: гибридизацию при 68° С в 0,25 М фосфата натрия, pH 7,2, 7% SDS, 1 mM EDTA и 1% BSA в течение 16 часов с последующей двукратной промывкой посредством 2 x SSC и 0,1% SDS при 68° С. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридизация происходит в жестких условиях.

Используемый в настоящем документе термин «мутация» относится к делеции, вставке, добавлению, замещению, редактированию, разрыву цепи и/или введению аддукта в контексте манипулирования нуклеиновой кислотой *in vivo* или *in vitro*. Делеция определяется как изменение последовательности нуклеиновой кислоты, в которой отсутствует, по меньшей мере, один нуклеотид. Вставка или добавление представляет собой изменение последовательности нуклеиновой кислоты, которое привело к добавлению, по меньшей мере, одного нуклеотида. «Замещение» или «редактирование» происходит в результате замены, по меньшей мере, одного нуклеотида молекулой, которая отличается от молекулы замененного, по меньшей мере, одного нуклеотида. Например, нуклеиновая кислота может быть заменена другой нуклеиновой кислотой, такой как, приведенная в качестве примера при замене тимина цитозином, аденином, гуанином или уридином. Пиримидин на пиримидин (например, нуклеотидные замещения С на Т или Т на С) или пурин на пурин (например, нуклеотидные замещения G на A или A на G) называются транзициями, тогда как пиримидин на пурин или пурин на пиримидин (например, G на Т

или G на C, или A на T, или A на C) называются трансверсиями. В альтернативной варианте осуществления настоящего изобретения, нуклеиновая кислота может быть заменена модифицированной нуклеиновой кислотой, примером которой является замена тимина на тимингликоль. Мутации могут привести к ошибочному спариванию оснований. Термин «ошибочное спаривание оснований» относится к нековалентному взаимодействию между двумя нуклеиновыми кислотами, каждая из которых находится на другой нуклеотидной последовательности или молекуле нуклеиновой кислоты, которая не соответствует правилам спаривания оснований. Например, у частично комплементарных последовательностей 5'-AGT-3' и 5'-AAT-3' имеется ошибочное спаривание оснований G-A (транзигция). Мутация может иметь доминантно-отрицательный эффект, то есть, результирующий генный продукт, даже когда он присутствует в гетерозиготном состоянии, может влиять на определенные клеточные функции, несмотря на наличие копии дикого типа, например, в случае, если продукт доминантно-отрицательной мутации все еще может взаимодействовать с теми же элементами, что и продукт, кодируемый геном дикого типа, но блокирует некоторые аспекты его функции.

Термины «нуклеотид» и «нуклеиновая кислота», применительно к последовательности или молекуле, используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к одноцепочечной или двухцепочечной ДНК или РНК природного или синтетического происхождения. Таким образом, термин «нуклеотидная последовательность» используется для любой последовательности ДНК или РНК независимо от ее длины, таким образом, этот термин включает любую нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, один нуклеотид, а также и любой вид более крупного олигонуклеотида или полинуклеотида. Таким образом, термин(термины) относится к последовательностям природных и/или синтетических дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) и/или рибонуклеиновых кислот (РНК), которые, необязательно, могут содержать аналог синтетической нуклеиновой кислоты. Нуклеиновая кислота по настоящему изобретению, необязательно, может быть кодон-оптимизированной. Термин «оптимизация кодонов» подразумевает, что использование кодонов ДНК или РНК адаптировано к использованию кодонов интересующей клетки или организма для улучшения скорости транскрипции указанной рекомбинантной нуклеиновой кислоты в интересующей клетке или организме. Специалисту в данной области техники хорошо известно, что нуклеиновая кислота-мишень может быть модифицирована в одном положении из-за вырождения кодонов, при этом, эта модификация все равно приведет к

той же аминокислотной последовательности в этом положении после трансляции, которая достигается оптимизацией кодонов с учетом видоспецифического использования кодонов клетки-мишени или организма-мишени. В контексте настоящего документа, термин «нуклеотид», таким образом, может относиться к комбинации: основание-сахар-фосфат. Нуклеотид может содержать синтетический нуклеотид. Нуклеотид может содержать аналог синтетического нуклеотида. Нуклеотиды могут представлять собой мономерные единицы последовательности нуклеиновой кислоты (например, дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и рибонуклеиновой кислоты (РНК)).

Термин «ортолог» или «ортологи» определяет пару генов, которые происходят от одного и того же предкового гена путем видообразования в ходе эволюции. Обычно ортологи сохраняют ту же функцию в ходе эволюции.

Термин «паралог» или «паралоги» определяет пару генов, которые происходят от одного и того же предкового гена путем дублирования в геноме, при этом, гены в данной клетке находятся в разных местах в пределах одного и того же генома.

Используемый в настоящем документе термин «бомбардировка частицами», также называемый «биолиственной трансфекцией» или «опосредованным микрочастицами переносом генов», относится к способу физической доставки для переноса покрытой микрочастицы или наночастицы, содержащей нуклеиновую кислоту или интересующую генетическую конструкцию, в клетку-мишень или ткань-мишень. Микрочастица или наночастица функционирует как снаряд, и ею обстреливают интересующую структуру-мишень под высоким давлением с использованием подходящего устройства, зачастую называемого генной пушкой. При трансформации посредством бомбардировки частицами используется микроснаряд из металла, покрытый интересующим геном, которым затем расстреливают клетки-мишени с использованием оборудования, известного как «генная пушка» на высокой скорости, достаточной (~1500 км/ч), чтобы проникнуть в клеточную стенку ткани-мишени, но недостаточно жесткой, чтобы вызвать гибель клеток. Для протопластов, у которых клеточная стенка полностью удалена, условия, естественно, отличаются. Осажденная нуклеиновая кислота или генетическая конструкция, по меньшей мере, на одной микрочастице, высвобождается в клетку после бомбардировки и интегрируются в геном. Ускорение микрочастиц осуществляется посредством высоковольтного электрического разряда или сжатого газа (гелия). Что касается используемых металлических частиц, то обязательно, чтобы они были нетоксичными,

нереактивными, и чтобы они имели меньший диаметр, чем клетка-мишень. Чаще всего используются золото или вольфрам. Существует большой объем общедоступной информации от изготовителей и поставщиков генных пушек и о связанной с ними системы, где указаны общие условия их использования.

Используемый в настоящем документе термин «патоген» относится к организму или вирусу, которые могут заразить растение, или которые могут вызвать у растения болезнь, или которые могут нанести вред растению. Патогены, проявляющие, по меньшей мере, одну внутриклеточную или биотрофную фазу, которые могут заразить растение или которые могут вызвать у растения болезнь, включают следующее: грибы, оомицеты, бактерии, вирусы, вироиды, вирусоподобные организмы, фитоплазмы, простейшие, нематоды и паразитические растения. Паразиты растений могут наносить вред, питаясь растением, и могут быть выбраны из эктопаразитов, таких как насекомые, в том числе тля и другие сосущие сок насекомые, клещи и позвоночные. Также сюда относятся, например, некротрофические грибы, выделяющие токсины и ферменты, которые убивают клетки-хозяева, а затем поглощают питательные вещества, высвобождаемые из мертвых клеток или тканей.

В контексте настоящего документа, термин «растение» следует толковать широко, и он относится ко всему организму растения, органу растения, к дифференцированным и недифференцированным растительным тканям, растительным клеткам, семенам и их производным, а также к их потомству. Термин «растительные клетки» включают без ограничения, например, клетки из семян, из зрелых и незрелых зародышей, меристематических тканей, проростков, каллюсных тканей в различных состояниях дифференцировки, листьев, цветов, корней, побегов, гаметофитов, зерен, ядер, спорофитов, пыльцы и микроспор, протопластов, макроводорослей и микроводорослей. Различные растительные клетки также могут быть гаплоидными, диплоидными или полиплоидными. Термин «орган растения» относится к растительной ткани или группе тканей, которые составляют морфологически и функционально отличную часть растения. Как правило, термин «зерно» используется для описания зрелого ядра, произведенного растениеводо-м для целей, отличных от выращивания или размножения вида, а термин «семя» означает зрелое ядро, используемое для выращивания или размножения вида. Для целей настоящего изобретения термины «зерно», «семя» и «ядро» будут использоваться взаимозаменяемо.

Используемый в настоящем документе термин «растительный материал» относится к любому материалу, который может быть получен из растения на любой стадии развития. Растительный материал может быть получен из культуры растения или растительной ткани, или из его органа либо *in planta*, либо *in vitro*. Этот термин, таким образом, включает растительные клетки, ткани и органы, а также развитые структуры растения, а также субклеточные компоненты, такие как, нуклеиновые кислоты, полипептиды и все химические вещества растения или метаболиты, которые могут быть выявлены в растительной клетке или компартменте, и/или которые могут быть продуцированы растением, или которые могут быть получены из экстракта любой растительной клетки, ткани или растения на любой стадии развития. Этот термин также содержит производное растительного материала, например, протопласт, полученный, по меньшей мере, из одной растительной клетки, которую содержит растительный материал. Таким образом, этот термин также содержит меристематические клетки или меристематическую ткань растения.

Термин «потомство» содержит любое последующее поколение растения, растительной клетки, растительной ткани или органа растения.

Термины «белок», «аминокислота» или «полипептид» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к аминокислотной последовательности, имеющей каталитическую ферментативную функцию или структурный, или функциональный эффект. Термин «аминокислота» или «аминокислотная последовательность» или «молекула аминокислоты» содержит любой природный или химически синтезированный белок, пептид, полипептид и фермент или модифицированный белок, пептид, полипептид и фермент, при этом, термин «модифицированный» содержит любую химическую или ферментативную модификацию белка, пептида, полипептида и фермента, включая усечения последовательности дикого типа до более короткой, но все еще активной части. В соответствии с настоящим изобретением, могут быть использованы общепринятые методы молекулярной биологии, микробиологии и рекомбинантной ДНК, известные специалистам в данной области техники. Такие методы подробно описаны в литературе. См., например, Сэмбрук, Фрич и Маниатис, *Молекулярное клонирование: Инструкция по проведению лабораторных работ*, Второе издание (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк (в данном документе, «Сэмбрук и др., 1989»); *Клонирование ДНК: Практический подход*, Тома I и II (под редакцией Д.Н. Гловера, 1985);

Синтез олигонуклеотидов (под редакцией М.Дж. Гейта, 1984); *Гибридизация нуклеиновых кислот* (под редакцией Б.Д. Хемса и С.Дж. Хиггинса (1985); *Транскрипция и трансляция* (под редакцией Б.Д. Хемса и С.Дж. Хиггинса, (1984); *Культура животных клеток* (под редакцией Р.Я. Фрешни, 1986); *Иммобилизованные клетки и ферменты* (IRL Press, (1986); Б. Пербэл, *Практическое руководство по молекулярному клонированию* (1984); Ф.М. Осубель и соавт. (под редакцией), *Текущие протоколы в молекулярной биологии*, John Wiley and Sons, Inc. (1994); и другие.

Используемый в настоящем документе термин «регуляторная область» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая может направлять и/или влиять на транскрипцию и/или трансляцию, и/или модификацию интересующей последовательности нуклеиновой кислоты. Регуляторная последовательность может содержать, по меньшей мере, одно из следующих: последовательность основного промотора, последовательность проксимального промотора, цисрегуляторную последовательность, трансрегуляторную последовательность, последовательность локуса контроля, последовательность инсулятора, сайленсирующую последовательность, энхансерную последовательность, терминирующую последовательность и/или любую их комбинацию. В дополнение к «регуляторной последовательности» или «регуляторной области» последовательности нуклеиновой кислоты, могут существовать «регуляторные домены» или «регуляторные белки/ферменты». Эти аминокислотные последовательности регулируют, например, транскрипцию, кэппинг РНК, сплайсинг, полиаденилирование, структуру хроматина, события сигнализирования, посттрансляционные модификации и тому подобное путем (i) связывания или (ii) катализирования соответствующей реакции, например, путем (i) блокирования сигнализирования путем связывания с сигнальным доменом или регулирования транскрипции в качестве фактора транскрипции, воздействующего на последовательность нуклеиновой кислоты в транс-положении, или (ii) путем событий (де)фосфорилирования, например, как это имеет место для многих киназ.

Термины «сайт-направленный/специфический фермент, модифицирующий ДНК», «сайт-специфический эффектор» или «сайт-специфическая нуклеаза» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к белку или его функциональному фрагменту, который способен вносить модификацию, такую как двухцепочечный разрыв ДНК (DSB) или одноцепочечный разрыв ДНК в сайте-мишени геномной последовательности специфичным для сайта образом, либо отдельно, либо в комбинации с другими молекулами в молекулярном комплексе. «Редактор основания» или «комплекс

редакторов оснований» содержит, по меньшей мере, один сайт-направленный/специфический фермент, модифицирующий ДНК, который способен индуцировать целенаправленный обмен оснований в сайте-мишени геномной последовательности.

Термин «TILLING», используемый в настоящем документе, представляет собой аббревиатуру названия «целенаправленный поиск индуцированных локальных повреждений в геномах» и описывает хорошо известный метод обратной генетики, первоначально разработанный для определения неизвестных SNP (однонуклеотидных полиморфизмов) в интересующих генах с использованием ферментативного переваривания и широко используемый в геномике растений и животных. Этот метод позволяет с высокой производительностью идентифицировать серию аллельных мутантов с целым рядом модифицированных функций для конкретного гена. TILLING сочетает мутагенез (например, химический или с помощью ультрафиолетового излучения) с методом чувствительного скрининга ДНК, который идентифицирует мутации единичных оснований.

Термины «трансген» или «трансгенный», в контексте настоящего документа, относятся, по меньшей мере, к одной последовательности нуклеиновой кислоты, которую берут из генома одного организма или продуцируют синтетически, и которую затем вводят в интересующую клетку, организм или ткань хозяина, и которая впоследствии интегрируется в геном хозяина посредством подходов «стабильной» трансформации или трансфекции. В противоположность этому, термин «транзистентная» трансформация или трансфекция, или введение относится к способу введения молекулярных инструментов, включая, по меньшей мере, одну нуклеиновую кислоту (содержащую, по меньшей мере, одну ДНК, РНК, одноцепочечную или двухцепочечную, или их смесь) и/или, по меньшей мере, одну аминокислотную последовательность, необязательно, содержащую подходящие химические или биологические агенты, для достижения переноса, по меньшей мере, в один интересующий компартмент клетки, включая, но не ограничиваясь этим, цитоплазму, органеллу, включая ядро, митохондрию, вакуоль, хлоропласт, или в мембрану, что приводит к транскрипции и/или трансляции, и/или ассоциации, и/или активности, по меньшей мере, одной молекулы, введенной без достижения стабильной интеграции или инкорпорации и, таким образом, к наследованию соответствующей, по меньшей мере, одной молекулы, введенной в геном клетки.

В контексте настоящего документа, термин «транзientное введение» относится к транзientному введению, по меньшей мере, одной последовательности нуклеиновой кислоты и/или аминокислотной последовательности по настоящему изобретению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, включенной в вектор доставки или в рекомбинантную конструкцию, с помощью или без помощи вектора доставки, в структуру-мишень, например, в растительную клетку, при этом, по меньшей мере, одну последовательность нуклеиновой кислоты вводят в подходящих условиях реакции, благодаря чему не происходит интеграции, по меньшей мере, одной последовательности нуклеиновой кислоты в эндогенный материал нуклеиновой кислоты структуры-мишени, в геном в целом, поэтому, по меньшей мере, одна последовательность нуклеиновой кислоты не будет интегрирована в эндогенную ДНК клетки-мишени. Как следствие, в случае транзientного введения, введенная генетическая конструкция не будет передаваться по наследству потомству структуры-мишени, например, прокариоту, животной или растительной клетке. По меньшей мере, одна последовательность нуклеиновой кислоты и/или аминокислотная последовательность, или продукты, полученные в результате ее транскрипции, трансляции, обработки, посттрансляционных модификаций или сложного построения, присутствуют только временно, то есть, транзientным образом, в конститутивной или индуцибельной форме, и, таким образом, могут быть активными только в клетке-мишени для оказания своего действия в течение ограниченного времени. Следовательно, по меньшей мере одна последовательность или эффектор, введенный посредством транзientного введения, не будет передаваться по наследству потомству клетки. Эффект, опосредованный, по меньшей мере, одной последовательностью или эффектором, введенным транзientным образом, может, однако, потенциально передаваться по наследству потомству клетки-мишени.

Термин «вариант» в контексте последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности означает последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотную последовательность, полученную из нативной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, или другой исходной последовательности путем делеции (так называемого усечения) или добавления, по меньшей мере, одной последовательности к 5'/N-концевому и/или 3'/C-концевому концу нативной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности; делеции или добавления, по меньшей мере, одной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, по

меньшей мере, в одном сайте в нативной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности; или замещения, по меньшей мере, одной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, по меньшей мере, в одном сайте в нативном белке. Вариантные белки, охватываемые настоящим изобретением, являются биологически активными, то есть, они продолжают обладать всей или некоторой активностью нативных белков по настоящему изобретению, как описано в настоящем документе. Такие варианты могут быть результатом, например, генетического полиморфизма или манипуляций человека.

Всякий раз, когда настоящее изобретение относится к процентному содержанию гомологии или идентичности последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, эти значения определяют значения, полученные для последовательностей нуклеиновых кислот с использованием программы EMBOSS Water Pairwise Sequence Alignments (нуклеотид) (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.html) или для аминокислотных последовательностей с использованием программы EMBOSS Water Pairwise Sequence Alignments (белок) (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по всей длине последовательности, то есть, любое предоставленное процентное значение означает %гомологии или %идентичности, измеренный по всей длине субъекта или исходной последовательности по сравнению с идентичной или вариантной другой последовательностью. В инструментах, предложенных Европейской молекулярно-биологической лаборатории (EMBL) Европейского института биоинформатики (EBI) для локальных выравниваний последовательностей используется модифицированный алгоритм Смита-Уотермана (см. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/> и Смит, Т.Ф. и Вотерман, М.С. «Идентификация общих молекулярных подпоследовательностей» *Journal of Molecular Biology*, 1981 147 (1):195-197). При проведении выравнивания используются параметры по умолчанию, определенные EMBL-EBI. Эти параметры предназначены (i) для аминокислотных последовательностей: Матрица = BLOSUM62, штраф за открытие гэпа = 10 и штраф за продолжение гэпа = 0,5 или (ii) для последовательностей нуклеиновых кислот: Матрица = DNFull, штраф за открытие гэпа = 10 и штраф за продолжение гэпа = 0,5. Кроме того, инструменты биоинформатики для выравниваний множества последовательностей нуклеиновых кислот и аминокислотных последовательностей легко доступны специалисту

в данной области техники и могут быть получены, например, из EMBL/EBI, включая Clustal Omega, Kalign, MAFFT, MUSCLE, MView, T-Coffee или WebPRANK.

Краткое описание чертежей

На **Фигуре 1** показана идентичность между различными последовательностями белка (SEQ ID NO: 11-19) генов CPL3 и сравнение с последовательностью белка AtCPL3 *Arabidopsis* (эталонная последовательность: SEQ ID NO: 20). **А:** Выравнивания последовательностей аминокислотных последовательностей, кодируемых генами CPL3 шести различных сельскохозяйственных растений, по сравнению с эталонной последовательностью *Arabidopsis thaliana*; **В:** показан процент идентичности, определенный после выравнивания. Как видно при выполнении выравнивания последовательностей соответствующих последовательностей белка, указанные последовательности существенно различаются у разных растений (*Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Solanum tuberosum*, *Triticum aestivum*, *Sorghum bicolor*, *Beta vulgaris* и *Zea mays*, соответственно), то есть, наблюдалась идентичность последовательностей в диапазоне 36%-45%, по сравнению с эталонной последовательностью *Arabidopsis*.

На **Фигуре 2** показана идентичность между различными кодирующими последовательностями генов CPL3 (SEQ ID NO: 2-10) в сравнении с кодирующей последовательностью AtCPL3 *Arabidopsis*, в качестве эталонной последовательности (эталонная последовательность: SEQ ID NO: 1). **А:** Выравнивания последовательностей кодирующих последовательностей генов CPL3 шести различных сельскохозяйственных растений, по сравнению с эталонной последовательностью *Arabidopsis thaliana*; **В:** показан процент идентичности, определенный после выравнивания. Как видно при выполнении выравнивания последовательностей соответствующих последовательностей гена, указанные последовательности существенно различаются у разных растений (*Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Solanum tuberosum*, *Triticum aestivum*, *Sorghum bicolor*, *Beta vulgaris* и *Zea mays*, соответственно), то есть, наблюдалась идентичность последовательностей в диапазоне 44%-53%, по сравнению с эталонной последовательностью *Arabidopsis*.

На **Фигуре 3** показаны результаты эксперимента по сайленсингу генов, индуцированному вирусом TaCPL3 (VIGS), более подробно описанного ниже в Примере 1. VIGS всех гомеологов TaCPL3 Вирусом ложной штриховатости ячменя (BSMV) с сайленсирующей последовательностью TaCPL3_fragA, также называемой TaCPL3-A (SEQ ID NO: 5 и 15), или TaCPL2_fragB, также называемой TaCPL3-B (SEQ ID NO: 6 и 16), привел

к уменьшению пикнид и образованию спор у выращенной из сорта Taifun пшеницы, листья которой были заражены *Zyoseptoria tritici*. Пикниды: n=10 растений с 2 проанализированными листьями каждого растения. Споры: споры 5 листьев были промыты и подсчитаны (n=8). ¹: числа с разными заглавными буквами статистически различаются в соответствии с ANOVA (дисперсионный анализ).

На **Фигуре 4** показана векторная карта плазмидной конструкции, используемой для трансформации кукурузы в сайленсирующую ZmCPL3 (Пример 2 и SEQ ID NO: 24).

На **Фигуре 5** показаны результаты количественного анализа устойчивости к *Setosphaeria turcica*. **A**: количественный анализ посредством сегрегации растений T1 событий трансформации ZmCPL3_РНКи MTR0374-T-038 и MTR0374-T-053, как показано далее в Примере 2. ¹: ntg = нетрансгенный сегрегант (незиготическая линия). ²: Биомассу грибов определяли посредством количественной ПЦР на ДНК, извлеченной из зараженных листьев после количественного анализа устойчивости. Для нормализации данных использовали количественную ПЦР с ДНК-специфическими праймерами кукурузы. ³: Экспрессию генов для различных линий определяли посредством ZmCPL3-специфической количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Данные нормализованы по экспрессии конститутивного гена ZmEF1. Данные были сгенерированы на основе растений, которые не были заражены; **B**: количественный анализ посредством линий T2 и соответствующих незиготических родственных линий (нулевые сегреганты), как далее показано в Примере 2. ¹: числа с разными заглавными буквами статистически различаются в соответствии с ANOVA. ²: ntg = нетрансгенный сегрегант (незиготическая линия). ³: измерено перед инокуляцией растений.

На **Фигуре 6** показана репрезентативная картина результатов зараженных листьев для количественного анализа устойчивости к *Setosphaeria turcica* посредством гомозиготных линий T2 и соответствующих незиготических родственных линий (нулевые сегреганты). Эксперименты с ZmCPL3_РНКи (растения T2) показаны далее в Примере 2.

На **Фигуре 7** показана усиленная устойчивость сорта Taifun к фузариозу после VIGS-опосредованного сайленсинга CPL3 (см. также Таблицу 8).

На **Фигуре 8** показаны колосья растений пшеницы после заражения *Fusarium graminearum*. a. трансформированные пустым вектором, b. необработанные, c. контроль сайленсинга, d. VIGS-сайленсированный CPL3.

На **Фигуре 9** показана активность нуклеазы MAD7 в нескольких сайтах-мишенях Zm-CPL3 в протопластах кукурузы. Протопласты кукурузной линии A188 были независимо

совместно трансфицированы конструкциями, которые экспрессируют ген белка нуклеазы MAD7 и одну из множества последовательностей крРНК в определенные сайты в гене. Хотя сайты-мишени были предварительно отобраны на основе одних и тех же критериев, наблюдались различия в частоте INDEL (вставка/делеция). Полосы с точками показывают исходные данные, полученные в результате обработки протопластов, в то время как полосатые полосы основаны на экстраполированных значениях, основанных на 100% трансфекции протопластов.

На **Фигуре 10** показано графическое представление последовательностей для экзона 1 Zm-CPL3, показывающее положения испытываемых сайтов-мишеней. Экзон 1 CPL3 показан желтым цветом, а последовательности крРНК отмечены серым, чтобы продемонстрировать положение потенциальных двухцепочечных разрывов каждой последовательности-мишени или конструкции-мишени. Кроме того, зеленые маркеры указывают на праймеры, используемые для ПЦР с целью генерации ампликона для анализа последовательностей по Сэнгеру и DRIVE (метод драйв).

Подробное описание вариантов осуществления изобретения

Настоящее изобретение основано на идентификации гомологов CPL3 в большом количестве различных видов растений, включая основные сельскохозяйственные растения, которые были функционально охарактеризованы и которые, как было показано, имеют решающее значение для иммунитета растений, приводящего к повышению устойчивости к патогенам, что важно также в отношении гемибитрофных патогенных грибов. Результаты настоящего изобретения указывают на то, что желаемый эффект устойчивости к патогенам может быть достигнут путем целенаправленной модуляции гена CPL3, делающей ненужным полный нокаут, причем нокаут может быть связан с нежелательными последствиями, такими как нарушение роста растений или нежелательные сигнальные функции из-за отсутствия эффектора CPL. Результаты настоящего изобретения указывают на то, что желаемый эффект устойчивости к патогенам может быть достигнут путем простого нокдауна гена CPL3 или путем введения целенаправленной мутации в ген CPL3, или его регуляторной последовательности, включая также комбинации этих стратегий, что делает ненужным полный нокаут, поскольку модуляция функции CPL3 опосредована, исходя из понимания функционального взаимодействия CPL3 с другими эффекторами в иммунитете растений для достижения устойчивости к патогенам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, также устойчивости к гемибитрофным патогенам, которые известны своим сложным образом жизни, который ассоциируется с

серьезными проблемами, вызывающими болезни растений, приводящие к потере урожая. Кроме того, сниженная регуляция генов CPL3, достигаемая посредством сайленсирующих конструкций, или, достигаемая путем редактирования РНК, или путем создания и предложения доминантно-отрицательных мутантных аллелей, позволяет избежать негативного эффекта, оказываемого на рост растений, о котором сообщают, например, Койва и соавт. (2002), и потенциальных других побочных эффектов, связанных с манипуляцией центральной молекулы в иммунитете растений. Наконец, таким образом, сниженная регуляция CPL3 также может быть достигнута путем введения доминантно-отрицательного аллеля CPL3, например, путем введения целенаправленной точечной мутации, которая приводит к доминантной устойчивости на основе CPL3.

В первом аспекте, может быть предложено растение, обладающее устойчивостью к патогенам, при этом, устойчивость к патогенам придается или повышается посредством модуляции нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный фосфатазоподобный белок 3 (CPL3) с С-концевым доменом или его регуляторную последовательность, или посредством модуляции транскрипции эндогенного белка CPL3, при этом, модуляция достигается посредством, (i) по меньшей мере, одной мутации нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, по меньшей мере, одна мутация имеет доминантно-отрицательный эффект, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, по меньшей мере, одна мутация вызывает изменение аминокислотной последовательности консервативного каталитического домена белка CPL3, содержащего мотив DXDXT/V; и/или, (ii) по меньшей мере, одной сайленсирующей конструкции, направленной, по меньшей мере, на одну эндогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок CPL3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, направленной на все эндогенные нуклеотидные последовательности, кодирующие белок CPL3; и/или (iii) модификации нативной регуляторной последовательности, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный белок CPL3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, всех нуклеотидных последовательностей, кодирующих эндогенный белок CPL3, при этом, модификация вызывает снижение скорости экспрессии, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный белок CPL3. Таким образом, вышеуказанный аспект охватывает три различных режима (i)-(iii) для целенаправленной

модуляции, которые могут использоваться отдельно или в комбинации для получения растения, устойчивого к патогенам.

Используя по настоящее время поиск гомологии на основе последовательности модельного гена *Arabidopsis*, охарактеризованной для иммунитета растений только как отрицательный регулятор BABA -индуцированной экспрессии генов (Койва и соавт., 2002), и в сценарии полного нокаута (SEQ ID NO: 1), были идентифицированы, охарактеризованы и целенаправленно модулированы несколько новых генов, кодирующих CPL3 (SEQ ID NO: 2-10), у большого количества сельскохозяйственных растений, которые на сегодняшний день специфически не ассоциированы с иммунитетом растений. Как показано на **Фигурах 1 и 2**, идентичность обнаруженных белков CPL3 (SEQ ID NO: 11-19) с белком AtCPL3 *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 20) составляет 36%-45% на уровне аминокислот. Аналогичным образом, идентичность кодирующей последовательности (CDS) обнаруженных генов CPL3 (SEQ ID NO: 2-10) с кодирующей последовательностью *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 1) составляет 44%-53% на уровне нуклеотидов. Кроме того, было обнаружено, что соя (*Glycine max*) содержит две паралогичные последовательности CPL3. Исходя из этой степени взаимосвязи, на первый взгляд не было очевидно, будут ли идентифицированные гены обладать благоприятными функциональными признаками, поэтому был необходим более глубокий анализ механизма действия, а также исследования мутаций и нокаутов.

Удивительно, но было выявлено, что модуляция, по меньшей мере, одного, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, всех новых аллелей CPL3 или их регуляторной последовательности коррелирует с повышенной устойчивостью к патогенам у растения, несущего соответствующие аллели CPL3 в качестве эндогенных генов/аллелей. Таким образом, можно было бы идентифицировать несколько стратегий модификации последовательности ДНК или РНК гена CPL3, или также регуляторной последовательности, такой как промотор, отдельно или в комбинации, которые, как оказалось, превосходят создание полного нокаута гена CPL3, вероятно, из-за соответствующей функции, которую выполняют продукты гена CPL в их природном контексте в иммунитете растений.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение, обладающее устойчивостью к патогенам, может содержать нуклеотидную последовательность, при этом, нуклеотидная последовательность кодирует белок CPL3, модифицированный целенаправленным образом для оптимизации устойчивости к патогенам, при этом, последовательность CPL3 может быть выбрана из группы, состоящей из: (а) нуклеотидной

последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2-10, или ее гомологичной, ортологичной или паралогичной последовательности; (b) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с нуклеотидной последовательностью, определенной в (a); (c) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11-19, или аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-19; (d) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-19, или (e) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с нуклеотидной последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности, как определено в (a)-(d), в жестких условиях.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, патоген, к которому желательна повышенная устойчивость растения, может представлять собой, по меньшей мере, один из патогенных грибов, патоген оомицет, бактериальный патоген, вирус, патоген нематоду или насекомое. Хотя сорняки являются основной причиной потери урожая в глобальном масштабе, основные потери сельскохозяйственные культуры несут из-за повреждения насекомыми, питающимися растениями как патогены, и из-за других болезней растений, вызываемых различными патогенами растений. В округленных (приблизительных) цифрах общемировой годовой объем производства в %, потерянный из-за различных вредителей в начале 21 века, был оценен следующим образом: потери из-за вредителей-животных - 18%; болезни, вызванные микроорганизмами - 16% (и 70-80% этих потерь были вызваны грибами); сорняки - 34%; в общей сложности - 68% среднегодовых потерь объема производства сельскохозяйственных культур (данные Эрке, 2006. Потери урожая от вредителей. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.). Патогены растений

зачастую делят на биотрофов, некротрофов и гемибиотрофов, в зависимости от их образа жизни. Определения этих терминов следующие: биотрофы получают энергию из живых клеток. Они встречаются на (например, также насекомые, питающиеся растением) или в живых растениях и могут иметь очень сложные потребности в питательных веществах. Кроме того, они не убивают растения-хозяева быстро. Некротрофы получают энергию из убитых клеток. Они быстро проникают в растительную ткань и убивают ее, а затем сапротрофно живут на мертвых останках. Наконец, у гемибиотрофов есть начальный период биотрофии, за которым следует некротрофия.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, патоген, к которому желательна повышенная устойчивость растения, может, таким образом, представлять собой биотрофный, некротрофный или гемибиотрофный гриб, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, выбранный из группы, состоящей из: *Zymoseptoria tritici*, *Setosphaeria turcica*, *Fusarium spp.* *Fusarium graminearum*, *Colletotrichum spp.*, такого как *Colletotrichum graminicola*, *Magnaporthe grisea*, *Magnaporthe oryzae*, *Phytophthora infestans*, *Cercospora spp.*, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, *Cercospora beticola* или *Cercospora zeae-mayidis*.

Патогены растений могут иметь широкий диапазон хозяев, например, в случае насекомых, питающихся разными видами растений с одинаковыми предпочтениями, или они могут иметь довольно узкий диапазон хозяев, например, в случае вирусов растений. Таким образом, патоген растения по настоящему изобретению может включать любой патоген растения, устойчивость к которому может быть повышена путем модуляции последовательности гена CPL3, его регуляторной последовательности, его транскрипта или его белкового продукта.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, патоген, к которому может быть получена повышенная устойчивость, может представлять собой патоген пшеницы или кукурузы, как представлено в нижеследующих Таблицах 1-7:

Таблица 1: Болезни, вызываемые грибами, и соответствующие патогены *Triticum spp.*

Патоген	Болезнь	Тип патогена	Тип болезни
<i>Blumeria graminis f. sp. tritici</i>	Мучнистая роса	Гриб	Болезнь листьев
<i>Drechslera tritici-repentis</i>	Пиренофороз	Гриб	Болезнь листьев

<i>Fusarium culmorum</i>	Фузариоз колоса злаковых культур	Гриб	Болезнь метелок
<i>Fusarium graminearum</i>	Фузариоз колоса злаковых культур	Гриб	Болезнь метелок
<i>Gaeumannomyces graminis</i> <i>var. tritici</i>	Разные болезни	Гриб	Болезнь корня
<i>Magnaporthe oryzae</i>	Пирикулярриоз пшеницы	Гриб	Болезнь метелок
<i>Pseudocercospora</i> <i>herpotrichoides</i>	Глазковая пятнистость	Гриб	Болезнь стебля
<i>Puccinia graminis f. sp. tritici</i>	Чёрная ржавчина злаков	Гриб	Болезни листьев и стеблей
<i>Puccinia striiformis f. sp. tritici</i>	Желтая ржавчина злаков	Гриб	Болезнь листьев
<i>Puccinia triticina f. sp. tritici</i>	Буря ржавчина злаков	Гриб	Болезнь листьев
<i>Zymoseptoria tritici</i>	Септориозная пятнистость листьев	Гриб	Болезнь листьев
<i>Stagonospora nodorum</i>	Септориоз колоса злаковых культур	Гриб	Болезнь листьев и метелки

Таблица 2: Болезни, вызываемые грибами, и соответствующие патогены *Zea mays*

Патоген	Болезнь	Тип патогена	Тип болезни
<i>Aspergillus flavus</i>	Аспергиллез початков	Гриб	Болезнь кукурузных початков
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Аспергиллез початков	Гриб	Болезнь кукурузных початков
<i>Aureobasidium zeae</i>	Глазковая пятнистость	Гриб	Болезнь листьев

<i>Bipolaris maydis</i>	Южный гельминтоспориоз листьев кукурузы	Гриб	Болезнь листьев, цветоножки и початков
<i>Bipolaris zeicola</i>	Гельминтоспориозная пятнистость листьев кукурузы (северный гельминтоспориоз)	Гриб	Болезнь листьев и початков
<i>Cercospora zae-maydis</i>	Серая пятнистость листьев	Гриб	Болезнь листьев
<i>Colletotrichum graminicola</i>	Антракнозная пятнистость листьев Антракнозная гниль стеблей Антракноз початков	Гриб	Болезнь листьев, цветоножки и початков
<i>Fusarium graminearum</i>	Гниль корневой шейки и стеблей Гниль початков	Гриб	Болезнь корневой шейки, цветоножки и початков
<i>Fusarium proliferatum</i>	Фузариозная гниль цветоножки и початков	Гриб	Болезнь цветоножки и початков
<i>Fusarium subglutinans</i>	Фузариозная гниль цветоножки и початков	Гриб	Болезнь цветоножки и початков
<i>Fusarium temperatum</i>	Фузариозная гниль цветоножки и початков	Гриб	Болезнь цветоножки и початков
<i>Fusarium verticillioides</i>	Фузариозная гниль початков	Гриб	Болезнь початков
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Угольная гниль	Гриб	Болезнь цветоножки

Вид <i>Penicillium</i>	Сине-зеленая гниль початков	Гриб	Болезнь початков
<i>Phaeosphaeria maydis</i>	Пятнистость листьев <i>Phaeosphaeria</i>	Гриб	Болезнь листьев
<i>Phoma terrestris</i> , вид <i>Phytium</i> и вид <i>Fusarium</i>	Красная гниль корней	Гриб	Болезнь корней и стеблей
<i>Physoderma maydis</i>	Бурая пятнистость листьев и гниль стеблей	Гриб	Болезнь листьев и стеблей
<i>Puccinia polysora</i>	Южная ржавчина	Гриб	Болезнь листьев
<i>Puccinia sorghi</i>	Бурая ржавчина	Гриб	Болезнь листьев
<i>Rhizoctonia solani</i>	Ризоктониозная гниль корневой шейки и опорного корня	Гриб	Болезни саженцев и корней
<i>Rhizoctonia solani f. sp. sasakii</i>	Полосатый лист и болезнь эпидермиса	Гриб	Болезнь листьев
<i>Setosphaeria turcia</i>	Северный гельминтоспориоз листьев кукурузы	Гриб	Болезнь листьев
<i>Sphacelotheca reiliana</i>	Пыльная головня кукурузы	Гриб	Болезнь початков
<i>Stenocarpella macrospora</i>	Диплодиоз листьев	Гриб	Болезнь листьев
<i>Stenocarpella maydis</i>	Диплодиоз стеблей Диплодиоз початков	Гриб	Болезнь цветоножки и початков
<i>Trichoderma viride</i>	Зеленая плесень початков	Гриб	Болезнь початков
<i>Ustilago maydis</i>	Пузырчатая головня кукурузы	Гриб	Болезнь листьев

Таблица 3: Болезни *Zea mays*, вызываемые оомицетами

Патоген	Болезнь	Тип патогена	Тип болезни
<i>Peronosclerospora sorghi</i>	Ложная мучнистая роса сорго	Оомицет	Болезнь листьев
<i>Phythium aphanidermatum</i>	Питиоз стеблей	Оомицет	Болезнь цветоножки
Вид <i>Phythium</i>	Питиозная гниль саженцев и гниль корней	Оомицет	Саженцы и корень
<i>Sclerophthora macrospora</i>	Акмания	Оомицет	Болезнь листьев

Таблица 4: Болезни *Zea mays*, вызываемые бактериями

Патоген	Болезнь	Тип патогена	Тип болезни
<i>Clavibacter michiganensis</i>	Бактериальное увядание	Бактерия	Болезнь листьев
Вид <i>Erwinia</i>	Бактериальная гниль стеблей	Бактерия	Болезнь цветоножки
<i>Pantoea stewartii</i>	Бактериоз початков	Бактерия	Болезнь листьев и стеблей
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. syringae</i>	Красная пятнистость листьев	Бактерия	Болезнь листьев

Таблица 5: Болезни *Zea mays*, вызываемые вирусами

Патоген	Болезнь	Тип патогена	Тип болезни
Вирус карликовой мозаики кукурузы	Карликовая мозаика кукурузы	Вирус	Болезнь листьев
Хлоротический карликовый вирус кукурузы	Хлоротическая карликовость кукурузы	Вирус	Болезнь листьев

Вирус грубого карлика кукурузы	Грубая карликовость кукурузы	Вирус	Болезнь листьев
Вирус полосы кукурузы	Полосатость кукурузы	Вирус	Болезнь листьев

Таблица 6: Болезни *Zea mays*, вызываемые нематодой

Патоген	Болезнь	Тип патогена	Тип болезни
Вид <i>Belonolaimus</i> и <i>Longidorus</i>	Жалящие и игольчатые нематоды	Нематода	Болезнь корня
Вид <i>Meloidogyne</i>	Яванская галловая нематода	Нематода	Болезнь корня
Вид <i>Paratrichodorus</i>	Нематода щетинистых корнеплодов	Нематода	Болезнь корня
Вид <i>Pratylenchus</i>	Нематода, поражающая корни	Нематода	Болезнь корня

Таблица 7: Болезни *Zea mays*, вызываемые насекомыми

Патоген	Болезнь	Тип патогена	Тип болезни
<i>Agrotis ipsilon</i>	Гусеница озимой совки	Насекомое	Болезнь листьев
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Огнёвка кукурузная	Насекомое	Болезнь цветоножки и початков
<i>Pseudaletia unipuncta</i>	Гусеница, поражающая злаковые растения	Насекомое	Болезнь листьев и початков
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	Тля кукурузная листовая	Насекомое	Болезнь листьев

Термины «устойчивость» или «устойчивый» в контексте настоящего документа относятся к способности растения противостоять фенотипу, вызванному заражением патогеном, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения,

патогенным грибом до определенной степени, то есть, к способности предотвращать, уменьшать или замедлять инфекцию или вред, причиненный патогеном. Термин «устойчивость», таким образом, не относится исключительно к «черному или белому» фенотипу, но предназначен для обозначения любого улучшения симптомов инфекции или заражения, наблюдаемого у растения, обладающего активностью эндогенного белка CPL3, по сравнению с растением, обладающим активностью специфически модифицированного белка CPL3 в соответствии с различными аспектами настоящего изобретения. Таким образом, устойчивость к данному патогену может варьироваться от слегка повышенной устойчивости до абсолютной устойчивости к данному патогену, при этом, всегда сравнивают модифицированное растение, растительную клетку, ткань, орган или материал с немодифицированным растением, растительной клеткой, тканью, органом или материалом, соответственно, природного происхождения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, устойчивость к патогенам может представлять собой устойчивость к грибам, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, устойчивость к гемибiotрофным грибам. Как правило, существует большая потребность в идентификации новых противогрибковых стратегий. Гемибiotрофные патогены охватывают некоторые из наиболее значимых для сельскохозяйственных растений патогенов, например, для пшеницы (*Triticum aestivum*), сои (*Glycine max*), кукурузы (*Zea mays*) и так далее. Гемибiotрофный патогенный гриб *Exserohilum turcicum* (анаморфная форма гриба; телеоморф: *Setosphaeria turcica*), вызывающий NCLB (Северный гельминтоспориоз листьев кукурузы), например, обнаруживается во влажном климате везде, где выращивается кукуруза, и имеет двураздельный жизненный цикл, препятствующий созданию эффективных противогрибковых агентов, защищающих растения. *E. turcicum* выживает в остатках *Zea mays* и со временем накапливается в системах непрерывного возделывания кукурузы при высоком содержании пожнивных остатков. Высокая влажность и умеренные температуры способствуют персистенции гриба *E. turcicum*, вызывая огромные потери урожая, например, из-за снижения фотосинтеза, приводящего к ограниченному наполнению початков, или потери урожая, если вторичная гниль стеблей и полегание стеблей сопровождаются потерей площади листьев. Из-за сложного жизненного цикла, с гемибiotрофными патогенами трудно бороться, и они представляют серьезную угрозу для сельского хозяйства, поскольку эти грибы зачастую могут обходить иммунную систему растений. Следовательно, необходимы стратегии, в предпочтительном варианте

осуществления настоящего изобретения отличные от фунгицидов, для предложения соответствующих сельскохозяйственных растений, обладающих эндогенной устойчивостью к выбранным патогенам, таким как патогенные грибы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, одна мутация, которая должна быть введена в ген, кодирующий CPL3, или его регуляторную последовательность, может вызывать доминантно-отрицательный эффект и может присутствовать в гетерозиготном состоянии в растении. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, мутация может присутствовать в гомозиготном состоянии. В зависимости от количества различных аллелей CPL3 в идиоплазме, а также в зависимости от функционального результата, гомозиготное или гетерозиготное состояние может быть предпочтительным для получения оптимального баланса между повышенной устойчивостью к грибам и поддержанием нормальных функций клеток.

После открытия гомологов CPL3 и проведения испытаний на благоприятные мутации, были проведены испытания на предмет того, приводит ли сниженная регуляция экспрессии гена CPL3 к повышенной устойчивости к патогенам. Поэтому гены кукурузы (*Zea mays*) ZmCPL3 (SEQ ID NO: 9 и 19) и пшеницы (*Triticum aestivum*) TaCPL3-A (SEQ ID NO: 5 и 15), TaCPL3-B (SEQ ID NO: 6 и 16) и TaCPL3-D (SEQ ID NO: 7 и 17) были выбраны для проведения испытаний на устойчивость к патогенам с целью получения функциональных данных для соответствующих сельскохозяйственных растений на основе идентифицированных генов.

Неожиданно было обнаружено, что специфическая модуляция белка CPL3 или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность или кодирующей регуляторную последовательность для гена *cpl3*, приводила к растительной клетке, ткани, органу, целому растению или растительному материалу, демонстрирующему общий нормальный рост и/или пролиферацию, либо для механизмов, использующих доминантно-отрицательную мутацию, модификацию регуляторной последовательности, либо неполное снижение регуляции транскрипта CPL3. «Нормальный рост и пролиферация» означает, что растительная клетка или организм, модулированные по настоящему изобретению, по существу демонстрируют те же характеристики роста и пролиферации, что и немодулированное растение или растительная клетка на фенотипическом уровне. Например, модулированное растение не демонстрирует определяемых симптомов, ассоциированных с ростом, делением клеток или гибелью клеток, при непосредственном сравнении с немодулированным материалом того же

происхождения и с тем же генетическим фоном. Ввиду того, что белки CPL3 являются важными ферментами в клеточной сигнализации, это открытие было неожиданным и оно, вероятно, связано с тем, что сигнализация CPL3 модулируется довольно специфическим образом по настоящему изобретению, основываясь на конкретных мутациях и/или на специфическом снижении регуляции экспрессии CPL3 вместо предложения полного нокаута соответствующих генов в гетерозиготном или гомозиготном состоянии. В частности, в качестве значительного преимущества настоящего изобретения было отмечено, что неполное снижение регуляции или целенаправленная мутация последовательности гена CPL3 или его регуляторной последовательности, помимо желаемого эффекта достижения устойчивости к патогенам, не нарушает нормального роста и/или развития растения.

Термин «модуляция» или «модулирование» используется в настоящем документе в качестве главного термина для целевого контроля или модификации последовательности ДНК, РНК или белка природного происхождения, включая контроль или модификацию транскрипции, трансляции или посттрансляционных событий. В соответствии с различными аспектами настоящего изобретения, «мутацию» можно понимать как специфическую форму модуляции, действующую на ДНК в качестве последовательности нуклеиновой кислоты-мишени для установления потенциально наследуемой модуляции. Мутация может быть введена целенаправленным образом, например, с использованием сайт-направленного фермента, модифицирующего ДНК, или мутация может быть введена случайным образом с последующим специфическим скринингом, например, посредством TILLING, при этом, последний способ обеспечивает более высокую пропускную способность, но требует большего объема скрининга для идентификации желаемых мутаций.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, может быть предложено растение, обладающее повышенной устойчивостью к патогенам, при этом, по меньшей мере, одна мутация нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3, может вызвать замещение Asp на Ala в положении 928, представленном в SEQ ID NO: 19, в положении 944, представленном в SEQ ID NO: 14, в положении 949, представленном в SEQ ID NO: 11, в положении 944, представленном в SEQ ID NO: 14, в положении 949, представленном в SEQ ID NO: 11, в положении 953, представленном в SEQ ID NO: 12, в положении 910, представленном в SEQ ID NO: 13, в положении 890, представленном в SEQ

ID NO: 18, в положении 938, представленном в SEQ ID NO: 15, в положении 929, представленном в SEQ ID NO: 16, в положении 938, представленном в SEQ ID NO: 17.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, растение, обладающее устойчивостью к патогенам, может быть получено с использованием, по меньшей мере, одной сайленсирующей конструкции, содержащей (I.) молекулу РНКи, направленную, нацеленную или гибридизирующуюся с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок CPL3, или с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей указанную молекулу РНКи; или (II.) РНК-специфическую систему CRISPR/Cas, направленную, нацеленную на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок CPL3, или на полинуклеотидную последовательность, кодирующую указанную РНК-специфическую систему CRISPR/Cas, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, молекула РНКи выбрана из молекулы дцРНК, молекулы кшРНК, молекулы микроРНК или молекулы миРНК, которая содержит, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45 или 50 непрерывных нуклеотидов кодирующей нуклеотидной последовательности белка CPL3 или его комплементарной последовательности в смысловом или антисмысловом направлении, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, молекула РНКи выбрана из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21-24, или из последовательности, имеющей, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с ней.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, молекула РНКи или последовательность, содержащаяся в сайленсирующей конструкции, предпочтительно не имеет существенной идентичности последовательности с другими геномными областями в геноме растения. «Существенная идентичность последовательности» подразумевает, что молекула РНКи или сайленсирующая конструкция, кодирующая или содержащая ее, будет иметь идентичность с последовательностью, отличной от последовательности-мишени, в геноме или транскриптоме растения или растительной клетки. Основываясь на изобретении, описанном в настоящем документе, а также основываясь на геномных данных соответствующих сельскохозяйственных растений, специалист в данной области техники может, таким образом, создать сайленсирующие конструкции или молекулы РНКи для экспериментов по нокдауну транскриптов CPL3, которые будут высокоспецифичными для

последовательности-мишени CPL3, что обеспечит нормальное функционирование клеток иным образом.

Существует несколько способов снизить регуляцию экспрессии гена. Среди них экспрессия конструкций РНКи или микроРНК, или модификация промотора, или других регуляторных элементов гена. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, для снижения регуляции генов CPL3, в соответствии со вторым аспектом режимов модуляции по настоящему изобретению, может быть экспрессирован доминантно-отрицательный аллель CPL3. Фукудоме и соавт. (2014) сообщили, что точечная мутация D128A в консервативном мотиве DXDT каталитического домена фосфатазы привела к доминантно-отрицательной форме, по меньшей мере, у белка AtCPL4 *Arabidopsis*, который участвует в нормальном росте и развитии растений. Однако сверхэкспрессия доминантного аллеля AtCPL4_D128A у *Arabidopsis* была летальной и напоминала фенотип нокаутных линий AtCPL4, которые являются гомозиготными летальными. Растения *Arabidopsis* с конструкциями РНКи AtCPL4 были жизнеспособными с умеренно токсичным фенотипом. Это свидетельствует о том, что сильная сверхэкспрессия доминантно-отрицательного аллеля AtCPL4 напоминает полный нокаут AtCPL4.

Для достижения точно настроенной модуляции в соответствии с первым аспектом режимов модуляции по настоящему изобретению, доминантно-отрицательный аллель может быть предложен путем введения, по меньшей мере, одной целенаправленной мутации, по меньшей мере, в одну последовательность, кодирующую белок CPL3, при этом, по меньшей мере, одна мутация приводит к доминантно-отрицательному аллелю CPL3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, мутация вызывает изменение аминокислотной последовательности консервативного домена DXDXT белка CPL3. В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения, мутантный вариант соответствующего варианта CPL3 затем может быть помещен под контроль слабого промотора, например, эндогенного промотора, необязательно индуцибельного промотора, в соответствии с различными способами генерирования растительной клетки, ткани, органа, целого растения или растительного материала для достижения устойчивости к патогенам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, устойчивости к грибам, при одновременном предотвращении потенциально летальных побочных эффектов сильной экспрессии варианта.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, промотор может представлять собой эндогенный или нативный промотор.

Следовательно, один вариант осуществления настоящего изобретения охватывает доминантно-отрицательный аллель гена CPL3 под контролем нативного промотора, который придает устойчивость к патогенам, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, устойчивость к гемибииотрофным патогенам. Чтобы получить доминантно-отрицательные аллели обнаруженных генов CPL3, можно использовать мутации, например, в мотиве DXDXT, аналогичном D128A в AtCPL4. Дополнительные предпочтительные точечные мутации, которые приводят к доминантно-отрицательному аллелю, выбраны из группы, состоящей из D928A в ZmCPL3 (SEQ ID NO: 19), D944A в BvCPL3 (SEQ ID NO: 14), D949A в GmCPL3_1 (SEQ ID NO: 11), D953A в GmCPL3_2 (SEQ ID NO: 12), D910A в StCPL3 (SEQ ID NO: 13), D890A в SbCPL3 (SEQ ID NO: 18), D938A в TaCPL3-A (SEQ ID NO: 15), D929A в TaCPL3-B (SEQ ID NO: 16), и D938A в TaCPL3-D (SEQ ID NO: 17). На основании настоящего изобретения, сопоставимые мутации могут быть вставлены в сопоставимые положения в консервативном мотиве DXDXT дополнительных вариантов гена CPL в других растениях, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в сельскохозяйственных растениях.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, ненативный промотор может быть вставлен для дополнительного контроля экспрессии интересующего гена CPL3 в интересующем растении-мишени.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, снижение регуляции, по меньшей мере, одного гена CPL3 может быть достигнуто путем введения точечной мутации, по меньшей мере, в один нативный ген CPL3 с помощью средств и методов, дополнительно раскрытых ниже, которые приводят к доминантно-отрицательному аллелю и сохранению этой мутации в гетерозиготном состоянии. Эффект устойчивости доминантно-отрицательного аллеля CPL3 был бы генетически доминантным, что дает преимущества при селекции устойчивых гибридных культур по сравнению, например, с рецессивными мутациями в промоторе, которые должны присутствовать в обоих родителях гибрида.

Для растений или растительных клеток, где присутствуют паралоги генов CPL3, например, в сое (*Glycine max*), варианты осуществления настоящего изобретения с использованием доминантно-отрицательного аллеля CPL3 для конструирования устойчивых к патогенам растений могут быть предпочтительны, поскольку эта стратегия

требует потенциально меньших усилий, чем, например, снижение регуляции всех паралогов CPL3 посредством модификаций промотора или сайленсирующих конструкций, как описано в настоящем документе, одновременно.

В контексте настоящего изобретения, термины «интерференция РНК» или «РНКи» относятся к механизму снижения регуляции гена, который, как было продемонстрировано, существует у всех эукариот. Этот механизм был впервые обнаружен в растениях, где получил название «посттранскрипционный сайленсинг генов» или «PTGS». В РНКи малые РНК (примерно из 21-24 нуклеотидов) функционируют так, чтобы направлять специфические эффекторные белки (например, членов семейства белков Аргонавтов) к нуклеотидной последовательности-мишени посредством комплементарного спаривания оснований. Затем комплекс эффекторных белков снижает регуляцию экспрессии РНК-мишени или ДНК-мишени. Системы регуляции генов, направляемые малыми РНК, были независимо обнаружены (и названы) в растениях, грибах, червях, мухах и клетках млекопитающих. В совокупности, PTGS, сайленсинг РНК и косупрессия (в растениях); подавление (в грибах и водорослях); и РНКи (в клетках *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* и млекопитающих) представляют собой примеры систем регуляции генов на основе малых РНК.

В растениях, во время действия механизма РНКи, иницируется сайленсинг посредством фермента Dicer, и дцРНК обрабатывается для преобразования триггера сайленсинга в ~22-нуклеотидные, малые интерферирующие РНК (миРНК). Антисмысловая цепь миРНК становится специфической для комплекса эндонуклеаза-белок, комплекса РНК-индуцированного сайленсинга (RISC), которая затем нацеливается на гомологичную РНК и разрушает ее в специфическом сайте, что приводит к нокдауну экспрессии белка. Таким образом, технология РНКи может представлять собой замещение сложных молекулярных методов в силу наличия нескольких преимуществ: ее специфичности и сайленсинга генов на основе последовательности. Растения также могут контролировать вирусные заболевания с помощью РНКи и проявлять устойчивость при наличии соответствующих антисмысловых или шпилечных конструкций РНКи. В растениях, в частности, для достижения устойчивости к патогенам, шпилечная (hp) дцРНК, включая малую шпилечную РНК (кшРНК), самокомплементарную hpРНК и сплайсированную интронами hpРНК, может быть сформирована *in vivo* с использованием обратных повторяющихся последовательностей из вирусных геномов. Среди них, PTGS с наивысшей

эффективностью был вызван способом с участием самокомплементарных шпилечных РНК, разделенных интроном. Высокая устойчивость к вирусам наблюдалась у растений даже в присутствии инвертированных повторов дцРНК-индуцированного PTGS (IR-PTGS).

Между тем, для специалиста в данной области техники доступно множество различных конструкций РНКи, которые должны использоваться в качестве сайленсирующей конструкции, которая должна использоваться в соответствии с различными аспектами и вариантами осуществления настоящего изобретения (Юнис и соавт., *Int J Biol Sci.* 2014; 10(10): 1150–1158). Имеются сообщения о нескольких способах индукции РНКи, векторов РНКи, *in vitro* разрезанных и синтетических молекул. Механистически, введение коротких фрагментов двухцепочечной РНК (дцРНК) и малой или короткой интерферирующей РНК (миРНК) в цитозоль может инициировать путь, завершающийся целенаправленной деградацией специфической клеточной мРНК, то есть, мРНК-мишени транскрипта гена, подлежащего сайленсингу по настоящему изобретению. Другая молекула РНКи - это микроРНК. Несмотря на сходство по размеру (20-24 нуклеотидов), микроРНК отличаются от миРНК структурами предшественников, путями биогенеза и способами действия. Искусственные микроРНК известны специалисту в данной области техники. Как микроРНК, так и миРНК, как известно, являются важными регуляторами экспрессии генов в растениях.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, можно использовать РНКи и саморасщепляющийся молотоголовый рибозим для достижения желаемой модуляции, также на уровне ДНК (Ли З., Рана Т.М. Терапевтическое нацеливание микроРНК: текущее состояние и будущие задачи. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(8):622–638.). Эти реагенты позволяют целенаправленно контролировать экспрессию генов, способствуя удалению специфических мРНК из цитоплазмы. Молотоголовый рибозим (HNR), впервые обнаруженный в сателлитной РНК вируса кольцевой пятнистости табака, является примером молекул малой нуклеолитической РНК, способных к саморасщеплению (то есть, называются рибозимы). Другими молекулами автокаталитической (саморасщепляющегося типа) малой РНК являются твистер, сестра-твистер, пистолетный рибозим и рибозим типа топор. HNR состоят из консервативной центральной последовательности с тремя лучеобразнорасходящимися спиральными доменами. Природные HNR не являются истинными рибозимами, поскольку они способны осуществлять только одну реакцию саморасщепления. Синтетические HNR были разработаны для преодоления этого обстоятельства путем разделения HNR на два

компонента: рибозим (часть ННН, которая остается неизменной) и субстрат (последовательность-мишень, которая будет расщеплена). Другим классом модуляторов, подходящих для целей настоящего изобретения, являются рибопереклюкатели. Рибопереклюкатели представляют собой элементы РНК, которые модулируют экспрессию мРНК путем связывания лиганда, который обычно представляет собой малую органическую молекулу или ион, со своим аптамерным доменом. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, использование рибопереклюкателя может представлять интерес для модификации экспрессии CPL3 строго контролируемым образом. Между тем, специалисту в данной области техники доступны различные типы рибозимов и рибопереклюкателей, включая дезоксирибозимы и термочувствительные рибозимы (Гуха Т.К., Вай А., Хаузнер Г. Инструменты программируемого редактирования генома и их регуляция для эффективной геномной инженерии. *Comput Struct Biotechnol J*. 2017;15:146-160. Опубликовано 12 января 2017 года. doi:10.1016/j.csbj.2016.12.006).

Таким образом, сайленсирующая конструкция может представлять собой сайленсирующую конструкцию РНКи. Сайленсирующая конструкция может быть представлена как вектор для экспрессии в интересующей клетке, или сайленсирующая конструкция может быть получена *ex vivo* для добавления к интересующей клетке, материалу, ткани, органу или целому организму. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, сайленсирующая конструкция может быть функционально сцеплена с конститутивно активным промотором. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, сайленсирующая конструкция может быть функционально сцеплена с индуцибельным промотором для контроля экспрессии конструкции в зависимости от индуктора. Контролируемая экспрессия сайленсирующей конструкции может способствовать целенаправленной регуляции уровней экспрессии интересующего белка-мишени, подлежащего сайленсированию во времени (например, только во время определенной фазы развития растения) и/или пространстве (например, в определенных органах растений, тканях, клетках или конкретных компартментах/органеллах). В частности, из-за того, что последовательности-мишени, подлежащие сайленсированию, играют критическую роль в иммунитете растений, ограничение сайленсинга в зависимости от времени и пространства, и дозы может иметь значительные преимущества, позволяющие избежать серьезных негативных эффектов нокаута эффекторов иммунитета растений, таких как белки CPL, из-за их очень важных ролей в защите и развитии.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, сайленсирующая конструкция по настоящему изобретению может быть введена транзientным образом, что дополнительно гарантирует, что генетический материал не будет введен в растение или растительную клетку наследуемым образом.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, сайленсирующая конструкция или молекула РНКи не имеет существенной идентичности последовательности с другими геномными областями в геноме растительной клетки, ткани, органа, целого растения или растительного материала по настоящему изобретению, и ее следует понимать как молекулу, сконструированную *in silico* на основе информации о последовательности, которая должна быть сайленсирована в комбинации с информацией о геноме, который должен быть модифицирован, чтобы молекула РНКи не содержала длинных удлинений идентичности с другими областями в геноме, отличными от области, которая должна быть модулирована во избежание нецелевых эффектов. Обычно идентичность последовательности, которая должна быть сайленсирована, будет очень высокой, то есть, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, и в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98 % или даже выше 99%. Существенная идентичность с другими геномными областями в геноме растительной клетки, ткани, органа, целого растения или растительного материала обычно будет ниже 25 пар оснований, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, ниже 20 пар оснований, 19 пар оснований, 18 пар оснований, 17 пар оснований, 16 пар оснований и так далее, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, менее 15 пар оснований, 14 пар оснований, 13 пар оснований, 12 пар оснований, 11 пар оснований, и в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, менее 10 пар оснований непрерывных удлинений, выравнивающихся с другой областью интересующего генома.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, растение, обладающее устойчивостью к патогенам, может быть получено посредством модификации нативной регуляторной последовательности (последовательностей), при этом, модификация может быть транзientной или стабильной модификацией регуляторной последовательности, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, (i) модификация вводится посредством сайт-направленного фермента, модифицирующего ДНК, или, при этом, (ii) модифицированный сайт-направленный фермент, модифицирующий ДНК, опосредует модификацию, в предпочтительном варианте

осуществления настоящего изобретения, ингибирование, регуляторной последовательности, или, при этом, (iii) модификация вводится посредством случайного мутагенеза, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, случайный мутагенез выбран из химически-индуцированного мутагенеза или радиационно-индуцированного мутагенеза. В зависимости от растения, которое подлежит модификации, как сайт-направленный, так и случайный мутагенез, или их комбинация могут быть подходящими вариантами.

В соответствии с настоящим изобретением, по меньшей мере, один сайт-направленный фермент, модифицирующий ДНК или РНК (SDE), или последовательность, кодирующая последовательность, или комплекс, содержащий комплекс, можно использовать для модификации гена CPL3 или регуляторной последовательности гена CPL3, или последовательности РНК, кодируемой CPL3, целенаправленным образом, по меньшей мере, одним SDE или его каталитически активным фрагментом, или комплексом, содержащим SDE, или последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность. Между тем, целенаправленное редактирование генома стало мощным генетическим инструментом для изучения функции гена или для точной модификации геномов. Инструменты редактирования генома включают мегануклеазы, цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), кластеризованные регулярно чередующиеся короткие палиндромные повторы (CRISPR)-ассоциированной нуклеазы Cas9, и таргетроны (Гуха и соавт., см. выше). SDE и связанные с ними конструкции или инструменты, имеющие отношение к достижению события целенаправленного редактирования генома в данном геноме, известны специалисту в данной области техники и могут быть адаптированы к интересующей клетке-мишени. Все вышеупомянутые инструменты позволяют добиться точных генетических модификаций посредством индуцирования двухцепочечных разрывов ДНК-мишени (DSB). В зависимости от стадии клеточного цикла, а также от наличия или отсутствия матрицы для репарации с гомологичными концевыми областями, DSB затем может быть репарирован либо системой репарации нехомологичного соединения концов (NHEJ), либо посредством репарации двухцепочечного разрыва путем гомологичной рекомбинации, (HDR).

В соответствии с настоящим изобретением, по меньшей мере, один сайт-направленный фермент, модифицирующий ДНК, может, таким образом, быть выбран, по меньшей мере, из одной мегануклеазы, ZFN, TALEN, белка Аргонавта, при этом,

неограничивающие примеры белков Аргонавтов включают *Thermus thermophilus* Аргонавт (TiAgo), *Pyrococcus furiosus* Аргонавт (PfAgo), *Natronobacterium gregoryi* Аргонавт (NgAgo), их гомологи или их модифицированные версии, нуклеазы, направляемые РНК, при этом, неограничивающие примеры нуклеаз, направляемых РНК, включают CRISPR-ассоциированные нуклеазы, такие как Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известный как Csn1 и Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Cse3, Cse4, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, Cpf1, CasX, CasY, Mad7, их гомологи или их модифицированные версии и сконструированные нуклеазы, направляемые РНК (RGN), эндонуклеазы рестрикции, включая FokI или ее вариант, рекомбиназу или две сайт-специфические нуклеазы, или редактор оснований, или любой вариант, или каталитически активный фрагмент вышеупомянутых эффекторов, при этом, по меньшей мере, один сайт-направленный фермент, модифицирующий ДНК, индуцирует модификацию генома, такую как двухцепочечный разрыв ДНК (DSB) или одноцепочечный разрыв ДНК, или целенаправленный обмен нуклеотидами в сайте-мишени геномной последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, разрывы или никотинирование в последовательности ДНК-мишени репарируются естественными процессами гомологичной рекомбинации (HR) или нехомологичного соединения концов (NHEJ). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, модификации последовательностей происходят в расщепленных или никотинированных сайтах или рядом с этими сайтами, которые могут включать делеции или вставки, которые приводят к модификации последовательности нуклеиновой кислоты или интеграции экзогенных нуклеиновых кислот путем гомологичной рекомбинации или NHEJ.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, направленный на целенаправленную мутацию, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3, или направленный на модификацию регуляторной последовательности, по меньшей мере, одной последовательности, кодирующей белок CPL3, по меньшей мере, один сайт-направленный фермент, модифицирующий ДНК, представляет собой нуклеазу на основе CRISPR, при этом, нуклеаза на основе CRISPR содержит сайт-специфический домен, связывающий ДНК, при этом, по меньшей мере, одна нуклеаза на основе CRISPR или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность, выбрана из группы, содержащей (a) Cas9, включая SpCas9, SaCas9, SaKKH-Cas9, VQR-Cas9, St1Cas9, (b) Cpf1, включая

AsCpf1, LbCpf1, FnCpf1, (c) CasX, или (d) CasY, или любой вариант или производное вышеупомянутых нуклеаз на основе CRISPR, необязательно, при этом, по меньшей мере, одна нуклеаза на основе CRISPR содержит мутацию по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа, таким образом, полученная нуклеаза на основе CRISPR преобразуется в одноцепочечную специфическую ДНК-никазу или в ДНК-связывающий эффектор, не обладающий способностью расщепления всей ДНК.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения, комплекс редактирования РНК CRISPR-Cas13 может использоваться для изменения потенциала кодирования РНК программируемым образом, который позволяет осуществить целенаправленный нокдаун эндогенных транскриптов, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, транскриптов CPL3, с сопоставимыми уровнями нокдауна, как у РНКи. Кроме того, Cas13 или мертвые конструкции, содержащие Cas13, могут использоваться для обмена основания РНК, а не только для достижения транзистентного нокдауна. Кроме того, доступны платформы для редактирования РНК, содержащие как нокдаун РНК, так и инструмент для редактирования РНК (Кокс и соавт., Science. 2017, ноябрь 24; 358(6366):1019-1027). Как сообщалось выше о конструкциях РНКи, модуляция на уровне РНК может позволить осуществление временно контролируемой модуляции уровней экспрессии и может иметь преимущества перед созданием нокаутов, в частности, из-за того, что CPL3 и гомологи CPL3 представляют центральные молекулы в иммунитете растений, так что полный нокаут или неконтролируемая модуляция могут привести к нежелательным побочным эффектам или даже к гибели клеток.

Другим классом инструментов редактирования генома, подходящих для различных вариантов настоящего изобретения, являются редакторы оснований.

Редакторы оснований, включая BE (редакторы оснований, опосредующие конверсию C в T) и ABE (редакторы основания аденина, опосредующие конверсию A в G) являются мощными инструментами введения непосредственных и программируемых мутаций всех четырех транзиций в ДНК без необходимости двухцепочечного расщепления (Комор и соавт., Nature, 2016, 533(7603), 420-424; Гауделли и соавт., Nature, 2017, 551, 464-471). Как правило, редакторы оснований состоят, по меньшей мере, из модуля нацеливания на ДНК и каталитического домена, который дезаминирует цитидин или аденин. Существуют три версии BE, описанные в работе Комор и соавт., 2016 (см. выше), а именно

BE1, BE2 и BE3, причем, BE3 демонстрирует наивысшую эффективность целенаправленной конверсии С в Т, что приводит до 37% желаемой конверсии С в Т в клетках человека. BE3 состоит из APOBEC-XTEN-dCas9(A840H)-UGI, при этом, APOBEC1 представляет собой цитидиндезаминазу, XTEN представляет собой линкер с 16 остатками, dCas9(A840H) представляет собой версию нуклеазы Cas9, которая имеет неотредактированную цепь, а UGI представляет собой ингибитор урацил-ДНК-гликозилазы. В этой системе комплекс BE направлен на ДНК-мишень посредством sgРНК, где цитозин затем конвертируется в урацил путем дезаминирования цитозина. UGI ингибирует функцию клеточной урацил-ДНК-гликозилазы, которая катализирует удаление урацила из ДНК и инициирует эксцизионную репарацию основания ДНК (BER). Наличие неотредактированной цепи ДНК помогает устранить ошибочное спаривание U:G в желаемых продуктах U:A и T:A.

ABE были впервые разработаны Гауделли и соавт., 2017 (см. выше) для конверсии А-Т в G-C. Аденозиндезаминаза транспортной РНК была разработана для работы с ДНК, которая катализирует дезаминирование аденозина с получением инозина, который считывается и реплицируется полимеразой как G. Путем слияния выделенной адениндезаминазы и модуля Cas9, ABE, описанные в работе Гауделли и соавт., 2017 (см. выше), показали эффективность составляющую, примерно, 50% при целенаправленной конверсии А в G.

Все четыре транзиции ДНК (А-Т в G-C и C-G в T-A) возможны до тех пор, пока редакторы оснований могут быть направлены в место цели. Редакторы оснований конвертируют С или А в нецеленаправленной цепи sgРНК.

В соответствии с настоящим изобретением, BE может быть специфически оптимизирован для использования в системе растительных клеток, включая использование кодон-оптимизированных последовательностей для интересующего растения или растительной клетки, и дополнительно включая использование специфических промоторов для растения, например, промотора убиквитина, в случае, если конструкция предложена в виде кассеты экспрессии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в соответствии с его разными аспектами, аспект модулирования нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный фосфатазоподобный белок 3 (CPL3) с С-концевым доменом, или его регуляторную последовательность, может быть достигнут методом специфического комбинирования транзистентной и стабильной модуляции, то есть, путем комбинирования

любой водимой в качестве альтернативы (i) по меньшей мере, одной мутации нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, по меньшей мере, одна мутация имеет доминантно-отрицательный эффект, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, по меньшей мере, одна мутация вызывает изменение аминокислотной последовательности консервативного каталитического домена белка CPL3, содержащего мотив DXDXT/V; и/или вводимой в качестве альтернативы, (ii) по меньшей мере, одной сайленсирующей конструкции, направленной, по меньшей мере, на одну эндогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок CPL3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, направленной на все эндогенные нуклеотидные последовательности, кодирующие белок CPL3; и/или вводимой в качестве альтернативы (iii) модификации нативной регуляторной последовательности, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный белок CPL3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, всех нативных регуляторных последовательностей нуклеотидных последовательностей, кодирующих эндогенный белок CPL3, при этом, модификация вызывает снижение скорости экспрессии, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный белок CPL3.

Например, в одном варианте осуществления настоящего изобретения, один аллель CPL3, или его регуляторная последовательность, или его транскрипт РНК, в полиплоидном растении может быть подвергнут стабильной мутации, при этом, другой аллель CPL3 или его регуляторная последовательность может быть транзистентно модифицирована сайленсирующей конструкцией по настоящему изобретению. В зависимости от общего количества различных аллелей CPL3, присутствующих в идиопазме, эта стратегия может предложить наилучший эффект дозы для достижения оптимальной устойчивости к патогенам при сохранении нормальных характеристик роста и развития растений, опосредованных аллелями CPL3 или их кодируемыми белками и соответствующими регуляторными последовательностями.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, на различные аллели CPL3 или их регуляторные последовательности, или их транскрипт РНК может быть нацелен один и тот же из вышеописанных альтернативных элементов (i)-(iii), в зависимости от растения и их генотипа CPL3, подлежащего модификации.

Следовательно, любой из вышеперечисленных альтернативных элементов (i)-(iii) может использоваться отдельно или в комбинации, либо одновременно, либо впоследствии, при этом, впоследствии он может включать последующее введение в одно и то же растение или растительную клетку, но он также может включать последующие использование в других поколениях растения или растительной клетки. Например, первая модуляция может быть достигнута в первом растении или растительной клетке. Далее, может быть получено потомство указанного растения или растительной клетки, и последующее введение в соответствии с любым из вышеуказанных альтернативных элементов (i)-(iii) затем может представлять собой введение в потомство растения или растительной клетки.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, могут использоваться молекулы слияния, содержащие, по меньшей мере, один инструмент модуляции в соответствии с альтернативными элементами (i)-(iii).

Для определенных применений могут быть предпочтительными транзистентные и/или нетрансгенные способы и способы введения различных конструкций по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в соответствии с различным его аспектам, модификация или мутация могут быть выполнены посредством олигонуклеотид-направленного мутагенеза (ODM), химического мутагенеза, например, TILLING, например, посредством применения эффективного количества мутагенного агента, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, этилметансульфоната, N-этил-N-нитрозомочевины или посредством облучения.

TILLING, изначально используемый как инструмент функциональной геномики в моделях растений, распространили на многие виды растений, и он приобрел первостепенное значение для обратной генетики видов сельскохозяйственных растений. Недавно важным изменением в TILLING стало применение секвенирования следующего поколения (NGS) к процессу, что позволяет мультиплексировать генные мишени и геномы. NGS в конечном итоге приведет к тому, что TILLING станет процедурой *in silico*. Поскольку его легко применить к большинству растений, он остается доминирующим нетрансгенным способом получения мутаций в известных генах и, таким образом, представляет собой легко доступный способ для нетрансгенных подходов в соответствии со способами по настоящему изобретению. Как известно специалистам в данной области техники, TILLING обычно содержит химический мутагенез, например, с использованием

этилметансульфоната (EMS), N-этил-N-нитрозомочевины, или модификацию интересующего генома, индуцированную УФ-светом, вместе с чувствительным к скринингу ДНК методу, который идентифицирует одноосновные мутации в гене-мишени или его регуляторной последовательности. Таким образом, специалист в данной области техники может определить эффективное количество мутагенного агента для получения достаточного количества мутагенных событий при сохранении геномной целостности для данного интересующего генома растения.

И SSN, и мутагенез ODM, оба являются подходящими методами для точной геномной инженерии в растительных клетках, а также они подходят для индукции модификации или мутации в соответствии с различными аспектами настоящего изобретения. Как известно специалисту в данной области техники, ODM предлагает быструю, точную и нетрансгенную альтернативу селекции для улучшения признаков в сельскохозяйственных растениях, чтобы удовлетворить эту насущную потребность. ODM представляет собой технологию точного редактирования генома, в которой олигонуклеотиды используются для целенаправленного редактирования плазмидной, эписомальной и хромосомной ДНК у систем бактерий, грибов, млекопитающих и растений.

В соответствии с другим аспектом, могут быть получены клетка, ткань, орган, семя или материал растения в соответствии с различными аспектами и вариантами осуществления настоящего изобретения, раскрытыми в настоящем документе, или их можно использовать в качестве отправной точки для получения устойчивого к патогенам растения, клетки, ткани, органа, семена или материала растения.

Во втором аспекте, представлена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую фосфатазоподобный белок 3 (CPL3) с С-концевым доменом, при этом, нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из: (a) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2-10, или ее гомологичной, ортологичной или паралогичной последовательности; (b) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с одной из нуклеотидных последовательностей, определенных в (a), или (c) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11-19; (d)

нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-19, или (е) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с нуклеотидной последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности, как определено в (а)-(d), при жестких условиях, при этом, нуклеотидная последовательность содержит, по меньшей мере, одну мутацию, способную придавать или повышать устойчивость к патогену в растении, в котором экспрессируется молекула нуклеиновой кислоты, в предпочтительном варианте, при этом, патоген может представлять собой гемибиотрофный грибок, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, патоген представляет собой гемибиотрофный грибок, выбранный из группы, состоящей из: *Zymoseptoria tritici*, *Setosphaeria turcica*, *Fusarium spp.* *Fusarium graminearum*, *Colletotrichum spp.*, такого как *Colletotrichum graminicola*, *Magnaporthe grisea*, *Magnaporthe oryzae*, *Phytophthora infestans*, или, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, патоген может представлять собой грибок, выбранный из *Cercospora spp.*, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, *Cercospora beticola* или *Cercospora zea-mayidis*, который может быть использован для получения устойчивого к патогенам растения, клетки, ткани, органа, семян или материала растения.

Cercospora является причиной болезни пятнистостью листьев у различных растений, но она также вызывает болезнь: люцерны, спаржи, банана, капусты, *Cannabis*, моркови, сельдерея, злаков, кофе, огурцов, инжира, герани, винограда, трав, лещины, хмеля, чечевицы, салата, манго, просо, орхидей, папайи, арахиса, груши, гороха, перца, картофеля, роз, сорго, сои, шпината, клубники, сахарной свеклы, сахарного тростника (пятна сливаются в полосы; поэтому болезнь называется «черная полосатость»), платана, табака, арбуза и многих диких и декоративных растений и, таким образом, представляет собой соответствующий патогенный грибок.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, мутация может представлять собой мутацию нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, мутацию, имеющую доминантно-отрицательный эффект, в предпочтительном при этом, мутация вызывает изменение аминокислотной последовательности консервативного

каталитического домена белка CPL3, содержащего мотив DXDXT/V, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, мутацию нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3, вызывающая замену Asp на Ala в положении 928, представленном в SEQ ID NO: 19, в положении 944, представленном в SEQ ID NO: 14, в положении 949, представленном в SEQ ID NO: 11, в положении 944, представленном в SEQ ID NO: 14, в положении 949, представленном в SEQ ID NO: 11, в положении 953, представленном в SEQ ID NO: 12, в положении 910, представленном в SEQ ID NO: 13, в положении 890, представленном в SEQ ID NO: 18, в положении 938, представленном в SEQ ID NO: 15, в положении 929, представленном в SEQ ID NO: 16, в положении 938, представленном в SEQ ID NO: 17.

В соответствии со вторым и всеми другими аспектам настоящего изобретения, по меньшей мере, одна одинаковая, или, по меньшей мере, одна другая мутация могут быть осуществлены, в зависимости от количества и природы аллелей CPL3, присутствующих в геноме интересующего растения-мишени. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, может потребоваться более одной мутации для получения фенотипа с оптимальной устойчивостью к патогенам без побочных эффектов, таких как, например, задержка роста растений.

В другом аспекте, способ генерирования растения, обладающего устойчивостью к патогенам, или его растительной клетки, ткани, органа, семени или растительного материала, может быть использован на основании вышеуказанных результатов в отношении модуляции CPL3 и его эффектов в отношении устойчивости к патогенам, при этом, способ может содержать этапы: (i) предложение, по меньшей мере, одной сайленсирующей конструкции в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, раскрытыми в первом аспекте, или, по меньшей мере, одной последовательности, кодирующей последовательность; (ii) модификация растительной клетки, ткани, органа, растения, семени или растительного материала посредством введения, по меньшей мере, одной сайленсирующей конструкции или последовательности, кодирующей последовательность из (i), в геном указанной растительной клетки, ткани, органа, растения, семени или растительного материала; и (iii) получение модифицированной растительной клетки, ткани, органа, растения, семени или растительного материала, (iv) необязательно, регенерация растения из растительной клетки, ткани, органа или растительного материала или выращивание семени из растения, полученного в (iii), при этом, растительная клетка, ткань, орган, растение, семя или

растительный материал, полученный в (iii), растение, регенерированное в (iv), или семя, выращенное в (iv), может содержать введенную, по меньшей мере, одну сайленсирующую конструкцию или последовательность, кодирующую последовательность, и, таким образом, обладать устойчивостью к патогенам.

В другом аспекте, способ генерирования растения, обладающего устойчивостью к патогенам, или его растительной клетки, ткани, органа, семени или растительного материала, может содержать этапы: (i) предложение, по меньшей мере, одного сайт-направленного фермента, модифицирующего ДНК, или последовательности, кодирующей последовательность, и, необязательно, по меньшей мере, одной матрицы для репарации ДНК, при этом, по меньшей мере, один сайт-направленный фермент, модифицирующий ДНК, и, необязательно, по меньшей мере, одна матрица для репарации ДНК: (a) может быть направлена или нацелена на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок CPL3, как определено выше в первом аспекте; или (b) может быть направлена или нацелена на регуляторную последовательность, по меньшей мере, одного белка CPL3, кодирующего нуклеотидную последовательность, как определено выше в первом аспекте; (ii) введение, по меньшей мере, одного сайт-направленного фермента, модифицирующего ДНК, или последовательности, кодирующей последовательность, и, необязательно, по меньшей мере, одной матрицы для репарации ДНК в растительную клетку, ткань, орган, растение или растительный материал; (iii) мутация или модификация нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3 или его регуляторную последовательность, в геноме растительной клетки, ткани, органа, растения или растительного материала и получение мутантной или модифицированной популяции растительных клеток, тканей, органов, растений или растительных материалов; (iv) необязательно: скрининг популяции на предмет наличия доминантно-отрицательной мутации, тем самым придавая или повышая устойчивость к патогенам, или скрининг популяции на предмет наличия мутации или модификации в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3 или его регуляторную последовательность; (v) идентификация и, тем самым, получение растительной клетки, ткани, органа, растения или растительного материала, обладающего устойчивостью к патогенам.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, можно использовать функциональный фрагмент или усеченную, или модифицированную версию сайт-направленного фермента, модифицирующего ДНК, или последовательность, кодирующую последовательность.

Мутантная или модифицированная популяция растительных клеток подразумевает, что, по меньшей мере, одна клетка в популяции содержит целенаправленную мутацию или модификацию, при этом, разные клетки в популяции могут содержать разный набор мутаций или модификаций в своих соответствующих геномах. Специалист в данной области техники может легко идентифицировать мутации или модификации, полученные различными способами, раскрытыми в настоящем документе, с использованием обычных методов, таких как ПЦР и так далее.

В еще одном дополнительном аспекте, способ генерирования растения, обладающего устойчивостью к патогенам, или его растительной клетки, ткани, органа, семян или растительного материала, может содержать подход TILLING и, таким образом, может содержать этапы: (i) воздействие на растительную клетку, ткань, орган, растение или растительный материал, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, на семена растения, эффективным количеством мутагенного агента, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, этилметансульфонатом, N-этил-N-нитрозомочевинной или облучением, (ii) получение мутагенизированной популяции растительных клеток, тканей, органов, растений или растительных материалов, необязательно, путем выращивания растений из мутагенизированной популяции; (iii) скрининг мутагенизированной популяции на предмет наличия устойчивости к патогенам, необязательно, путем выделения и анализа геномной ДНК из растений, обладающих устойчивостью к патогенам; (iv) идентификация и получение модифицированной растительной клетки, ткани, органа, растения или растительного материала, обладающих устойчивостью к патогенам.

В еще одном аспекте, способ генерирования растения, обладающего устойчивостью к патогенам, или его растительной клетки, ткани, органа, семени или растительного материала, может содержать этапы: (i) трансформации, по меньшей мере, одной растительной клетки, по меньшей мере, одной молекулой нуклеиновой кислоты, в соответствии со вторым аспекте настоящего изобретения; и (ii) регенерации и, таким образом, получения растительной клетки, ткани, органа, растения или растительного материала, обладающего устойчивостью к патогенам.

В зависимости от патогена и интересующего растения, специалист в данной области техники может подобрать подходящие анализы, чтобы определить, подходит ли модуляция по настоящему изобретению для повышения устойчивости к патогену.

Любой скрининг в соответствии с различными аспектами и вариантами осуществления настоящего изобретения, раскрытым в настоящем документе, может, например, проводиться средствами молекулярной биологии, например, с использованием метода ПЦР, или с использованием зонда, или посредством фенотипического скрининга, например, с использованием видимого и прослеживаемого маркера.

В другом аспекте, молекула нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом, или сайленсирующая конструкция, как определено в первом аспекте, или модификация нативной регуляторной последовательности, может использоваться, отдельно или в комбинации, для генерации растительной клетки, ткани, органа, целого растения или растительного материала, обладающего устойчивостью к патогенам, или для придания или повышения устойчивости к патогенам в растении, растительной клетке, ткани, органе, целом растении или растительном материале.

В еще одном аспекте, может быть предложен способ повышения устойчивости к патогенам, или способ придания устойчивости к патогенам, растению, растительной клетке, ткани, органу или материалу, при этом, способ может содержать модуляцию нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный фосфатазоподобный белок 3 (CPL3) с С-концевым доменом или его регуляторную последовательность, или модуляцию транскрипции эндогенного белка CPL3, при этом, модуляция достигается посредством, (i) по меньшей мере, одной мутации нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, по меньшей мере, одна мутация имеет доминантно-отрицательный эффект, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, по меньшей мере, одна мутация вызывает изменение аминокислотной последовательности консервативного каталитического домена белка CPL3, содержащего мотив DXDXT/V; и/или, (ii) по меньшей мере, одной сайленсирующей конструкции, направленной, по меньшей мере, на одну эндогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок CPL3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, направленной на все эндогенные нуклеотидные последовательности, кодирующие белок CPL3; и/или (iii) модификации нативной регуляторной последовательности, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный белок CPL3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, всех нуклеотидных последовательностей, кодирующих эндогенный белок CPL3, при этом, модификация вызывает снижение скорости экспрессии, по меньшей мере, одной нуклеотидной

последовательности, кодирующей эндогенный белок CPL3. Таким образом, вышеуказанный аспект охватывает три различных режима (i)-(iii) для целенаправленной модуляции, которые могут использоваться отдельно или в комбинации для получения растения, устойчивого к патогенам. В соответствии с этим аспектом, любой из альтернативных режимов модуляции, указанных в (i)-(iii), может использоваться отдельно или в комбинации для достижения повышенной устойчивости к патогенам, или для достижения устойчивости к патогенам у неустойчивого растения.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, может оказаться подходящим комбинировать различные транзистентные и/или стабильные режимы модуляции для получения максимального повышения устойчивости к патогенам, не оказывающего отрицательного влияния на нормальный рост и развитие растения, что может зависеть от общего количества аллелей CPL3, присутствующих в данном интересующем растении или растительной клетке.

В еще одном дополнительном аспекте, результаты вышеупомянутых аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения могут быть выгодно использованы для способа идентификации устойчивого к патогену растения, растительной клетки, ткани, органа или материала. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, конкретные мутации или модификации по настоящему изобретению могут быть использованы для генерирования мутантной или модифицированной популяции растения, растительной клетки, ткани, органа или материала, или для идентификации дополнительных мутаций в соответствующем гене CPL3 или его регуляторной последовательности на основе раскрытой в настоящем документе последовательности-мишени CPL3 и ее значения для устойчивости к патогенам ряда основных сельскохозяйственных растений. В частности, мутации в последовательности, гомологичной генам/аллелям CPL3, или в регуляторных последовательностях, как раскрыто и идентифицировано в настоящем документе, могут быть идентифицированы на основе знания соответствующих мутаций и их значения для устойчивости растения к патогенам. Например, сопоставимые консенсусные последовательности в гомологичных генах CPL3 могут быть идентифицированы для идентификации и, таким образом, предложения дополнительных кандидатов, участвующих в модуляции, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в повышении, устойчивости к патогенам генома растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, генома основного культурного растения.

биомолекул в растение или растительную клетку, ткань, орган или растительный материал хорошо известны в данной области техники.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, система биологических векторов в контексте VIGS для трансформации на основе *Agrobacterium* может включать, но этим не ограничивается, например, Вирус полосы кукурузы (MSV), Вирус ложной штриховатости ячменя (BSMV), Вирус мозаики костра (BMV; учетные номера: РНК1: X58456; РНК2: X58457; РНК3: X58458), Вирус штриховатости кукурузы (MSpV), Вирус кукурузы райадо фино (MYDV), Вирус желтой карликовости кукурузы (MYDV), Вирус карликовой мозаики кукурузы (MDMV), как более подробно описано ниже в Примере 1.

Другие векторные системы, подходящие для настоящего изобретения, обычно могут быть выбраны из вирусов с положительной цепью РНК семейства *Benyviridae*, например, *Вирус некротической желтой прожилковатой свеклы* (учетные номера: РНК1: NC_003514; РНК2: NC_003515; РНК3: NC_003516; РНК4: NC_003517) или семейства *Bromoviridae*, например, вирусы рода *Вируса мозаики люцерны* (учетные номера: РНК1: NC_001495; РНК2: NC_002024; РНК3: NC_002025) или рода *Bromovirus*, например, BMV (см. выше), или рода *Cuscutavirus*, например, *Вирус огуречной мозаики* (учетные номера: РНК1: NC_002034; РНК2: NC_002035; РНК3: NC_001440) или рода *Oleavirus*, вирусы dsДНК семейства *Caulimoviridae*, в частности, семейства *Badnavirus* или *Caulimovirus*, например, различные Вирусы *полосатости банана* (например, учетные номера: NC_007002, NC_015507, NC_006955 или NC_003381) или *Вирус мозаики цветной капусты* (учетный номер: NC_001497), или вирусы рода *Cavemovirus*, *Petuvirus*, *Rosadnavirus*, *Solendovirus*, *Soymovirus* или *Tungrovirus*, вирусы с положительной цепью РНК семейства *Closteroviridae*, например, рода *Ampelovirus*, *Crinivirus*, например, *Вирус инфекционной желтухи латука* (учетные номера: РНК1: NC_003617; РНК2: NC_003618) или *Вирус хлороза томата* (учетные номера: РНК1: NC_007340; РНК2: NC_007341), *Closterovirus*, например, *Вирус желтухи свеклы* (учетный номер: NC_001598), или *Velarivirus*, вирусы с одноцепочечной ДНК (+/-) семейства *Geminiviridae*, например, вирусы семейства *Becurtovirus*, *Begomovirus*, например, *Вирус золотисто-желтой мозаики бобов*, *Вирус курчавости побегов табака*, *Вирус курчавости крапчатых листьев табака*, *Вирус хлоротической крапчатости томата*, *Вирус карликовости листьев томата*, *Вирус золотистой мозаики томата*, *Вирус курчавости листьев томата*, *Вирус крапчатости томата*, или *Вирус желтой пятнистости томата*, или *Geminiviridae* рода *Curtovirus*,

например, *Вирус курчавости верхушки свеклы*, или *Geminiviridae* рода *Torovirus*, *Turncurtvirus* или *Mastrevirus*, например, *Вирус полосатости кукурузы* (см. выше), *Вирус желтой карликовости табака*, *Вирус карликовости пшеницы*, вирусы с положительной цепью РНК семейства *Luteoviridae*, например, рода *Luteovirus*, например, *Вирус желтой карликовости ячменя PAV* (учетный номер: NC_004750), или рода *Polerovirus*, например, *Вирус скручивания листьев картофеля* (учетный номер: NC_001747), вирусы с одноцепочечной ДНК семейства *Nanoviridae*, содержащие род *Nanovirus* или *Babuvirus*, вирусы с двухцепочечной РНК семейства *Partiviridae*, содержащие, среди прочего, семейства *Alphapartitivirus*, *Betapartitivirus* или *Deltapartitivirus*, вирионы семейства *Pospiviroidae*, вирусы с положительной цепью РНК семейства *Potyviridae*, например, содержащие род *Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Machluravirus*, *Poacevirus*, например, *Вирус мозаики пшеницы* (учетный номер: NC_012799) или *Potyviridae* рода *Potyvirus*, например, *Вирус мозаики свеклы* (учетный номер: NC_005304), *Вирус карликовой мозаики кукурузы* (учетный номер: NC_003377), *Вирус Y картофеля* (учетный номер: NC_001616), или *Вирус мозаики мауса* (учетный номер: NC_018833), или *Potyviridae* рода *Tritimovirus*, например, *Вирус полосатой мозаики костра* (учетный номер: NC_003501) или *Вирус полосатой мозаики пшеницы* (учетный номер: NC_001886), вирусы с одноцепочечной РНК семейства *Pseudoviridae*, например, рода *Pseudovirus*, или *Sirevirus*, вирусы с двухцепочечной РНК семейства *Reoviridae*, например, *Вирус карликовости риса* (учетные номера: РНК1: NC_003773; РНК2: NC_003774; РНК3: NC_003772; РНК4: NC_003761; РНК5: NC_003762; РНК6: NC_003763; РНК7: NC_003760; РНК8: NC_003764; РНК9: NC_003765; РНК10: NC_003766; РНК11: NC_003767; РНК12: NC_003768), вирусы с положительной цепью РНК семейства *Tombusviridae*, например, содержащие род *Alphanecrovirus*, *Aureusvirus*, *Betanecrovirus*, *Carmovirus*, *Dianthovirus*, *Gallantivirus*, *Macanavirus*, *Machlomovirus*, *Panicovirus*, *Tombusvirus*, *Umbravirus* отряда *Zeavirus*, например, *Вирус некротической полосатости мауса* (учетный номер: NC_007729), или вирусы с положительной цепью РНК семейства *Virgaviridae*, например, вирусы рода *Furovirus*, *Hordeivirus*, например, *Вирус ложной штриховатости ячменя* (учетные номера: РНК1: NC_003469; РНК2: NC_003481; РНК3: NC_003478), или рода *Pechivirus*, *Pomovirus*, *Tobamovirus*, или *Tobravirus*, например, *Вирус погрязковости табака* (учетные номера: РНК1: NC_003805; РНК2: NC_003811), а также вирусы с отрицательной цепью РНК отряда *Mononegavirales*, в частности, семейства *Rhabdoviridae*, например, *Вирус желтой ложной штриховатости ячменя* (учетный номер: KM213865) или *Вирус некротической желтухи*

латука (учетный номер/образец: NC_007642/ AJ867584), вирусы с положительной цепью РНК отряда *Picornavirales*, в частности, семейства *Secoviridae*, например, рода *Comovirus*, *Fabavirus*, *Nepovirus*, *Cheravirus*, *Sadwavirus*, *Sequivirus*, *Torradovirus* или *Waikavirus*, вирусы с положительной цепью РНК отряда *Tymovirales*, в частности, семейства *Alphaflexiviridae*, например, вирусы рода *Allexivirus*, *Lolavirus*, *Mandarivirus* или *Potexvirus*, *Tymovirales*, в частности, семейства *Betaflexiviridae*, например, вирусы рода *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Citrivirus*, *Foveavirus*, *Tepovirus*, или *Vitivirus*, вирусы с положительной цепью РНК отряда *Tymovirales*, в частности, семейства *Tymoviridae*, например, вирусы отряда *Maculavirus*, *Marafivirus* или *Tymovirus*.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, могут быть выбраны физические средства введения, например, бомбардировка частицами. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, можно использовать химические средства введения, например, трансфекционный агент. Любая комбинация биологических, физических и химических средств введения может быть использована в зависимости от биомолекулы (биомолекул) или конструкций, подлежащих введению, и в зависимости от растительной клетки или растения, которое подлежит модификации. В частности, следует принимать во внимание стабильность биомолекулы, подлежащей введению (например, РНК), а также компартмент, на который необходимо нацелиться, или эффект, который должен быть достигнут (например, системное распространение, которое должно быть достигнуто, например, посредством вирусного вектора).

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, способы настоящего изобретения, отдельно или в комбинации, могут, таким образом, быть использованы для конструирования или отбора растительных клеток, тканей, органов, материалов или целых растений с повышенной устойчивостью к патогенам, в частности, у растений кукурузы, сорго, пшеницы, сахарной свеклы, сои и картофеля. Техническое применение идей настоящего изобретения, разъяснение роли центрального игрока в иммунитете растений CPL3, не ограничиваются грибковыми заболеваниями, их также можно использовать для развития устойчивости к насекомым, бактериям, нематодам и/или вирусам у основных сельскохозяйственных растений в связи с тем, что сигнальные пути, ведущие к устойчивости к патогенам, как описано в настоящем документе, также актуальны для множества патогенов растений, в частности, включая патогенные или паразитические грибы.

В дополнительном аспекте, предложен способ идентификации растения, обладающего устойчивостью к патогенам, или его растительной клетки, ткани, органа, семени или растительного материала, содержащий этапы: (i) выделение ДНК из, по меньшей мере, одной клетки растения или его ткани, органа, семени или растительного материала, и (ii) определение, по меньшей мере, одной молекулы нуклеиновой кислоты, как определено во втором аспекте выше, и, необязательно, (iii) выбор растения, содержащего, по меньшей мере, одну молекулу нуклеиновой кислоты, как определено во втором аспекте выше, на основании определения, произведенного на этапе (ii), и, необязательно, (iv) размножение потомства, обладающего устойчивостью к патогенам, путем скрещивания растения, выбранного на этапе (iii), с другим растением, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, того же вида, и, таким образом, введение, по меньшей мере, одной молекулы нуклеиновой кислоты, определенной на этапе (ii), в геном потомства.

Настоящее изобретение далее будет проиллюстрировано на следующих примерах, которые не должны истолковываться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1А: Снижение регуляции CPL3 в пшенице приводит к повышенной устойчивости к гемибактериальному патогенному грибу *Zymoseptoria tritici*

Специально были разработаны две сайленсирующие конструкции, нацеленные на все три гомолога TaCPL3 для экспериментов по сайленсингу генов, индуцированному вирусом (VIGS), в пшенице (SEQ ID NO: 21 и 22). Две сайленсирующие конструкции TaCPL3_fragA и TaCPL3_fragB были специально разработаны для обеспечения высокой гомологии (> 95% идентичность) для всех трех гомологов TaCPL3 одновременно. В то же время были предприняты особые усилия, чтобы избежать больших удлинений гомологии с другими кодирующими областями в геноме пшеницы, чтобы избежать нежелательных нецелевых эффектов. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в другой области в геноме должно присутствовать не более 20 пар оснований непрерывной идентичности, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, должно присутствовать как можно меньше идентичности в любой нецелевой области.

Для экспериментов по VIGS использовался протокол, описанный в работе Юань и соавт. (2011, Plos One, 6(10), e26468). Векторные системы, подходящие для трансформации

на основе *Agrobacterium*, подходящие для целей настоящего изобретения, хорошо известны в данной области техники и включают, но этим не ограничиваются, например, MSV, BSMV, BMV, MSpV, MYDV, MYDV или MDMV.

После трансформации *Nicotiana benthamiana* вирусными векторами, кодирующими сайленсирующие конструкции, листья пшеницы сорта Taifun впоследствии трансфицировали соком, экстрагированным из трансформированных листьев *Nicotiana benthamiana*. Через 14 дней после трансфекции различными вирусными конструкциями, кодирующими последовательности-мишени против TaCPL3-A (SEQ ID NO: 5), TaCPL3-B (SEQ ID NO: 6) и TaCPL3-D (SEQ ID NO: 7), растения пшеницы заражали суспензией спор *Zymoseptoria tritici* (Милльярд и соавт., 2016. Убиквитин-конъюгирующий фермент, TaU4 регулирует защиту пшеницы от фитопатогена *Zymoseptoria tritici*. *Scientific reports*, 6, 35683.). Растения держали под пластиковыми колпаками в течение 4 дней для повышения влажности и создания оптимальных условий заражения септориозом. Через 23 дня после заражения, отделяли 2 инфицированных листа на растение и инкубировали на чашках с агаром. В этих условиях с высокой влажностью на листьях образуются пикниды, которые подсчитывали на площади 2 см на лист через 10 дней после переноса на чашки с агаром. Кроме того, споры с пяти листьев смывали 10 мл воды и подсчитывали споры с помощью гемоцитометра. По сравнению с растениями пшеницы, которые были имитационно инокулированы, необработаны или заражены посредством контроля пустого вектора, растения пшеницы, зараженные CPL3-сайленсирующими конструкциями, показали значительное снижение пикнид и количества спор (**Фигура 3**).

Данные демонстрируют, что сайленсинг всех трех гомологов CPL3 в пшенице приводит к повышенной устойчивости к гемиботрофному патогенному грибу *Zymoseptoria tritici*.

Пример 1В: Снижение регуляции CPL3 в пшенице приводит к повышенной устойчивости к патогенному грибу *Fusarium graminearum*

Две сайленсирующие конструкции, нацеленные на все три гомолога TaCPL3 для экспериментов по сайленсингу генов, индуцированному вирусом (VIGS), в пшенице (SEQ ID NO: 21 и 22), были испытаны на повышение устойчивости пшеницы к *Fusarium graminearum*. Эксперименты по инокуляции VIGS с двумя сайленсирующими конструкциями TaCPL3_fragA и TaCPL3_fragB были проведены, как описано для Примера 1А.

После появления колосьев пшеницы, два колоска в середине каждого колоса инокулировали 25 мкл/ 25000 спор *Fusarium graminearum*. Через 10, 14 и 21 день после инокуляции измеряли обесцвечивание колосьев посредством *F. graminearum* (Таблица 8; Фигура 7).

Таблица 8: VIGS-опосредованный сайленсинг генов CPL3A и CPL3B посредством BSMV привел к уменьшению симптомов парши колосьев у инфицированных *Fusarium graminearum* колосьев пшеницы сорта Taifun.

Симптомы фузариоза колоса	Пустой вектор (%)	Контроль сайленсинга (%)	Необработанные (%)	CPL3A (%)	CPL3B (%)
10 дней, прошедших после заражения					
14 дней, прошедших после заражения	30,6 ± 15,9	41 ± 21,4	52 ± 27,7	20 ± 4,1	20,6 ± 5,8
21 день, прошедший после заражения	71,3 ± 25,9	75 ± 25,6	93 ± 15,7	23,8 ± 4,8	47,8 ± 23,6

По сравнению с растениями пшеницы, которые были заражены пустым вектором и контролем сайленсинга, или они не были заражены вирусом (необработаны), растения пшеницы, зараженные CPL3-сайленсирующими конструкциями, показали значительное снижение симптомов (Фигура 8).

Данные демонстрируют, что сайленсинг всех трех гомологов CPL3 в пшенице повышает устойчивость к фузариозу колоса.

Пример 2: Снижение регуляции CPL3 в кукурузе приводит к повышенной устойчивости к *Setosphaeria turcica*

Для испытания эффекта снижения регуляции CPL3 на предмет устойчивости к патогенам у соответствующего сельскохозяйственного растения *Zea mays*, была разработана сайленсирующая конструкция РНКи против ZmCPL3 (Фигура 4 и SEQ ID NO: 24), а также были стабильно трансформированы растения кукурузы генотипа A188. Сайленсирующая последовательность ZmCPL3 (SEQ ID NO: 23) была специально выбрана для того, чтобы иметь идеальную гомологию с геном ZmCPL3 и в то же время, чтобы избежать больших удлинений гомологии (< 20 пар оснований) с другими

последовательностями в геноме кукурузы. Трансгенные растения кукурузы сегрегирующего поколения T1, а также гомозиготные линии T2 вместе с соответствующими незиготическими родственными линиями (нулевые сегреганты) испытывали на устойчивость к *Setosphaeria turcica* (Северный гельминтоспориоз листьев кукурузы - NCLB) в теплице.

Эксперименты показали, что две независимые трансгенные линии, экспрессирующие ZmCPL3-сайленсирующую конструкцию, были более устойчивы к NCLB, чем соответствующие нулевые сегреганты или генотип трансформации A188 (Фигуры 5 и 6). В тех же экспериментах измеряли высоту растения и ширину полностью появившегося незадолго до заражения четвертого листа, чтобы определить, влияет ли снижение регуляции ZmCPL3 на рост растения. Результаты показали, что не было разницы в росте растений между трансгенными растениями РНКи ZmCPL3 и соответствующими нулевыми сегрегантами (Фигура 5). Этот результат не обязательно было ожидаемым, поскольку влияние на центральный иммунный эффектор растения CPL3 (в нокауте), как сообщалось, было связано со снижением роста и развития. Таким образом, авторы изобретения также проанализировали экспрессию ZmCPL3 в трансгенной линии с помощью qRT-ПЦР (количественная ПЦР с детекцией в реальном времени) и смогли подтвердить, что экспрессия ZmCPL3 была снижена специально разработанными сайленсирующими конструкциями.

Эти результаты подтверждают, что снижение регуляции ZmCPL3 приводит к повышенной устойчивости к гемибактериальным грибам, и что снижение регуляции ZmCPL3 не вызывает задержки роста.

Пример 2В: Целенаправленный нокаут гена CPL3 кукурузы

Последовательность Zm-CPL3, A188v1_046614, использовали для нокаута гена путем редактирования генома CRISPR. В этом случае искали активный сайт-мишень в спрогнозированной открытой рамке считывания (ORF) Zm-CPL3, который мог бы сгенерировать целенаправленный двухцепочечный разрыв в ДНК. Желаемым результатом стала репарация ДНК в сайте разреза по пути NHEJ, ведущая к случайным инсерционно-делеционным мутациям (INDEL), которые могли бы прервать нормальную кодирующую последовательность гена Zm-CLP3. Активность сайта-мишени первоначально анализировали с помощью глубокого секвенирования ампликонов и секвенирования следующего поколения (секвенирование NGS—Illumina) для измерения частоты разрезания ДНК в протопластах кукурузы. Данные NGS были использованы для идентификации, а

затем выбора отдельного сайта-мишени с достаточной активностью для использования в культивировании тканей кукурузы и в системе трансформации для восстановления растений. Растения кукурузы были сгенерированы после трансформации посредством выбранного сайта-мишени и конструкций CRISPR, которые продемонстрировали множество INDEL в гене Zm-CPL3 и, вероятно, нокаутируют функцию гена путем прерывания кодирующей последовательности.

Нуклеазы Cas12a системы CRISPR, названные Cpf1 после их первоначального открытия, в настоящее время получены из ряда исходных организмов. В работе по нокауту ZmCPL3 мы использовали родственную нуклеазу семейства Cas (CPF1-подобную) типа V. Нуклеаза называется MAD7, поскольку она впервые была открыта у микробов из Мадагаскара и получена из компании INSCRIPTA™. Ген был модифицирован для получения оптимальных кодонов кукурузы, чтобы усилить транскрипцию и экспрессию нуклеазы в трансформированной ткани кукурузы. Были созданы конструкции, которые конститутивно экспрессируют MAD7 из промотора Bd-Ubi, которые могли бы быть использованы как для начальной работы по характеристике протопластов, так и для экспериментов по трансформации кукурузы.

Протопласты A188 были выделены, разделены на клетки для трансфекции и отдельно трансфицированы с использованием конструкций pGEZM008-pGEZM011, которые несли кассеты экспрессии, предназначенные для конститутивной экспрессии РНК системы CRISPR (крРНК) m7GEP59 – m7GEP65 (Таблица 9). Отдельную конструкцию, pGEP837, с оптимизированным для кукурузы геном MAD7, сцепленным с промотором Bd-Ubi и двойным промотором 35S, управляемым геном зеленого флуоресцентного белка, совместно трансфицировали с каждой из конструкций крРНК. Таким образом, каждый образец протопласта имел комбинацию конструкций для конститутивной экспрессии MAD7 и уникальную крРНК с активностью разрезания, нацеленную на независимые сайты в гене Zm-CPL3. Флуоресцентный белок использовали для определения эффективности трансфекции путем подсчета флуоресцентных клеток с использованием проточного цитометра. На Фигуре 9 показаны данные этих экспериментов, и каждая полоса таблицы представляет собой результат 3-кратной репликации образцов с использованием независимых совместных трансфекций. Два сайта-мишени были выделены как обладающие наивысшей активностью, на которые были нацелены m7GEP62 и m7GEP64 крРНК, и они были экспрессированы конструкциями pGEZM008 и pGEZM010, соответственно. На

основании положения в гене Zm-CPL3, была выбрана m7GEP62 (pGEZM008) для продвижения работы по трансформации растения.

Таблица 9: Список последовательностей крПНК Zm-CPL3 и их соответствующих конструкций, используемых как для трансфекции протопластов, так и для трансформации растения. Активность нуклеазы CRISPR, включая MAD7, требует последовательности мотива, примыкающего к протоспейсеру (PAM), в дополнение к последовательности протоспейсера, которая указывает, где в Zm-CPL3 происходит двухцепочечный разрыв.

Название крПНК	Последовательность PAM	Последовательность протоспейсера (мишень)	SEQ ID NO:	Конструкция
m7GEP59	TTTC	CTCGTCCTTGGGCGTGACCGT	25	pGEZM005
m7GEP60	TTTG	GTCAGTCTGCCGGGGGCGGG	26	pGEZM006
m7GEP61	TTTC	GCTATGCCTTCAATAGCTTTG	27	pGEZM007
m7GEP62	TTTG	CGTGGTCGCAGGCCGTGCGGA	28	pGEZM008
m7GEP63	TTTG	GACTCCGACGCCCCGAGAAAG	29	pGEZM009
m7GEP64	TTTC	AGGTGTCTGAGAAAACCAGTT	30	pGEZM010
m7GEP65	TTTG	TCAGACACCTGAAACAAAGCC	31	pGEZM011

Трансформация кукурузы (A188) для редактирования генома была выполнена с использованием протокола быстрой регенерации на основе гена RBP2 (WO 2019/238909), который способствует новому эмбриогенезу из дифференцированных клеток-реципиентов в незрелых зародышах кукурузы. Бомбардировку частицами использовали для введения pGEMT129, pGEZM008 и pGEMT128 в клетки-реципиенты. Конструкция pGEMT129 имеет тот же конститутивный ген MAD7, что и pGEP837, но включает ген tdTomato, который полезен тем, что указывает, насколько эффективно была доставлена ДНК к зародышам посредством бомбардировки частицами. Кассета экспрессии RBP2 с промотором Bd-EF1 включена в pGEMT128. Пластины незрелых зародышей кукурузы (50 карат) 3 раза бомбардированы частицами золота размером 0,6 мкм (BioRad), покрытыми этими плазмидами и связанными с использованием протокола CaCl_2 + спермидин. Бомбардировку проводили с использованием разрывных дисков с давлением 450 фунтов на квадратный дюйм, чтобы попытаться свести к минимуму повреждение клеток. Растения были регенерированы с использованием серий измененных тканевых культуральных сред и, наконец, восстановлены в пластиковых контейнерах в виде небольших укоренившихся растений кукурузы. На этой стадии были отобраны образцы молодых растений кукурузы для молекулярного анализа.

Таблица 10: Частота трансформации и редактирования генома незрелых зародышей кукурузы A188. Растения кукурузы были сгенерированы из незрелых зародышей после бомбардировки частицами pGEP1054+pGEZM008. Были взяты образцы листьев растений, которые использовали для экстракции ДНК с последующей амплификацией ПЦР вокруг последовательности-мишени. Ампликоны секвенировали по Сэнгеру для идентификации присутствия INDEL в сайте-мишени m7GEP62, и результаты по растениям, все еще находящимся в среде, указаны в столбце, обозначенном «Количественный анализ 1». Затем растения пересаживали в почву и восстанавливали в теплице. Выжившие растения снова подвергали количественному анализу (Количественный анализ 2) на предмет присутствия INDEL.

Эксперимент	Незрелый зародыш (карат)	Регенерация (карат)	Количественный анализ 1 (карат)	Количественный анализ 2 (карат)
GEZM054-5	150	211 (141%)	7 (3,3%)	3 (1,4%)
GEZM054-6	150	89 (59%)	3 (3,3%)	2 (2,2%)
GEZM054-7	150	460 (307%)	20 (6,5%)	10 (2,1%)
GEZM054-8	150	159 (106%)	7 (4,4%)	5 (3,1%)

Побеги кукурузы, регенерированные из подвергнутых бомбардировке незрелых зародышей, восстанавливали в среде Phytatrays™ (Sigma) для стимулирования их роста и развития. Контейнеры содержались в камере для выращивания растений Conviron в режиме длительного дневного освещения, при постоянной температуре и влажности. Трансформированная ткань кукурузы обычно регенерировала 1 растение за событие, но с низкой и средней частотой было регенерировано несколько растений за событие. В случае нескольких побегов за событие, отбирали образцы всех кончиков листьев и объединяли в один образец для экстракции ДНК. Экстрагированную ДНК использовали для амплификации ПЦР последовательности, фланкирующей сайт-мишень (праймеры, Фигура 10). Часть реакций ПЦР была проведена на геле, чтобы визуально подтвердить, что ампликон присутствует и функционирует в ожидаемом размере. Оставшаяся часть реакции ПЦР была очищена для праймера и реагентов с использованием реагента ExoSAP-It и подвергнута непосредственно секвенированию по Сэнгеру. Выравнивания последовательностей по немодифицированной эталонной последовательности использовали для идентификации кандидатов с INDEL, поскольку они демонстрировали бы результаты смешанной трассировки, происходящие от типа INDEL, и для выяснения

вопроса, присутствовала ли она на одном или обоих аллелях гена Zm-CPL3. Смешанная трассировка представляет собой область в файле трассировки последовательности, где в каждой позиции присутствуют несколько вызовов оснований, что делает вызовы оснований неоднозначными. Таблица 10 показывает результаты процесса по 4 независимым экспериментам. В каждом из этих экспериментов 150 незрелых зародышей было подвергнуто бомбардировке, и инициировано культивирование тканей. Регенерация растений кукурузы варьировалась от 59% до 307%, причем в последнем случае было регенерировано несколько растений на один инициированный зародыш. В столбце «Количественный анализ 1» показаны результаты 4 экспериментов и частота событий с определенной INDEL у растений, которые можно было переносить в теплицу. Столбец «Количественный анализ 2» содержит окончательные числа на стадии T0 и включает растения, которые пережили перенос в теплицу и затем прошли второй скрининг посредством ПЦР и секвенирования по Сэнгеру. Это будут растения T0, которые с наибольшей вероятностью дадут потомство T1 с редакциями Zm-CPL3.

Файлы трассировки последовательности Сэнгера (файлы ABI) содержат указание на то, какие растения следует выбрать для переноса в теплицу, но они не содержат решения, как предложить точную последовательность на одном или обоих аллелях Zm-CPL3 в образце ДНК генома растения. Существует множество способов, которые можно использовать для демонстрации последовательности каждого аллеля, включая анализ потомства T1 после генетической сегрегации аллелей. Наконец, было создано множество новых редакций (Таблица 11). Большинство редакций были делециями, что типично для нуклеаз MAD7 и Cpf1. Многие из показанных редакций нарушают открытую рамку считывания гена CPL3, и, таким образом, функция гена будет устранена, или произойдет ее нокаут.

Таблица 11: Ампликонное секвенирование выбранных событий кукурузы A188, нацеленных на ген CPL3. ДНК, экстрагированную из растений T0, амплифицировали с помощью ПЦР для сайтов-мишеней в экзоне 1 Zm-CPL3. Анализ коррегирует INDEL, представленные смешанной трассировкой, и показал большое количество редакций, полученных с помощью этого подхода к нацеливанию на геном. Подмножество всех сгенерированных событий показано в таблице.

Эксперимент	Название события T0	Последовательность
Нет данных	(A188 эталонное)	TAGCCCCAGCGGCTTAT TCCGCA CGGCCTGCGACCACGCAAA
GEZM054-5	GEZM054-T811	TAGCCCCAGCGGCTT-- ----- CGGCCTGCGACCACGCAAA
GEZM054-5	GEZM054-T821	TAGCCCCAGCGGCTTAT TCC--- GGCCTGCGACCACGCAAA
GEZM054-5	GEZM054-T868	TAGCCCCAGCGG----- ----- -----TGCGACCACGCAAA TAGCCCCAGCGGCTTAT TC--CA CGGCCTGCGACCACGCAAA
GEZM054-6	GEZM054-T929	TAGCCCCAGCGGCTT-- ----- --GCCTGCGACCACGCAAA TAGCCCCAGCGGCTT-- ----- CGGCCTGCGACCACGCAAA
GEZM054-6	GEZM054-T941	TAGCCCCAG----- ----- CGGCCTGCGACCACGCAAA
GEZM054-7	GEZM054-T1207	TAGCCCCAGCGGC---- ----- GGCCTGCGACCACGCAAA TAGCCCCAGCGGCTTAT TC---- CGGCCTGCGACCACGCAAA
GEZM054-7	GEZM054-T1260	TAGCCC----- ----- CGGCCTGCGACCACGCAAA TAGCCCCAGCGGCTTAT TC---- CGGCCTGCGACCACGCAAA
GEZM054-7	GEZM054-T1305	TAGCCCCAGCGGCTTAT TCC--- --GCCTGCGACCACGCAAA
GEZM054-8	GEZM054-T592	TAGCCCCAGCGGC---- ----- GGCCTGCGACCACGCAAA
GEZM054-8	GEZM054-T602	TAGCCCCAGCGGCTT-- ----- --GCCTGCGACCACGCAAA
GEZM054-8	GEZM054-T626	TAGCCCCAGCGGCTTA- ----- -----CCACGCAAA

Пример 3: Снижение регуляции CPL3 у двудольных растений, а именно у *Beta vulgaris*

Для подтверждения значимости гена CPL3 в сахарной свекле (*Beta vulgaris*) (SEQ ID NO: 4 и 14) для устойчивости к грибам, авторы изобретения намерены искать (нокаутрующие) мутации в этом гене с помощью подхода TILLING с использованием EMS или ENU в качестве мутагена. Отобранные растения впоследствии будут самоопыляться для создания гомозиготных мутантов. Гомозиготные мутанты CPL3 будут проанализированы на устойчивость к грибам, например, к *Cercospora beticola*. Количественный анализ устойчивости сахарной свеклы к *Cercospora beticola* можно проводить, как описано в работе Шмидт и соавт. (Plant Mol Biol, (2004). Подавление

экспрессии фенилаланинаммиаклиазы в сахарной свекле патогенным грибом *Cercospora beticola* опосредуется в основном промоторе гена. *Plant molecular biology*, 55(6), 835-852.). Не ограничиваясь теорией, ожидается, что растения сахарной свеклы с нокаутом CPL3 будут проявлять повышенную устойчивость. Для проведения испытания на потенциальные побочные эффекты, такие как задержка роста, предполагается полагаться на полные нокауты соответствующих генов или на стратегию, основанную на транзientной модуляции посредством сайленсирующей конструкции, или на другую стратегию, основанную на создании и/или предложении доминантно-отрицательного аллеля CPL3 с целью испытания различных исходов устойчивости целенаправленным образом.

Пример 4: Снижение регуляции CPL3 – влияние на устойчивость к патогенам

Учитывая центральную роль CPL3, идентифицированную в настоящем документе, был рассмотрен потенциал модуляции CPL3 на различных растениях-мишенях. Во-первых, были определены соответствующие сельскохозяйственные растения-мишени, представляющие экономический и агрономический интерес. В качестве следующего этапа, были определены самые серьезные патогены из всех таксонов, частично очень специфичные для определенных растений-мишеней. Для проведения испытания с целью проверки, может ли модуляция CPL3 быть полезной для повышенной устойчивости к патогенам в отношении различных патогенов, включая вирусные, бактериальные патогены, оомицеты, нематод, насекомых или патогенные грибы, типы патогенов-мишеней и связанные с этим болезни будут, таким образом, изучены на различных моделях растений, чтобы определить степень необходимой модуляции CPL3 и конкретный способ необходимой модуляции CPL3 (то есть, на уровне РНК и/или на уровне ДНК, или даже на уровне белка) для достижения усиленной устойчивости к патогенам биологическими, а не химическими средствами в отношении нескольких патогенов растений в соответствующем растении-мишени, которые вызывают значительные потери урожая и производства сельскохозяйственных растений.

Формула изобретения

1. Растение, обладающее устойчивостью к патогенам, отличающееся тем, что устойчивость к патогенам придается или повышается посредством модуляции нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный фосфатазоподобный белок 3 (CPL3) с С-концевым доменом или его регуляторную последовательность, или посредством модуляции транскрипции эндогенного белка CPL3, при этом, модуляция достигается посредством

(i) по меньшей мере, одной мутации нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3, предпочтительно, при этом, по меньшей мере, одна мутация имеет доминантно-отрицательный эффект, предпочтительно, при этом, по меньшей мере, одна мутация вызывает изменение аминокислотной последовательности консервативного каталитического домена белка CPL3, содержащего мотив DXDXT/V; и/или

(ii) по меньшей мере, одной сайленсирующей конструкции, направленной, по меньшей мере, на одну эндогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок CPL3, предпочтительно, направленной на все эндогенные нуклеотидные последовательности, кодирующие белок CPL3; и/или

(iii) модификации нативной регуляторной последовательности (последовательностей), по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный белок CPL3, предпочтительно, всех нативных регуляторных последовательностей нуклеотидных последовательностей, кодирующих эндогенный белок CPL3, при этом, модификация вызывает снижение скорости экспрессии, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей эндогенный белок CPL3.

2. Растение по пункту 1, отличающееся тем, что патоген представляет собой, по меньшей мере, одно из следующего: патогенный гриб, патоген оомицет, бактериальный патоген, вирус, патоген нематоду или насекомое, предпочтительно, при этом, патоген представляет собой гембиотрофный гриб, выбранный из группы, состоящей из: *Zymoseptoria tritici*, *Setosphaeria turcica*, *Fusarium spp.* *Fusarium graminearum*, *Colletotrichum spp.*, такого как *Colletotrichum graminicola*, *Magnaporthe grisea*, *Magnaporthe oryzae*,

Phytophthora infestans, или, при этом, патоген представляет собой грибок, выбранный из *Cercospora spp.*, предпочтительно, *Cercospora beticola* или *Cercospora zea-mayidis*.

3. Растение по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок CPL3, выбрана из группы, состоящей из:

- (a) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2-10, или его гомологичной, ортологичной или паралогичной последовательности;
- (b) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80% идентичность с одной из нуклеотидных последовательностей, как определено в (a);
- (c) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11-19, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичность с одной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 11-19;
- (d) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичность с одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 11-19, или
- (d) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с нуклеотидной последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности, как определено в (a)-(d), в жестких условиях.

4. Растение по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что, по меньшей мере, одна мутация имеет доминантно-отрицательный эффект и присутствует в гетерозиготном состоянии в растении.

5. Растение по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что, по меньшей мере, одна мутация представляет собой мутацию нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3, которая вызывает замещение Asp на Ala в положении 928, представленном в SEQ ID NO: 19, в положении 944, представленном в SEQ ID NO: 14, в положении 949, представленном в SEQ ID NO: 11, в положении 944, представленном в SEQ ID NO: 14, в положении 949, представленном в SEQ ID NO: 11, в положении 953, представленном в SEQ ID NO: 12, в положении 910, представленном в SEQ ID NO: 13, в положении 890, представленном в SEQ ID NO: 18, в положении 938,

представленном в SEQ ID NO: 15, в положении 929, представленном в SEQ ID NO: 16, в положении 938, представленном в SEQ ID NO: 17.

6. Растение по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что, по меньшей мере, одна сайленсирующая конструкция содержит:

I. молекулу РНКи, направленную, нацеленную или гибридизирующуюся с нуклеотидной последовательностью, кодирующую белок CPL3, или полинуклеотидную последовательность, кодирующую указанную молекулу РНКи; или

II. РНК-специфическую систему CRISPR/Cas, направленную или нацеленную на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок CPL3, или полинуклеотидную последовательность, кодирующую указанную РНК-специфическую систему CRISPR/Cas, предпочтительно, при этом, молекула РНКи выбрана из молекулы дцРНК, молекулы кшРНК, молекулы микроРНК или молекулы миРНК, которая содержит, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45 или 50 непрерывных нуклеотидов кодирующей нуклеотидной последовательности белка CPL3 или его комплементарной последовательности в смысловом или антисмысловом направлении, более предпочтительно, при этом, молекула РНКи выбрана из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21-24, или из последовательности, имеющей, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с ней.

7. Растение по пункту 6, отличающееся тем, что молекула РНКи не имеет существенной идентичности последовательности с другими геномными областями в геноме растения.

8. Растение по любому из пунктов 1-3, отличающееся тем, что модификация нативной регуляторной последовательности (последовательностей) представляет собой транзиентную или стабильную модификацию регуляторной последовательности, предпочтительно, при этом

(i) модификация вводится сайт-направленным ферментом, модифицирующим ДНК, или, при этом,

(ii) модифицированный сайт-направленный фермент, модифицирующий ДНК, опосредует модификацию, предпочтительно, ингибирование, регуляторной последовательности, или, при этом,

(iii) модификация вводится путем случайного мутагенеза, предпочтительно, при этом, случайный мутагенез выбран из мутагенеза, индуцированного химическим способом, или из мутагенеза, индуцированного облучением.

9. Растение по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что, растение представляет собой или происходит от вида растения, выбранного из группы, состоящей из: *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosom*, *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinarium*, *Zea mays*, *Setaria italica*, *Oryza minuta*, *Oriza sativa*, *Oryza australiensis*, *Oryza alta*, *Triticum aestivum*, *Secale cereale*, *Malus domestica*, *Brachypodium distach-yon*, *Hordeum marinum*, *Aegilops tauschii*, *Daucus glochidiatus*, *Beta vulgaris*, *Daucus pusillus*, *Daucus muricatus*, *Daucus carota*, *Eucalyptus grandis*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Coffea canephora*, *Vitis vinifera*, *Erythrante guttata*, *Genlisea aurea*, *Cucumis sativus*, *Morus notabilis*, *Arabidopsis arenosa*, *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis thaliana*, *Crucihimalaya himalaica*, *Crucihimalaya wallichii*, *Cardamine flexuosa*, *Lepidium virginicum*, *Capsella bursa pastoris*, *Olmaraibidopsis pumila*, *Arabis hirsute*, *Brassica napus*, *Brassica oeleracia*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Eruca vesicaria subsp. sativa*, *Citrus sinensis*, *Jatropha curcas*, *Populus trichocarpa*, *Medicago truncatula*, *Cicer yama-shitae*, *Cicer bijugum*, *Cicer arietinum*, *Cicer reticulatum*, *Cicer judaicum*, *Cajamus cajanifoliuis*, *Cajamus scarabaeoides*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Astragalus sinicus*, *Lotus japonicas*, *Torenia fournieri*, *Allium cepa*, *Allium fistulosum*, *Allium sativum*, и *Allium tuberosum*.

10. Клетка, ткань, орган, семя или материал растения по любому из предыдущих ПУНКТОВ.

11. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую фосфатазоподобный белок 3 (CPL3) с С-концевым

доменом, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из:

- (a) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2-10;
- (b) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80% идентичность с нуклеотидной последовательностью, как определено в (a),
- (c) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11-19, или
- (d) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с нуклеотидной последовательностью, комплементарной последовательности, как определено в (a)-(c), в жестких условиях,

при этом, нуклеотидная последовательность содержит, по меньшей мере, одну мутацию, способную придавать или повышать устойчивость к патогену в растении, в котором экспрессируется молекула нуклеиновой кислоты, предпочтительно, при этом, патоген представляет собой, по меньшей мере, одно из следующих: патогенный грибок, патоген оомицет, бактериальный патоген, вирус, патоген нематоду или насекомое, предпочтительно, при этом, патоген представляет собой гемибiotрофный грибок, выбранный из группы, состоящей из: *Zymoseptoria tritici*, *Setosphaeria turcica*, или, при этом, патоген представляет собой грибок, выбранный из *Cercospora spp.*, предпочтительно, *Cercospora beticola* или *Cercospora zea-mayidis*.

12. Молекула нуклеиновой кислоты по пункту 11, отличающаяся тем, что мутация представляет собой мутацию нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3, предпочтительно, мутацию, имеющую доминантно-отрицательный эффект, предпочтительно, при этом, мутация вызывает изменение аминокислотной последовательности консервативного каталитического домена белка CPL3, содержащего мотив DXDXT/V, более предпочтительно, при этом, мутация представляет собой мутацию, как определено в пункте 5.

13. Способ генерирования растения, обладающего устойчивостью к патогенам, или его растительной клетки, ткани, органа, семени или растительного материала, включающий:

(i) предложение, по меньшей мере, одной сайленсирующей конструкции, как определено в любом из пунктов 1, 6 или 7, или, по меньшей мере, одной последовательности, кодирующей последовательность;

(ii) модификацию растительной клетки, ткани, органа, растения, семени или растительного материала путем введения, по меньшей мере, одной сайленсирующей конструкций или последовательности, кодирующей последовательность из (i), в геном указанной растительной клетки, ткани, органа, растения, семени или растительного материала; и

(iii) получение модифицированной растительной клетки, ткани, органа, растения, семени или растительного материала,

(iv) необязательно, регенерацию растения из растительной клетки, ткани, органа или растительного материала или выращивание семени из растения, полученного в (iii),

отличающийся тем, что растительная клетка, ткань, орган, растение, семя или растительный материал, полученные в (iii), растение, регенерированное в (iv), или семя, выращенное в (iv), содержат введенную, по меньшей мере, одну сайленсирующую конструкцию или последовательность, кодирующую последовательность и, таким образом, обладает устойчивостью к патогенам.

14. Способ генерирования растения, обладающего устойчивостью к патогенам, или его растительной клетки, ткани, органа, семени или растительного материала, включающий:

(i) предложение, по меньшей мере, одного сайт-направленного фермента, модифицирующего ДНК, или последовательности, кодирующей последовательность, и необязательно, по меньшей мере, одной матрицы для репарации ДНК, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сайт-направленный фермент, модифицирующий ДНК, и, необязательно, по меньшей мере, одна матрица для репарации ДНК:

(a) направлена или нацелена на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок CPL3, как определено в любом из пунктов 1, 3 или 4; или

(b) направлена или нацелена на регуляторную последовательность, по меньшей мере, одного белка CPL3, кодирующую нуклеотидную последовательность, как определено в любом из пунктов 1, 3 или 5;

(ii) введение, по меньшей мере, одного сайт-направленного фермента, модифицирующего ДНК, или последовательности, кодирующей последовательность, и,

необязательно, по меньшей мере, одной матрицы для репарации ДНК в растительную клетку, ткань, орган, растение или растительный материал;

(iii) мутацию или модификацию нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3 или его регуляторную последовательность, в геноме растительной клетки, ткани, органа, растения или растительного материала и получение мутантной или модифицированной популяции растительных клеток, тканей, органов, растений или растительных материалов;

(iv) необязательно: скрининг популяции на предмет доминантно-отрицательной мутации, тем самым придавая или повышая устойчивость к патогенам, или скрининг популяции на предмет мутации или модификации в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CPL3 или его регуляторную последовательность;

(v) идентификацию и, таким образом, получение растительной клетки, ткани, органа, растения или растительного материала, обладающих устойчивостью к патогенам.

15. Способ генерирования растения, обладающего устойчивостью к патогенам, или его растительной клетки, ткани, органа, семени или растительного материала, включающий:

(i) воздействие на растительную клетку, ткань, орган, растение или растительный материал, предпочтительно, на семена растения, эффективным количеством мутагенного агента, предпочтительно, этилметансульфонатом, N-этил-N-нитрозомочевинной или облучением,

(ii) получение мутагенизированной популяции растительных клеток, тканей, органов, растений или растительных материалов, необязательно, путем выращивания растений из мутагенизированной популяции;

(iii) скрининг мутагенизированной популяции на предмет устойчивости к патогенам, необязательно, путем выделения и анализа геномной ДНК из растений, обладающих устойчивостью к патогенам;

(iv) идентификацию и получение модифицированной растительной клетки, ткани, органа, растения или растительного материала, обладающих устойчивостью к патогенам.

	20	40	60	80
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	M-----LVARS	GCSRTLIRMGNDENLMVMV-DVEE	EGEIPDSVNTEIEVKHKSTTTTADVG	GDVDVG
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	M-----IF--GSLLDCE	KLGLKLEKMGKEVEDVEE	EGEISDTASVE-EISAE	DFNKQD-----VKVLNNN
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	M-----VF--GSLLDCE	VLGLKLEKMGKEAEDEVEE	EGEISDTASVE-EISAE	DFNKQD-----VKLLNNN
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	M-----E-----ECN-----	RVEDVEE	EGEISDSASVE-EISEDA	FNRRQDPP---TTTKIKIASNE
Beta vulgaris g12062.t1_белок	M-----	KVSGGEGE	IPESDAIV-EMKHQ--SKTTTT--	TTTTITS
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	MRVTLTPKDEDWLVELMTRERPRSAVVAPGGDVFTA-	SGGGETSDGDSS	ESLEEISAA	DFKESSS-----GT
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	MRVTLTPKDEDWLVLMTREPRSAVVAPGGDVFTA-	GGGGETSDGDSS	ESLEEISAA	DFKESSS-----GT
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	MRVTLTPKDEDWLVLMTREPRSAVVAPGGDVFTA-	GGGGETSDGDSS	ESLEEISAA	DFKESSS-----GT
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	M-----ARERPRSTVVAAGGDLVTA	PGGG-EGSDGDS	AGSIEEISADD	FRKDSS-----SALGGP
Zea mays ZmCPL3_белок	MRVTVTPKDEERLVDLMAREQPRSAVVAAGGDLVTAAGGGGEGSDRDS	SGSIEEITADD	FKKDSS-----SALGG-	70
	100	120	140	160
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	GGGGG	SNNGSRVWTMEELISQYPAY-RPY-ANSG	LSNLAWARAVQNKPFNEGLVMDYEPR-	-----125
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	NKPNGSDA--RVWAVHOLYSKYPTICRGY--ASGLYNLAWAQAVQNKPLNDIFVMEVDSQ--	ANANSN	NNNNR---	L124
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	NKPNGSDA--RVWAVHOLYSKYPTICRGY--ASGLYNLAWAQAVQNKPLNDIFVMEVDSQ--	ANANSN	NRSSHR---	L124
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	NQNQNSTTTTRVWMTMRDAY-KYP-ISR	DY--ARGLYNLAWAQAVQNKPLDEL	FVMTSDNSNQCANANAN-----	111
Beta vulgaris g12062.t1_белок	KKDNNS-----YW-MRDLY-KYSSY-RGYGAASGLYNLAWAQAVQNKPLNEVLV-ELDDKKNKNKNA	STDDTSVNKEQGEV	111	
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	AAASASSQSRVW-M-----GY-TMSR	SYAPA--FH8FAWAQAVQNKPL--VPRP-AD-----	112	
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	AAASASSQSRVW-M-----GY-TMSR	SYAPA--FH8FAWAQAVQNKPL--VPRPAD-----	113	
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	AAPSASSQSRVW-M-----GY-TMSR	SYAPA--FH8FAWAQAVQNKPL--VPRPAD-----	113	
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	AAAAAAGQSRSSW-VGPPAVGY--MARNFGHA--FNSFAWSQAVRNKPLGLQPPASD-----	107		
Zea mays ZmCPL3_белок	AAAAAAGPRSSW-VAPPVGY--MARNFRYA--FNSFAWSQAVRNKPLGLQPP-APD-----	121		
	180	200	220	240
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	-----ESDKIVIEDSDDE-KEEGELEEGE-----	IDLVDNASDDNLVEKDTESVVLISADKVEDDR	ILKE	184
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	ASVAVNPQDVVVVDVD---KEEGELEEGE-----	IDA--DAEPEGEAESVVAVPVVSDSEKLDD---	VK	180
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	ASVAVNPQDVVVVDVD---KEEGELEEGE-----	IDA--DAEPEGEAESVVVA--VSDSEKLDD---	VK	178
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	----VESKVIIDVDVDDDAKEEGELEEGE-----	IDL--DAA-----D----	LV	145
Beta vulgaris g12062.t1_белок	QQHCVESKEVFEV-VDSE-KEEGELEEGE-----	IDF--DSDDTGNHN-----SNGNKVQDDFGGLE	165	
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	-----EDEVEHLVDASEEKEEGEIEEGEAVQS-TSPPIKQPEAIDLSDAQ--DKSES-----	VAME----	QTP	LAVEA175
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	-----EDEVEHLVDASDEEKEEGEIEEGEAVQS-TSPPIKQPETIDLSDAQ--DKSES-----	VAME----	QTP	LAFEA176
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	-----EDEVEHLVDTSDDEEKEEGEIEEGEAVQS-TSPPIKQPETIDLSDAQ--DKSES-----	VOME----	QTR	LAVEA176
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	-----EDEVEHAVDASDGEKEEGEIEEGEAVEAEASPARAQPETIDLADADALEKSES-----	LA-----GAVPASAAE	172	
Zea mays ZmCPL3_белок	-----QDEVEHAVDVSDGEKEEGEIEEGEAVEALASPAPAQPETIDLSDAP--EKSES-----	VAIDGSASVVPVPAE	189	

Фиг. 1А

	260	280	300	320
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	RDL---	EKKVKLIRGVLESTSLVEAQTGFEGVCSRI	LGALESLREL---	VSDNDDFPKROTLVQLSFASLQTI
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	RDVSNSEQ--	LGVRGVLEGVTVANVAESFAQTCSKLQNALPEVLSR---	PADS---	ERDD-LVRLSFNATEVVYSVFCSM
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	MDVSDSEQ--	LGARGVLEGVTVANVYESFAQTCSKLQNTLPEVLSR---	PAGS---	EKDD-LVRLSFNATEVVYSVFCSM
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	LNFGEAN--	F-VREQLQSVTLDETHKSFSMVCSKLQTSLLALGEL---	ALSQ---	DKNDILQLFMTALRTINSVFYSM
Beta vulgaris g12062.t1_белок	MDDGELENQVSS	IRKVLHNVTVAEAHKSFDIVCARLRTSLETLEL---	VLHTW-FPSKDAL	IQQAFAAIQCVYSVYSSM
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	ADELDFDQRVGS	ILEELERLSIEEAESFEGSCVRLRSCFESLKPLFPE--	SGSPMPWLDALVQQAFVGIDT	ITTVANSY
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	ADELDFDQRVGS	ILEELERLSIEEAESFEGSCARLRSCFESLKPLFPE--	SGSPMPWLDALVQQAFVGIDT	ITTVANSY
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	ADELDFDQRVGS	ILEELERLSIEEAESFEASCARLRSCFESLKPLFPE--	SGSPMPWLDALVQQAFVGIDT	ITTVANSY
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	EEEVNLDQRVGS	ILEELEMYSIEEAESFEGACGR LHTCFENLKLPLFQELENGSPMAILEPLMQQAFIGIDT	LT	TTVAISY
Zea mays ZmCPL3_белок	EEEVNLDQRVGS	ILEELEMYSIEEAESFEGACAR LHTCFENLKLPLFQELENGSPMAILEPLMQQAFIGIDT	LT	TTVANLY
	340	360	380	400
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	NNISKERNKETMSRL	LTLYNDHF-SQFLSFNQKNEIETMNQDLRSRAIAVFAGTSSEENVNQMTQ-----		322
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	D8LKKEONKOS	ILRLLSFYKDQQAQLFSPEHIKEIQGMMTAIDYFGALVNSEAIGKEKELQTT-----		VQTHE 320
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	D88KEONKOS	ILRLLSFYKDQQAQLFSPEHVKEIQGMMTAIDSVGALVNSEAIGKEKELQTT-----		IKTQENS AVEVQIHE 329
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	NQDQKQONTOL	LSRLLFHAKTQLPA-LLS8EQLKEVDAILSLINQSAVFSNTQDNDKYNGIKYVELLDKK---		VSHKSS 292
Beta vulgaris g12062.t1_белок	SPTLRDQNKORMSRL	LTIFYMD-LSSVLTPEQRKEVEGMITSVNPPIVPYKPKSRDRQEELPYTE----		KAILTDSNTLT 316
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	AMPKREONKNMLLKL	LFIKNRY-SQHLALNQDELDSRVRL----		VF--VDGEDHAG8NCSSKTVNLVVP8GQVP8DR 326
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	AMPKREONKNMLLKL	LFIKNRY-SQHLALSQRDELDSRVRL----		VF--VDGEDNAG8NCSTKTVNVVVP8GQVP8DR 327
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	AMPKREONKNMLLKL	LFIKNRY-SQHLALNQDELDSRVRL----		VF--VDGEDNAG8NCSTKTVNVVVP8GQVP8DR 327
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	NLPR8EQNKTTLLKSL	LFIKNRY-SQHLTPEQRDELDSRVRLK----		VFGEKDNV8DPST99GTNAINVLP8GQVP8SSG 327
Zea mays ZmCPL3_белок	NLPR8EQNKTTLLKSL	LFIKNRY-SQHLTPEQREEMDSRVRLK----		VFGEKDNV8DPST9CGTSAINV8AP8GQVP8NTG 344
	420	440	460	480
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	--PSNGDSFLAKKL-----	TSESTHRGAAYLR8RLPMLPLLDLHKOHDA8SLPSPTRETTPSLPVN8R-		383
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	IKTQENQAVEAAEL---	ISYNKPLHSDIIGASHALKFGQNSIKGRGVLLPLLDLHKOHDA8SLPSPTREAP8CFPVNKL		397
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	IKTQENQAVEAAEL---	ISY8KPLHRDIIGTSQALKFGQNSIKGRGVLLPLLDLHKOHDA8SLPSPTREAP8CFPVNKL		406
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	NANQDFTAVNKYDLGA-	VSIKSSGLKEQ8V8FESYKPGLAN8KAKGL8IPLLDLHKOHDEDTLPSP8TREI8PQFPVAKAT		371
Beta vulgaris g12062.t1_белок	VNTGDNKSDLLKKVGP	EL8VYQSEKKNTDILSEAMRHFP8SLKYR88FGP8LLDLHKVHDE8SLPSPT8K8TMP8LPFFETA		396
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	-LPVESGAANPLG-----	GSSFP8WEIPANNRMVS-PLLDLH8DYDEN8SLPSPT8R8SAP8FPVPKP		386
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	-LPVESGAANPLR-----	GSSFP8WEIPANNRMVS-PLLDLH8DYDEN8SLPSPT8R8SAP8FPVPKP		387
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	-LPVESGAANPPR-----	GSSFP8WEIPANNRIVS-PLLDLH8DYDEN8SLPSPT8R8SAP8FPVPKP		387
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	GLPFESGAANPF-----	SSLPRLEVPA--KRIS-PLLDLH8DYDEN8SLPSPT8R8NAP8FPVPKP		384
Zea mays ZmCPL3_белок	GLPFESGAANLF-----	SSLPRLEVPA--KRNS-PLNLH8DYDEN8SLPSPT8R8NAP8FPALKP		401

Фиг. 1А (продолжение)

	500	520	540	560		
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	----HTMYRPGFPVGRESQT-----	TEGAKVYSYESDARKAVSTYQQKFGLNSVFKTDDLPSPTPSGEPND--	445			
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	--SVGEPMYS-----	SGSAAAKPESGKMELDSEGSKFHLYETDALKAVSTYQQKFGRSSLFTNDKFPSPTPSGDC-E--	466			
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	--SVGESMYR-----	SGSASAK-----	MELDSEGSKFHLYETDALKAVSTYQQKFGRSSLFTNDKFPSPTPSGDC-E--	470		
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	--QA-HGMVKLDLP I FAGS.....	LEKGNLLHPYETDALKAVSSYQQKFGRSSLFVSENLPSPTPSEEG-D..	434			
Beta vulgaris g12062.t1_белок	PPRVVHGLQK.....	SGVHPYETEAVKAVSSYQQRFGRSTFLATDMLPSPTPSEDGNE--	449			
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	GFGL-FPMAP.....	DRYFSAERVDPSSKKVLYPCVNDALKDVSSYRQKYGQTSTFASDDLPSPTPSDDGDKSG	453			
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	GFGV-FPMAP.....	DRYFLAERVDPSSKKVLYTCVNDALKDVSSYRQKYGQTSTFASDDLPSPTPSDDGDKSG	454			
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	GFGV-FPMAP.....	DRYFSAERIDPSKNFLYPCVNDALKDVSSYRQKYGPTSTFASDDLPSPTPSDDGDKSG	454			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	GFGA-FPMVP.....	EKL8FPERVEPAKNSLYPSLNDPLKAVSSYQQKYGQKSVFSPDDLPSPTPSGDEGKSA	451			
Zea mays ZmCPL3_белок	GFGA-FPMVP.....	EKL8FLDRVEPTKN8LYPPLNDPLKAVSSYQQKYGQKSVYSPDDLPSPTPSGDEGKPA	468			
	580	600	620	640		
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	GN-GDVGGEVSSSVVKSSNPGSHL IYGDDVPLPSNFNSRSMPIVANSVSSTVPPHLS IHAISAPTASD-----	QTV-	515			
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	DE I VDTNEEVSSA-----	STGDFL-----	TS--TKPTLLDLPVVSATS-TDRSSLHGFISSRVDAAAGP-----	GS L-	524	
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	DEVYDTNEEVSSA-----	STGDFL-----	TS--TKPTLLDQPPVSATS-MDRSSMHGFISSRVDATGP-----	GS F-	528	
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	SGKGDIGGEVTSL-----	DVVHNA-----	SH--LNESSMGQPI LSSVP--QTNILDGQGLGTARTADP-----	LSFL	492	
Beta vulgaris g12062.t1_белок	GGADDSNEEVSSS-----	NAYTNV-----	VSRTTNSSVYPQPVYSSAAYTSSTMQGYISGT--	SAES-----	SSVG	509
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	DKEGDI FGEVSSFSASN-----	LIPASRPSAVISSND-----	-----	SFAGGPPGYAKQIEQSVS	503	
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	DKEGDI FGEVSSFSASNKSAPPSGNLIPASRPSAVISSND-----	-----	-----	SFAGGPPGYAKQIEQSVS	512	
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	DKEGDI FGEVSSFSASNKSAPPSGNLMPASRPSAVISSND-----	-----	-----	SFAGGPPGYAKQIEQSVS	512	
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	DKGGDI FSEVSSFPVPS IALPSTSQMPASQPS TVSSS-----	-----	-----	GISYASGPPGFAKQIEQPSA	509	
Zea mays ZmCPL3_белок	DKGGDI FSDVSSFPVPS I VLPSTSQMPASQPS TVSSS ISYASSTSQMAASQPI TVSSSGISYASGPPGFAKQIEQSTA	548				
	660	680	700	720		
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	-----	KPSAKSRDPRLRLAKPOAANYTIYSYSSGDARNL-SKVELSADLV--	NPRKQKAADEFLIDGPAWKRQKSD---	583		
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	--PV--	KSSAKNRDPRLRFVNSDASAYDNPSL IHNMP----	KVEYAGTTI---	SRKQKAAEPPSLDVTVSKRQKSPLEN	593	
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	--PV--	KSSAKNRDPRLRFINSOASAYDNLSL IINMS----	KVEYSGTTI---	SRKQKAAEPPSLDVTVSKRLKSSLEN	597	
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	PNP SLRSSTAKSRDPRLRLATS DAYA-QNTNKNI LPIPDIDLKLEASLEMI--	GSKKQKTVDLPVFGAPLPKRQR--	EQ	567		
Beta vulgaris g12062.t1_белок	SSPSL-RASAKSRDPRLRHLNPNFGSLDLSFCPSPMVPSASKLEPLGEIM--	KSKKTKALEGRLLDQPTAKRPRNGLET	566			
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	GP SHALKPSAKSRDPRLRFLNRDSGGTADANRHVNLAEPNASKDGT LGGVVS DNSRKHKATGQPLTDETVLKRARESTGN	583				
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	GP SHALKPSAKSRDPRLRFLNRDSGGTADANRHVNLAEPNASKDGT LGGVVS DNSRKHKATGQPLTGETVLKRARESTGN	582				
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	GP SHALKPSAKSRDPRLRFLNRDSGGTADANIHVNLAEPNASKDGT LGGVVS DNSRKHKATGQPLMDETVLKRARESTGS	592				
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	GP NHA IKAASKSRDPRLRFLNRDSAGATDVNRRANFSE---	LKDGNLGGV-SVGNRKHKAI DDPOVDENVLKRFRGGTAN	585			
Zea mays ZmCPL3_белок	GP NHA IKAASKSRDPRLRFLNRDSAGATDVNRRANFSE---	LKDGNLGGV-SVGNRKQKAVDDPOVDNALKRFRGGIAN	624			

Фиг. 1А (продолжение)

		740		760		780		800
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	-----	TDAPKAAG-TGGWLED-----	TESSGLL-KLESKPRLIENGVTSM	TSSVMPTSAVSVS----	QKVRT	639		
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	TEHNM--	SEVR--TG-IGGWLEHTGP--	GAQFIERNHLMDFGPEPQKTLNTV	SSSCT---GSDNFNATSIRNEQAPIT	663			
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	TEHNM--	SEVR--TG-SCCWLEENTGP--	CAQLIERNHLMDFGPEAKKTLNTV	SSSCT---GSDNFNATSIRNEQAPIT	667			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	TD8II-	VSDVRPSTG-NGGWLEDRGTA--	GLPITSSNCATDSSDNDIRKLEQVT	ATIATI--PSVIVNAA----ENFPVT	637			
Beta vulgaris g12062.t1_белок	EDSMNANQVKTLOG-STR-	METSSSSILGPQSSSRGLLGPAIDPR-	KPGSGTVSSGITTNPSMAVNKTA----	KPSM	658			
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	-----	PROMQVPPGROGSNISSYSGNRVQSNQHKGLETKAAGNPS	IRTSSQLISNVSSIPDSTGTLQAS--	QPNSVPQT	655			
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	-----	PROMQVPPSROGSNISSYSGDRVQSNQHKGLETKAAGNPS	IRTSSQLISNVSSIPDSTGTLQAS--	QPNSVPQT	664			
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	-----	PROILVPPGROGSNISSYSGDRVQSNKHTGLETKTARNPS	IRTSSQLISNVSSIPDSTGTLQAS--	QPNSVPQT	664			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	-----	PROLQ-----	PTGNPNQLMNI RAPTNSSGI--	NMKTLOPP--Q-TTAPHV	625			
Zea mays ZmCPL3_белок	-----	QROMQ-----	PTGNPNQLMNI RAPTHSSSI--	NMKTLOPP--Q-TTAPHV	664			
		820		840		860		880
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	ASTDTASLQSL	-KDI AVNPTMLNL LKMG ERQKYPEKAI	QKPM DPRRAAQLPGSSVQP--	GVSTPLSIPASNALAANSL	716			
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	SSNVLASLPALL	-KGA AVNPTMLVNL LRI AE AQK-----	KSADSATNMLLHPTSSNSAMGTOSTAS	IGSSMATGLLOS	735			
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	ASNVLASLPALL	-KEASVNPIMLVN I LRLAE AQK-----	KSADSAAIMLLHPTSSNPAMGTOSTAS	IGSSMATGLLOS	739			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	GISTSTTLHSL	-KDI AINPSIWHNI IKHE--	QQ-----	KSADASRTTAAQASSSKS	LGAVPSTDAIAPRSSAIGQR	707		
Beta vulgaris g12062.t1_белок	NVSGSPSLQSL	-KDI AGNPGAWNNI IK--	EQN-----	KSSEPLQSVS-HSMNSNI	LGAAPSAI AVPPISSGVGQT	726		
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	SAAPIVSLPAVL	-KDI AVNPTVLHWHI OM EHOKWSA----	SEPQPASGIISSGM INNVTAGMVI	PPG-NAPKTA EVAHI	728			
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	SAAPIVSLPAVL	-KDI AVNPTVLHWHI OM EHOKRSA----	SEPQPASGIISSGM INNVTAGMVI	PPG-NALKTA EVAHI	737			
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	SAAPIVSLPAVL	-KDI AVNPTVLHWHI OM EHOKRSA----	SEPQPASGIISSGM INNVTAGMVI	PPG-NALKTA EVAHI	737			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	SAAPAVPVP SMLLKDI	AVNPTLLMHLI OM EHOKKSA----	SETQ---GGMSSGMSNNGI	AGMVFTPG-NAPKTTEAAQV	696			
Zea mays ZmCPL3_белок	SAAPAVPLPPMLLKDI	AVNPALLMHLI OM EHOKKSA----	SESQ---GGMSSGMTNNGI	AGMVFTPG-NAPKITEAAQV	735			
		900		920		940		960
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	NSGYLQDSSONAPAA----	ESGSIRMKPRDPRRI LH-	GSTLQRTDSSMEKQTKYNDPSTLGLTLMKGKAEDLETPP---	767				
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	SVGM L PVS	SOSTSMTOTLQDOSGKIRMKPRDPRRI	LHTNNTIQKSGNLGNEQFKAI	VSPVSN--	OQTGDNVNAOKLEG	812		
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	SVGM L PVS	SOSTSTAQTLQDOSGKIRMKPRDPRRI	LHTNNTIQKSGDLGNEQFKAI	VSPVSN--	ORTGDNVNAPKLEG	816		
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	SVGILQTPHTASA----	DEVAIVRMKPRDPRRV LH-	NTAVLKGGNVGSDOCK--	TGVAGT---	HATISNLGFQSQED	775		
Beta vulgaris g12062.t1_белок	SAGLLQVPSPKVVTSS--	QDQSAKLRMKPRDPRRALHANMA-	ORTGSSVPEQPK--	VNGVHNTTT-QGLQEN	INAQRYVN	800		
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	PSYRPQATSQTASVNS--	QNDPGVIRMKARDPRRV LH-	NNTSQKNDTPNSDQAKS--	NGIALPAFQDSKDNLI	INREQLAE	803		
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	PSYRPQATSQTASVNS--	QNDPGVIRMKARDPRRV LH-	NNTSQKNDTPNSDQAKS--	NGITLPAFQDSKDNLI	INREQLAE	812		
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	PSYRPQATSQTASVNS--	QNDPGVIRMKARDPRRV LH-	NNTSQKNDTLNSDQAKS--	NGIALPAFQDSKDNLI	INRQQLAE	812		
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	PSVRPQVPAQTPSLNS--	QNDGGI LRMKPRDPRRI LH-	NNVAQKSDAMVLEQVKT--	NGITQPDQGTGD-----	761			
Zea mays ZmCPL3_белок	PSVRPQVPVQTPPLNS--	QNDGGI VRMKPRDPRRI LH-	NNIAQKSDAMSLEQVKN--	NGTTQPDQGTGD-----	800			

Фиг. 1А (продолжение)

	980	1000	1020	1040
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	QLDPRQNI	SONCTSKMKISCELLSCKTPDFSTQFTKNLKS	IADMVVVSQ--QLGNPPA--	SMHSVQLKTERDVKHNPSN 862
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	RYDSKLVPT	QPSAQ-----	PDIA	RQFARNLKNIADIMSVSQESSTHTPVAQIFSSASVPLTSDR-----GEQ 874
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	RYDNKLVPT	QSSAQ-----	PDIA	RQFTRNLKNIADIMSVSQESSTHTPVSONFSSASVPLTSDR-----GEQ 878
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	QLDRKSAVTL	STTP-----	PDIA	RQFTKNLKNIADIMSVSP--STSLSAASQTQTQCLQSHQSR-----SEG 835
Beta vulgaris g12062.t1_белок	GTSP8AASSQTP	IL-----	PDIT	KQFTKNLKNIADIISSPQTSSIQSPLA--VSSLSAQANSDDTTSISGGGQ 865
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	QLQTTVLPSQPVSL	S-----	SI	ARQSTMSASKV-DPVSNSQLAASSLIAP-QETLVSVNRADPRVAAGQND- 867
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	QLQTTVLPSQPVSL	S-----	SI	ARQSTMSASKV-DPVSNSQLAASSLIAP-QETLVSVNRADPRVAAGQND- 876
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	QLQTTVLPSQPVSL	S-----	SI	ARQSTMSASKV-DPVSNSQLAASSLIAP-QESLVSVNRADPRVAAGQND- 876
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	--QTSSMP	SQPTLPS-----	SV	ARPFT-NTKHV-DPVSNSQLAATAIMAPTOQALGSINKVDPRRLAVEQNG- 823
Zea mays ZmCPL3_белок	--QTPVPSQ	PALPS-----	SI	ARPF8-SAKHY-DPVSNSQLAATAIMAPTO-ALSSVNKVDPRRLAVEQNG- 861
	1060	1080	1100	1120
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	PNA-----	QDEDVS	VSAASVTAAAGPTRSMNSWGDVEHLFEGYDDIQ	RVAIQREVRRLLEEQNKMFASQKLSLVLDI 934
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	KSVYSN---	SONLEAGM	YSAHETAASGTGRSONTWGDVEHLFEGYDEQQKAA	IQRERARRIEEQNKMFAARKLCLVLDL 950
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	KSVVSS---	SONLQADM	ASAHETAASVTSRSTWGDVEHLFEGYDEQQKAA	IQRERARRIEEQNKMFAARKLCLVLDL 954
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	KEAVSE---	PSEVRNDAG	LASEKGSPGSLQPI	ISWGDVEHLFEGYSQQRADIQREARRLEEQKKMFVSRKLCVLDL 911
Beta vulgaris g12062.t1_белок	ASCSSGGPV	ITGNQRTV	SALRPEEVVSGRPSONMWDVEHLFDGYDDQQKAA	IQQERARRLDEQNKMFADRKLCVLDL 945
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	-----SN----	DAAPATTL	-GTRPPANQWGLDDLLNGYDDQQKAL	IQKERARRIMEQHTMFSSRKLCVLDL 930
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	-----SN----	DAAPATTL	-GTRPPANQWGLDDLLNGYDDQQKAL	IQKERARRIMEQHTMFSSRKLCVLDL 939
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	-----SN----	NAAPATTL	-GTRPPANQWGLDDLLNGYDDQQKAL	IQKERARRIMEQHTMFSSRKLCVLDL 939
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	-----QNADATT	TDASATEL	-EATOPVSPWGNLDHLLDGYDDKQKAL	IQKERARRITEQHKMFSAARKLCVLDL 891
Zea mays ZmCPL3_белок	-----QNADATT	TNGASATTL	-EATOPVSPWGDVDHLLDGYDDQQKAL	IQKERARRITEQHKMFSAARKLCVLDL 929
	1140	1160	1180	1200
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	DHTLLNSAKF	NEVESRHEE	ILRKKEEQDREKPYRHLFRFLHMGMMWTKLRPGIWNFLEKASKLYELHLYTMGNKLYATEMA	1014
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	DHTLLNSAKF	VEVOPVHDE	ILRKKEEQDREKPHRHLFRFPHMGMMWTKLRPGIWNFLEKASKLYELHLYTMGNKLYATEMA	1030
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	DHTLLNSAKF	VEVOPVHDE	ILRKKEEQDREKPHRHLFRFPHMGMMWTKLRPGIWNFLEKASKLYELHLYTMGNKLYATEMA	1034
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	DHTLLNSAKF	VEIDPVHEE	ILRKKEEQDREKPCRHLFRFPHMGMMWTKLRPGIWNFLEKASNLFELHLYTMGNKLYATEMA	981
Beta vulgaris g12062.t1_белок	DHTLLNSAKF	SEVOPVHDE	ILRKKEEQDREKPRRHLFRFPHMMWTKLRPGIWNFLEKASKLFELHLYTMGNKLYATEMA	1025
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	DHTLLNSAKF	IEVDP	IHEEILRKKEEQDRERSEHRLFRFHMMQMMWTKLRPGIWNFLEKASKLYELHLYTMGNKLYATEMA	1010
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	DHTLLNSAKF	IEVDP	IHEEILRKKEEQDRERSEHRLFRFHMMQMMWTKLRPGIWNFLEKASKLYELHLYTMGNKLYATEMA	1019
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	DHTLLNSAKF	IEVDP	IHEEILRKKEEQDWERSERHRLFRFHMMQMMWTKLRPGIWNFLEKASKLYELHLYTMGNKLYATEMA	1019
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	DHTLLNSAKF	IEVEPI	HEEMLRKKEEQDRTLPERHLRYFHMMNMWTKLRPGIWNFLEKASNLFELHLYTMGNKLYATEMA	971
Zea mays ZmCPL3_белок	DHTLLNSAKF	IEVEPI	HEEMLRKKEEQDRTLPERHLRYFHMMNMWTKLRPGIWNFLQKASNLFELHLYTMGNKLYATEMA	1009

Фиг. 1А (продолжение)

		1220	1240	1260	1280
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	KLLDPKGVLFNGRYISKGDDG-----DPLDGDERVPKSKDLEGVMGMESSVVI	DDSVRVWPHNKLNL	IAVERYLYFP	1087	
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	KVLDPKGLLFAGRYISRGDDT-----DSVDGEERAPKSKDLEGVLGMESSVVI	DDSVRVWPHNKLNL	IVVERYTYFP	1103	
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	KVLDPKGVLFAGRYISRGDDT-----DSVDGEERVPKSKDLEGVLGMESSVVI	DDSVRVWPHNKLNL	IVVERYTYFP	1107	
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	KLLDPKGLFAGRYISRGDDG-----DPFDGDERVPKSKDLEGVLGMESAVVI	DDSVRVWPHNKLNL	IVVERYTYFP	1064	
Beta vulgaris g12062.t1_белок	KVLDPKGTLFAGRYISRGDDG-----DPIDGDERVPKSKDLEGVMGMESSVVI	DDSVRVWPHNKLNL	IVVERYTYFP	1098	
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	KVLDPSGTLFAGRYISRGDDGISRGDDGDTFSDDRVPKSKDLGVLGMESAVVI	DDSVRVWPHNKNM	IVVERYTYFP	1090	
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	KVLDPSGTLFAGRYISRGDDGISRGDDGDTFSDDRVPKSKDLGVLGMESAVVI	DDSVRVWPHNKNM	IVVERYTYFP	1099	
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	KVLDPSGTLFAGRYISRGDDGISRGDDGDTFSDDRVPKSKDLGVLGMESAVVI	DDSVRVWPHNKNM	IVVERYTYFP	1099	
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	KVLDPTGTLFAGRYISRGDDG-----DPFDSDERVPKSKDLGVLGMESAVVI	DDSVRVWPHNRHNL	IVVERYTYFP	1044	
Zea mays ZmCPL3_белок	KVLDPTGTLFAGRYISRGDDG-----DPFDSDERVPKSKDLGVLGMESAVVI	DDSVRVWPHNRHNL	IVVERYTYFP	1082	
		1300	1320	1340	1360
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	CSRROFGLPGPSLLELDROEYPEEGLASSLAVIEKIHQNF	FSHTSLDEVDYRNILASEQRKILAGCRIVFSRI	IPVGEA	1167	
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	CSRROFGLPGPSLLELDHDERPEAGTLASSLAVIEKIHQIFFASRSLEEVDYRNILASEQRKILAGCRIVFSRVFPVGEA	1183			
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	CSRROFGLPGPSLLELDHDERPEAGTLASSLAVIEKIHQIFFASRSLEEVDYRNILASEQRKILAGCRIVFSRVFPVGEA	1187			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	CSRROFGLPGPSLLELDHDERPEAGTLASCLGVIQRIHQNF	FAHRSIDEADYRNILATEQKKILAGCRIVFSRVFPVGEA	1144		
Beta vulgaris g12062.t1_белок	CSRROFGLPGPSLLELDHDERPEEGLASSLAVIEKIHQNF	FSHKSLLDDYDYNILGAEQRKILAGCRILFSRVFPVGEA	1178		
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	CSRROFGLPGPSLLELDHDERPEAGTLASSLAVIGRIHQNF	FSHPNLNDADYRSILSSEQRILAGCRIVFSRI	IPVGEA	1170	
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	CSRROFGLPGPSLLELDHDERPEAGTLASSLAVIGRIHQNF	FSHPNLNDADYRSILSSEQRILAGCRIVFSRI	IPVGEA	1179	
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	CSRROFGLPGPSLLELDHDERPEAGTLASSLAVIGRIHQNF	FSHPNLNDADYRSILSSEQRILAGCRIVFSRI	IPVGEA	1179	
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	CSRROFGLPGPSLLELDHDERPEAGTLASSLAVIERIHNNF	FSHPNLNEADYRSILASEQRILAGCRIVFSRVFPVGEA	1124		
Zea mays ZmCPL3_белок	CSRROFGLPGPSLLELDHDERPEAGTLASSLAVIERIHNNF	FSHPNLNEADYRSILASEQRILAGCRIVFSRVFPVGEA	1162		
		1380	1400	1420	
Arabidopsis thaliana AtCPL3_белок	KPHLHPLWQTAEQFGAVCTTOVDEHVTHVVTNSLGTOKVNWAL	TRGRFVVHPGWVEASAFLYQRANENLYA	INP-	1241	
Glycine max Glyma.18g282300.2_белок	NPHLHPLWQTAEQFGAFCTNQIDEQVTHVVANS	PGTDKVNWALNNGRFVVHPGWVEASALLYRRANEQDFAIKP*	1258		
Glycine max Glyma.08g257900.1_белок	NPHLHPLWQTAEQFGAVCTNQIDEQVTHVVANS	PGTDKVNWALNNGRFVVHPGWVEASALLYRRANEQDFAIKP*	1262		
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_белок	NPHLHPLWQTAEQFGAVCTNQIDQVTHVVANS	LGTDKVNWALSTGRFVVHPGWVEASALLYRRANEHDFAIK-S	1218		
Beta vulgaris g12062.t1_белок	NPHLHPLWQTAEQFGAVCTNOLDEQVTHVVANS	LGTDKVNWALSTKRFVVHPGWVEASALLYRRVNEQDFAIKT*	1253		
Triticum aestivum TaCPL3-B_белок	NPHLHPLWQTAEQFGAVCTNQIDRVTHVVANS	LGTDKVNWALQTRFVVHPGWVEASALLYRRANEHDFAVK*-	1244		
Triticum aestivum TaCPL3-D_белок	NPHLHPLWQTAEQFGAVCTNQIDQVTHVVANS	LGTDKVNWALQTRFVVHPGWVEASALLYRRANEHDFAVK*-	1253		
Triticum aestivum TaCPL3-A_белок	NPHLHPLWQTAEQFGAVCTNQIDRVTHVVANS	LGTDKVNWALQTRFVVHPGWVEASALLYRRANEHDFAVK*-	1253		
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_белок	SPHLHPLWQTAEQFGAVCTNLVDDRTHVVANS	PGTDKVNWALS	SKGKFVVHPGWVEASALLYRRANEHDFAVK*-	1197	
Zea mays ZmCPL3_белок	SPHLHPLWQTAEQFGAVCTNLVDDRTHIVANS	PGTDKVNWALS	SKGKFVVHPG-VEASALLYRRANEHDFAVK*-	1235	

Фиг. 1А (продолжение)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtCPL3_белок	1		44,65	44,19	42,84	42,12	36,65	36,65	36,80	36,23	35,71
<i>Glycine max</i> Glyma.18g282300.2_белок	2			92,36	49,50	48,16	37,57	37,59	37,88	37,51	37,10
<i>Glycine max</i> Glyma.08g257900.1_белок	3				49,50	48,19	37,53	37,55	37,76	37,39	37,05
<i>Solanum tuberosum</i> PGSC0003DMT400052897_белок	4					48,35	38,53	38,33	38,48	38,85	37,59
<i>Beta vulgaris</i> g12062.t1_белок	5						36,70	36,65	36,86	36,14	35,67
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-B_белок	6							97,29	96,09	64,38	63,19
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-D_белок	7								96,81	64,69	63,50
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-A_белок	8									64,15	63,11
<i>Sorghum bicolor</i> Sb05g019010.1_белок	9										88,33
<i>Zea mays</i> ZmCPL3_белок	10										

Фиг. 1В

	260	280	300	320
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtCPL3_CDS	AGGAGGAGGTGGTGGTGGTTCTAATGGCAACTCTAGGGTTTGGACAATGGAGGAGTTGATTTCTCAGTATCCTGCTTACC	277		
<i>Glycine max</i> Glyma.18g282300.2_CDS	T-----AAGCCCAA----TGGAACTGATGCTAGGGTTTGGGCTGTTTCATGATCTTTACTCAAAGTACCCTACCATAT	235		
<i>Glycine max</i> Glyma.08g257900.1_CDS	T-----AAGCCCAA----TGGAACTGATGCTAGGGTTTGGGCTGTTTCATGATCTTTACTCAAAGTACCCTACTATAT	235		
<i>Solanum tuberosum</i> PGSC0003DMT400052897_CDS	TCAAAATCAAAATTGGA---CGACGACGA--CTAGGGTTTGGACGATGAGAGATGCATAT---AAATATCCAATT--T	208		
<i>Beta vulgaris</i> g12062.t1_CDS	CGGATTC---ATCGAA---TAAAAAGATAATAACAGTTATTGGATGAGAGATCTGTACAAGTATTCATCGTACAGAG	178		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-B_CDS	CCAGTGGCACC GCCGCTGCGTCGGCGTCGTCCGAGAGATCTAGGGTTTGGATGGG-----ATAC--ACCATGT	253		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-D_CDS	CCAGTGGCACC GCCGCTGCGTCGGCGTCGGCCGAGAGATCTAGGGTTTGGATGGG-----ATAC--ACCATGT	253		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-A_CDS	CCAGTGGCACC GCTGCTCGTCGGCGTCGTCCGAGAGATCTAGGGTTTGGATGGG-----GTAC--ACCATGT	253		
<i>Sorghum bicolor</i> Sb05g019010.1_CDS	TGGGCGGCCCCGCGCGCGCGCGCTCGGGGCGAGAGATCTAGGTCTTGGGTGGGTCCGCCCGCCGTGGGT--TACATGG	229		
<i>Zea mays</i> ZmCPL3_CDS	TGGGCGGC-----GCGGCGGCGCGCGCGGGGCGGAGATCTAGGTCTTGGGTGGCCCCGCCGCGCGTGGGT--TACATGG	274		
	340	360	380	400
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtCPL3_CDS	GTCCATATGCGAATTGCGGTTTATCTAATTTAGCTTGGGCTCGAGCTGTGCAGAACAACCTTTTAAATGAAGGTTTGGTA	357		
<i>Glycine max</i> Glyma.18g282300.2_CDS	GTGCTGGCTATGCATCGGGTTTGTATAACCTTGCTTGGGCACAGGCCGTGCAGAACAAGCCTTTGAATGATATTTTGTG	315		
<i>Glycine max</i> Glyma.08g257900.1_CDS	GTGCGGGCTATGCATCGGGCTTGTATAATCTTGCTTGGGCACAGGCCGTGCAGAATAAGCCTTTGAATGATATTTTGTG	315		
<i>Solanum tuberosum</i> PGSC0003DMT400052897_CDS	CTAGGGATTATGCTAGAGGTTTGTATAACCTGGCTTGGGCTCAGGCTGTGCAGAATAAGCCTTTAGACGAACCTATTCGTC	288		
<i>Beta vulgaris</i> g12062.t1_CDS	GATATGGCGCTGCGTCAGGTTTATACAATTTAGCATGGGCGCAAGCAGTACAGAATAAGCCATTGAATGAGGTACTTGTT	258		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-B_CDS	CCGGGAGTTATGCGCGGGCGTTCCACAGCTTTGCTTGGGCGCAGGCTGTGCAGAACAAGCCTCTCGTTCCGCGGCC----	329		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-D_CDS	CCAGGAGTTATGCGCGGGCGTTCCACAGCTTTGCTTGGGCGCAGGCTGTGCAGAACAAGCCTCTCGTTCCGCGGCC----	329		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-A_CDS	CCGGGAGTTATGCACGGGCGTTCCACAGCTTTGCTTGGGCGCAAGCTGTGCAGAACAAGCCTCTCGTTCCGCGGCC----	329		
<i>Sorghum bicolor</i> Sb05g019010.1_CDS	CGCGGAACCTTTGGCAGCCCTTCAACAGCTTCGCGTGGTCGCAGGCCGTGCGGAACAAGCCGCTGGCGTTACAGCCGCC	309		
<i>Zea mays</i> ZmCPL3_CDS	CCCGGAACCTTTGCTATGCCTTCAATAGCTTTGCGTGGTCGCAGGCCGTGCGGAATAAGCCGCTGGGGCTACAACCGCC-	353		
	420	440	460	480
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtCPL3_CDS	ATGG-----ATTATGAACCAAGA	375		
<i>Glycine max</i> Glyma.18g282300.2_CDS	ATGGAAGTGGACTCTGATGCCAATGCTAACAGTAACAGCAACAACCTCCAATCGACTGGCCTCTGTTGCTGTGAATCCTAA	395		
<i>Glycine max</i> Glyma.08g257900.1_CDS	ATGGAAGTGGACTCTGATGCCAATGCTAACAGTAACCGCAACAGCTCCCATCGACTGGCCTCTGTTGCTGTGAATCCTAA	395		
<i>Solanum tuberosum</i> PGSC0003DMT400052897_CDS	ATGA-----CTAGTGACAATTCCAACCAAGTGTGCTAAT-----GCTAATGCTAATGTTGAATCCAA	344		
<i>Beta vulgaris</i> g12062.t1_CDS	GAGCTGGATGATAAGAAAAACAATAAAATGCAAGTACTGATGATACTAGT--GTTAATAAGGAACAAGGTGAAGTACAA	336		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-B_CDS	-----TG---CCGACGAGGA	341		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-D_CDS	-----TGTTGCCGACGAGGA	344		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-A_CDS	-----TGCTGCCGACGAGGA	344		
<i>Sorghum bicolor</i> Sb05g019010.1_CDS	CC-----TGCTCGGACGAGGA	326		
<i>Zea mays</i> ZmCPL3_CDS	-----TGCCCCAGACGACGA	368		

Фиг. 2А (продолжение)

		500	520	540	560
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	GAGAGTGATA-----AGATTGTGATTGAAGATAGTATGATGAGAAAGAAGAAGGTGAGTTGGAGGAAGGTGAAAT	446			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	GGATGTGGTG-----GTGGTGGATGTGGAC-----AAAGAGGAAGGGGAGTTAGAGGAGGGTGAGAT	452			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	GGATGTGGTG-----GTGGTGGATGTGGAC-----AAAGAGGAAGGGGAGTTGGAGGAGGGTGAGAT	452			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	GGTCATCATT-----GATGTGGATGTGGATGACGATGCTAAAGAGGAAGGAGAGTTGGAGGAAGGCCGAGAT	410			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	CAACATTGTGTGAAAAGTAAAGAGGTTTTTGAAGTGGTTGACAGTCAGAAAAGAAGAAGGAGAATTGGAAGAAGGCCGAAAT	416			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	CGAAGTAGAGC-----ATCTCGTGGACGCCCTCGGACGAGGAGAAGGAAGAGGGCCGAGATTGAGGAGGGGGAGGC	410			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	CGAGGTAGAGC-----ACCTCGTGGACGCCCTCGGACGAGGAGAAGGAAGAGGGCCGAGATTGAGGAGGGGGAGGC	413			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	CGAGGTAGAGC-----ACCTCGTGGACACCTCGGACGAGGAGAAGGAAGAGGGCCGAGATTGAGGAGGGGGAGGC	413			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	CGAGGTGGAGC-----ATGCCGTGGACGCGTCCGACGGGGAGAAGGAGGAGGGCCGAGATTGAGGAGGGGGAGGC	395			
Zea mays ZmCPL3_CDS	CGAGGTGGAGC-----ACGCCGTGGACGTCTCCGACGGAGAGAAGGAAGAGGGCCGAGATTGAGGAGGGGGAGGC	437			
		580	600	620	640
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	TGATTTGGTCGACAATGCTTCTGATGACAATTTGGTTGAGAAGGATACTGAATCTGTTGTGTTGATAAGTGCTGATAAAG	526			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	TGATGCCGACGGCGAAOCTGAAGGAGA-----AGCAGAGAGTGTTGTGGCTGTTCTGTTGTTTCTGATTCAAGAGAAGC	526			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	CGATGCTGATGCCGAAACCCGAAGGAGA-----AGCAGAGAGTGTTGTTGTGGCT-----GTTTCTGATTCTGAGAAGC	520			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	CGACTTGGATGCCG---CTGA-----CCTAGTTCTAA-----	439			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	CGATTTTGATTCTGATGATACTGGTAA-----TAATCATAATAGTAATGGTAATAAAGTTCAGGATGATTTTGG-----	495			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	CGTACAGTCC---ACTTCCCCTCCAATTAAGCAGCCTGAGGCCATCGACTTGGACTCTGATGCC-----CAGGACAAGT	481			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	CGTACAGTCC---ACTTCCCCTCCAATTAAGCAGCCTGAGACCATCGACTTGGACTCTGATGCC-----CAGGACAAGT	484			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	CGTACAGTCC---ACTTCCCCTCCAATTAAGCAGCCTGAGACCATCGACTTGGACTCTGATGCC-----CAGGACAAGT	484			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	TGTGGAGGCCGAGGCATCGCCTGCCCGCCGACAGCCTGAGACCATCGACTTGGACGGGGACGGGACGGCCTGGAGAAGT	475			
Zea mays ZmCPL3_CDS	TGTGGAGGCCCTGGCCTCGCCTGCTCCTGCCAGCCTGAGACCATCGATTTGGACTCCGACGCC-----CGGAGAGAAGT	511			
		660	680	700	720
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	TTGAA-----GATGATCGAATTCTAAAGGAGAGAGATTTGGAG	554			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	TTGA-----TGATGTGAAGAGGGATGTTTCTAATTCTGAG	551			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	TTGA-----TGATGTGAAGATGGATGTTTCTGATTCCGAG	555			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	---A-----TTTTGAAAGGAGGCCAATTTGTTAGGGAA	471			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	-----TGGATTGGAGATGGATGATGGTGAGTTGGAG	516			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	CAGAGTCAGTGGCCATGGAGCA-----GACCCCTTTGGCCCTCGAGGGCGCTGATGAGCTGGATTTTGAC	546			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	CAGAGTCAGTGGCCATGGAGCA-----GACCCCTTTGGCCCTCGAGGGCAGCTGATGAGCTGGATTTTGAC	549			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	CAGAGTCAGTGGACATGGAGCA-----GACCCCTTTGGCCCTTGAGGGCGCTGATGAGCTGGATTTTGAC	549			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	CAGAGTCGCTGGCTG-----GTGCTGTGCCCTGCCCTCTGCTGCTGAGGAAG---AGGAGGTGAACCTTGAT	537			
Zea mays ZmCPL3_CDS	CAGAGTCGGTGGCTATCGATGGAAGTCCAGTGTGTGCCCTGTCCAGCTGCTGAGGAAG---AGGAGGTGAACCTTGAT	598			

Фиг. 2А (продолжение)

		740	760	780	800
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	AAGAAAGTGAAACTAATTCGTGGTGTGTTTGGAGAGTACTTCGTTGGTAGAAGCACAGACCGGATTTGAAGGAGTTTGTTC	644			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	CA-----GCTTGGTGTGAGGGGTGTTCTGGAGGGTGTACCGTTGCTAATGTGGCGGAGTCGTTTGCTCAAACCTTGACAG	635			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	CA-----GCTTGGTGTGAGGGGTGTTCTGGAGGGTGTACCGTTGCTAATGTGGTTGAGTCGTTTGCTCAAACCTTGACAG	629			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	CA-----ACTTC-----AGAGTGTTACTCTAGACGAAACCCACAAATCCTTTTCTATGGTTTGTTC	527			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	AATCAAGTGTCCTTCTATTCGTAAAGTTCTTCATAATGTTACTGTTGCTGAAGCTCATAAATCATTGATATTGTGTGTGC	596			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	CAGCCCGTGGGGAGTATACTGGAGGAGCTTGAGAGGCTTTCCATTGAGGAAGCTGAGAAGTCATTTGAGGGTTCGTGTGT	626			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	CAGCCCGTGGGGAGTATACTGGAGGAGCTTGAGAGGCTTTCCATTGAGGAAGCTGAGAAGTCATTTGAGGGTTCGTGTGC	629			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	CAGCCCGTGGGGAGTATACTGGAGGAGCTTGAGAGGCTTTCCATTGAGGAAGCTGAGAAGTCATTTGAGGGTTCGTGTGC	629			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	CAGCGTGTCGGCAGTATACTGGAGGAGCTTGAGATGGTCTCCATTGAGGAAGCCGAGAAGTCCTTTGAGGGTGCATGTGG	617			
Zea mays ZmCPL3_CDS	CAGCGTGTCGGGGAGTATACTGGAGGAGCTCGAGATGGTCTCCATTGAGGAAGCTGAGAAGTCGTTGAGGGTGCATGGGC	669			
		820	840	860	880
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	CAGAATATTGGGGCGTT-----A----GAGTCTTTCGAGAGCTGGTTTTCAGATAATGATGATTTTCCGAAGAGGGATA	715			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	TAAGCTGCAAAATGCTCT-----TCCTGAAGTGCTCTCTAGACCTGCTGATTCT-----GAG-----AGGGATG	664			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	TAAGCTGCAAAATACCT-----TCCTGAAGTGCTCTCTAGACCTGCTGGTTCT-----GAG-----AAGGATG	669			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	CAAATTGCAAACTTCATT-----ACT---GGCCTTGGGGGAACTAGCTCTTCTCAAGACAAG-----AATGACA	569			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	TCGATTGAGGACTTCTTT-----G---GAGACGTTGAGAGA---GTTGGTTTTGCATACATGGTTTCCCTTCCAAAGACG	664			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	CGGCCTGCGGTCTTGTGTTTGAGAGCCCTTAAGCCGCTGTTCC-----CAGAGAGCGGTAGCCCGATGCCTATGCTTGATG	700			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	CGGCCTGCGGTCTTGTGTTTGAGAGCCCTTAAGCCGCTGTTCC-----CAGAGAGCGGTAGCCCGATGCCTATGCTTGATG	703			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	CGGCCTGCGGTCTTGTGTTTGAGAGCCCTTAAGCCGCTGTTCC-----CAGAGAGCGGTAGCCCGATGCCTATGCTTGATG	703			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	ACGACTGCATACCTGCTTTGAGAACCTGAAGCCGCTGTTCCAGGAACCTGGAGAACGGGAGCCCGATGGCTATCTTGAAC	697			
Zea mays ZmCPL3_CDS	ACGACTGCATACCTGCTTCGAGAACCTGAAGCCCTGTTCCAGGAACCTGGAGAACGGGAGCCCGATGGCTATCTTGAAC	749			
		900	920	940	960
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	CTTTAGTTCAATTGTCAATTGCTTCTCTTCAAACCATTAACCTATGTGTTTTGCTCGATGAACAATATTTCCAAGGAGCGT	795			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	ATCTCGTTGCGCTGTCAATTAACGCTACTGAAGTGGTTTATTCTGTGTTTTGCTCCATGGACTCTTTAAAAAAGGAACAG	774			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	ATCTCGTTGCGCTGTCAATTAATGCTACTGAAGTGGTTTATTCTGTGTTTTGCTCTATGGACTCTTCGGAGAAACAACAG	768			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	TTCTTATTCAACTCTTTATGACTGCACTCCGAACCATTAATTCTGTTTTTACTCCATGAACCAGGATCAGAAGCAACAA	669			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	CGCTCATTCAACAAGCTTTTGTGCAATTGAGTGTGTATACTCTGTTTACAGTTCTATGAGCCCTACCTTAAGAGATCAG	744			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	CTCTTGTCGAACAGGCTTTTGTGGAATCGACACCATCACCACCTGTAGCTAATTCATATGCGATGCCGAAGAGGGAGCAG	780			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	CTCTTGTCGAACAGGCTTTTGTGGAATCGACACCATCACCACCTGTAGCTAATTCATATGCGATGCCGAAGAGGGAGCAG	783			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	CTCTTGTCGAACAGGCTTTTGTGGAATCGACACCATCACCACCTGTAGCTAATTCATATGCGATGCCGAAGAGGGAGCAG	783			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	CCCTCATGCAGCAGGCGTTTATTGGAATTGACACACTCACCACCTGTGGCGATTTGCTATAACTTGCCGAGGAGTGAGCAG	777			
Zea mays ZmCPL3_CDS	CCCTCATGCAGCAGGCGTTTATTGGAATTGACACACTCACCACCTGTGGCGAATTTGTATAACTTGCCGAGGAGGAGCAG	828			

Фиг. 2А (продолжение)

	980	1000	1020	1040
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtCPL3_CDS	AATAAGGAGACTATGTCAAGATTGCTGACTCTTGTAAATGACCATTTTT--CCCAATTTCTCTCATTCAACCAGAAAAA	872		
<i>Glycine max</i> Glyma.18g282300.2_CDS	AACAAGGATAGCATATTAAGATTACTTTCTTTTGTGAAGGATCAACAACAGGCTCAATTATTTTCTCCAGAGCATATAAA	854		
<i>Glycine max</i> Glyma.08g257900.1_CDS	AACAAGGATAGCATATTAAGATTGCTTTCTTTTGTGAAGGATCAACAACAGGCTCAATTATTTTCTCCAGAGCATATAAA	848		
<i>Solanum tuberosum</i> PGSC0003DMT400052897_CDS	AACACAGATATTCTATCTAGGTTGCTTTTTTCATGCAAAGACACAATTACCTGCTCTTTTGTCTTCT--GAGCAGTTAAA	746		
<i>Beta vulgaris</i> g12062.t1_CDS	AATAAGGATAGGATGTCAAGGTTGCTTACTTTTGTGTCATGGACCTTAGTTCTGTTTCTTTTACACCGGAACAGAGGAA	821		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-B_CDS	AACAAGAACATGCTGTTGAAGCTGCTGTTTCACATAAAGAACAGATATTCAGACA---TGCTGGCACTCAACCAGCGAGA	857		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-D_CDS	AACAAGAACATGCTGTTGAAGCTGCTGTTTCACATAAAGAACAGATATTCAGACA---TGCTGGCACTCAGCCAGCGAGA	860		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-A_CDS	AACAAGAACATGCTGTTGAAGCTGCTGTTTCACATAAAGAACAGATATTCAGACA---TGCTGGCACTCAACCAGCGAGA	860		
<i>Sorghum bicolor</i> Sb05g019010.1_CDS	AATAAGACAACGCTTTTGAAGTCGTTGTTCCACATAAAGAACAGATATTCAGACA---TGCTGACTCCCGAGCAGCGAGA	854		
<i>Zea mays</i> ZmCPL3_CDS	AATAAGACAACACTTTTGAAGTTGTTGTTCCACATAAAAAACAGATATTCGGACA---TGCTGACGCTGAGCAGCGAGA	905		
	1060	1080	1100	1120
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtCPL3_CDS	TGAGATAGAGACCATGAATCAGGATTTAAGCCGTTCTGCTATTGCAGTTTTTGTCTGGAAACCAGCAGTGAAGAGAATG--	949		
<i>Glycine max</i> Glyma.18g282300.2_CDS	AGAGATCCAGGGCATGATGACTGCAATTGATTATTTTGGTGGCTTTAGTTAATAGTGAGGCTATTGGCAAGGAGAAAGAAT	934		
<i>Glycine max</i> Glyma.08g257900.1_CDS	AGAGATCCAGGGCATGATGACTGCAATTGATTCTGTTGGTGGCTTTAGTTAATAGTGAGGCTATTGGCAAGGAGAAAGAAT	929		
<i>Solanum tuberosum</i> PGSC0003DMT400052897_CDS	AGAGGTGGATGCTGTGATTCTCTCTATTAACCAGTCAGCTGTTTTCTCAAATACTCAAGACAATGACAAGGTCAATGGGA	929		
<i>Beta vulgaris</i> g12062.t1_CDS	AGAGGTGGAGGGTATGATTACCTCTGTTAAGCCCCCGATTGTTCCAGTGAAACCCGAAGTCGAGGGACAGGCAGGAAGAAT	901		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-B_CDS	TGAGCTTGATAGTGGTGTGAGACAGTTAGTTTTTGTAGATGGAGAAGAACCATGCCGGTT-----CCAATTGTAG--	926		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-D_CDS	TGAGCTCGATAGTGGTGTGAGACAGTTAGTTTTTGTAGATGGAGAAGAACCATGCCGGTT-----CCAATTGTAG--	929		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-A_CDS	TGAGCTCGATAGTGGTGTGAGACAGTTAGTTTTTGTAGATGGAGAAGAACCATGCCGGTT-----CCAATTGTAG--	929		
<i>Sorghum bicolor</i> Sb05g019010.1_CDS	CGAGTTGGACAGCCGGCTGAGGAAGTTAGTTTTTGGAGA---AAAAGACAATGTGAGTGACCCAAGTACAAGTAGTGG--	929		
<i>Zea mays</i> ZmCPL3_CDS	AGAGATGGACAGCCGGCTGAGGAAGTTAGTTTTTGGAGA---GAAAGACAATGTGAGTGACCCAAGTACCAGTTGTGG--	980		
	1140	1160	1180	1200
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtCPL3_CDS	-----TTAATCAAATGACTCAGCCGAGT--	972		
<i>Glycine max</i> Glyma.18g282300.2_CDS	TGCAGACCACTG-----TGCAGACCCATGAGATAAAGACTCAGGAAAATCA	980		
<i>Glycine max</i> Glyma.08g257900.1_CDS	TGCAGACCACTGAGATAAAGACTCAAGAAAATTCAGCTGTAG-AAGTGCAATCCATGAGATAAAGACTCAGGAAAATCA	1007		
<i>Solanum tuberosum</i> PGSC0003DMT400052897_CDS	TCAAAGTTGTTGAAGCTGTTAGATAAGAAAGGTTTTCTCATA-----AATGCTCTGAAAATGCAAAATCAGGATTTTAC	896		
<i>Beta vulgaris</i> g12062.t1_CDS	TGCTGTTACAGAGAAGGCTATCCTCACCGATTCTAATACATTGACTGTGAATACTGGTGACAATAAGTCAGACTTAT--	979		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-B_CDS	-----CTCCAAAACAGTGAATTTGGTTGTTCC	953		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-D_CDS	-----CACCAAAAACAGTGAATGTGGTTGTTCA	956		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-A_CDS	-----CACCAAAAACAGTGAATGTGGTTGTTCC	956		
<i>Sorghum bicolor</i> Sb05g019010.1_CDS	-----CACCAATGCGATAAATGTTTTGGCTCC	956		
<i>Zea mays</i> ZmCPL3_CDS	-----CACCACTGCGATAAATGTTTCAGCTCC	1007		

Фиг. 2А (продолжение)

		1220	1240	1260	1280
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	-----AATGGTGATTCTTTTCTT-----GCCAAAAAGCTGACTTCAGAAAGTA	1015			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	AGCTGTAGAAGCTGCTGAATTGATTTCT---TATAATAAGCCTTTGCAT---AGTGACATAATTGGGGCATCACATGCTT	1054			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	GGCTGTAGAAGCTGCTGAATTGATTTCT---TATAGTAAGCCTTTGCAT---AGGGACATAACTGGGACATCACAGGCTT	1081			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	TGCTGTAAACAAGTATGATTTAGGTGCTGTATCTATCAAATCTTCAGGCCTGAAGGAACAGAGTGTGTCAATTTGAATCTG	978			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	---TGAAGAAAGTGG-GACCCGAATTGTCTGTTTATCAG---TCGGAAAAAAGAACAACACTGACATTTTATCAGAAACAA	1051			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	ATCTGGACAGGTTCCAT---CAGATAGACTGCCAGTCGAGTC---AGGAGCAGCAAATCCACTTGGGGGCTCTAGTTTC	1026			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	ATCTGGACAGGTTCCAT---CAGATAGACTGCCAGTCGAGTC---AGGAGCAGCAAATCCACTTAGGGGCTCTAGTTTC	1029			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	ATCTGGACAGGTTCCAT---CAGATAGACTGCCAGTCGAGTC---AGGAGCAGCAAATCCACTTAGGGGCTCTAGTTTC	1029			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	ATCTGGGCAGGTCTCATCCTCAGGAGGACTGCCATTTGAATC---AGGTGCAGCAAATCCATTTAG-----TAGCTTG	1026			
Zea mays ZmCPL3_CDS	ATCTGGGCAGGTTTCAAACACAGGAGGACTGCCATTTGAATC---AGGTGCAGCAAATCTATTTAG-----TAGCTTG	1077			
		1300	1320	1340	1360
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	CACATCGAGGAGCCGCCTACTTAAGGAGTAGGTTGCCTATGCTGCCTCTTCTAGACCTTCATAAGGATCATGATGCAGAC	1095			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	TAAAATTTGGACAAAATAGTATTTAAAGGTAGAGGGGTTCTGCTCCCTCTGTTAGACCTTCACAAGGATCATGATGCTGAC	1134			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	TAAAATTTGGACAAAATAGTATTTAAAGGCAGAGGGGTTCTGCTCCCTCTGTTAGACCTTCACAAGGATCATGATGCAGAC	1161			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	TAAAACCAGGATTAGCCAATTTCTAAAGCTAAAGGTTATCCATTCTTTGCTAGACCTCCATAAGGACCATGATGAAGAT	1056			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	TGAGACATTTCCGTCTAGCTTAAAGGTGAGGAGGAGTTTCGGCCCTCTGCTTGATCTCCATAAAGTTCATGATGAAGAC	1131			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	CCTAGCTGGGAGATACCGGCG--ATAATAGAATGGTT--AGCCCTTGTGGACCTTCATGCAGATTATGACGAGAAC	1101			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	CCTAGCTGGGAGATACCGGCG--ATAATAGAATGGTT--AGCCCTTGTGGACCTTCATGCAGATTATGACGAGAAC	1104			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	CCGAGCTGGGAGATACCGGCG--ATAATAGAATGGTT--AGCCCTTGTGGACCTTCATGCAGATTATGACGAGAAC	1104			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	CCGAGCTTGGAAGTACCTGCC--AA-----AAGGATT--AGTCCCTTGTGGATCTTCATGCAGATTATGATGAAAC	1095			
Zea mays ZmCPL3_CDS	CCAAGCTTGGAAGTACCTGCC--AA-----AAGGAAT--AGTCCCTTGTGAATCTTCATGCAGATTATGATGAGAAC	1146			
		1380	1400	1420	1440
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	AGCCTTCCGTGCGCCACAAGGGAAACAACACCAAGTTTACCTGT----AAATGGTCGCCATACA-----ATGGTTA	1182			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	AGTTTACCATCACCAACCCGAGAAGCACCCCTCATGCTTCCCTGT-GAATAAATTACTTTCCGTTGGAGAGCCTATGGTTA	1213			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	AGTTTACCATCACCAACTCGAGAAGCACCTTCTGCTTCCCTGT-GAATAAGTTACTTTCTGTTGGAGAGTCTATGGTTA	1240			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	ACTCTTCCGTGCGCTACACGAGAGATTGGACCACAGTTCCCTGTTGCAAAAGCTACACAGGCTCATGGA----ATGGTGA	1132			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	AGCCTTCCATCTCCTACGAGCAAGACAATGCCCTTCCTTGGCTTTCTTTGAAACGGGCTCCTCCTCGAGTAGTGCATGGTTT	1211			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	AGCTTACCCTCACCCACCCGAGATAGTGCACCACCTTTTCTGT-GCCAAAGCCCATTTGGATTTGGATTATTTCCAATGG	1180			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	AGCTTACCCTCACCCACCCGAGATAGTGCACCACCTTTTCTGT-GCCAAAGCCCATTTGGATTTGGAGTATTTCCAATGG	1183			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	AGCTTACCCTCACCCACCCGAGTATAGTGCACCACCTTTTCTGT-GCCAAAGCCCATTTGGGTTTGGAGTATTTCCAATGG	1183			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	AGCTTACCATCGCCAACCCAGGAGATATGCACCACCTTTTCTGT-GCCAAAGCCCATTTGGTTTTGGAGCATTTCCAATGG	1174			
Zea mays ZmCPL3_CDS	AGCTTACCCTCGCCAACCCGGGACAATGCACCACCTTTTCTGT-GCTAAAGCCCATTTGGTTTTGGAGCATTTCCAATGG	1225			

Фиг. 2А (продолжение)

		1460	1480	1500	1520
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	GACCAGGTTTTCCCGTTGGTAGAGAGAGCCAAACGAC-----TGAGGGTGCCAAAGTCTATTTCATATGAG	1227			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	GTTCTGGGTGAGCAGCTGCTAAGCCGGAGTCTGGAAAGATGGAAGTTGATAGTGAAGGTTCTAAATTTTCATCTCTATGAA	1293			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	GATCTGGGTGAGCAGCTGCTAAG-----ATGGAAGTTGATAGTGAAGGTTCTAAATTTTCATCTCTATGAA	1305			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	AACCTGCACTTGCTATTTTCCG-----GGTTCTCTGAGAAAGGGAATTTCTTTATTGCACTCCTTATGAA	1197			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	GC-----AGAAATCTGGTGTGCACCCTTATGAA	1239			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	CACCTGACAGATATTTTTCGGCGGAAAG-----AGTTGATCCTTCGAAAAAAGTTCTGTATCCATGTGTG	1245			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	CACCTGACAGATATTTTTGGCGGAAAG-----AGTTGATCCTTCAAAAAAGTTCTGTATACATGTGTG	1248			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	CACCTGACAGATATTTTTCGGCAGAAAG-----AATTGATCCTTCAAAAAATTTCTTTATCCATGTGTG	1248			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	TGCCTGAGAAATTATCTTTCCAGAAAG-----AGTTGAGCCTGCAAGAATTCGTTATATCCATCCTTA	1239			
Zea mays ZmCPL3_CDS	TACCTGAGAACTATCTTTCCAGACAG-----AGTTGAGCCTACAAAGAATTCGTTATATCCACCCCTTA	1290			
		1540	1560	1580	1600
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	AGTGATGCCCGTAAAGCAGTTTTCTACCTACCAGCAAAAATTTGGTCTTAATTCAGTGTTTAAGACAGATGACCTTCCAAG	1307			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	ACTGATGCTTTGAAAGCTGTTTCCACATATCAACAGAAAGTTTGGTCCAAGTTCCCTTTTTACAAATGATAAATTTCCAAG	1373			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	ACTGATGCTTTGAAAGCTGTTTCCACATATCAACAGAAAGTTTGGTCCAAGTTCCCTTTTTACAAATGATAAATTTCCAAG	1385			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	ACTGATGCCCTTAAAGCTGTTTCCCTCTTATCAACAAAAATTTGGTCCAAGTTCCCTTTTTGTTAGTGAACCTTCCAAG	1277			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	ACTGAAGCAGTGAAGCTGTGTCAAGCTACCAACAAAGATTTGGTCCGAGTACATTCTTAGCAACGGACATGCTTCCAG	1319			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	AATGATGCGCTAAAGGATGTTTCCCTCGTACCGACAGAAAGTATGGCCAGACATCTACCTTCGCAAGTGATGATCTTCCAAG	1325			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	AATGATGCGCTAAAGGATGTTTCCCTCGTACCGACAGAAAGTATGGCCAGACATCTACCTTCGCAAGTGATGATCTTCCAAG	1328			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	AATGATGCGCTAAAGGATGTTTCCCTCGTACCGACAGAAAGTATGGCCAGACATCTACCTTCGCAAGTGATGATCTTCCAAG	1328			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	AATGATCCTCTGAAGGCTGTCTCCTCATATCAGCAGAAAGTATGGCCAGAAATCTGTATTTCCAAGTGATGATCTGCGCAAG	1319			
Zea mays ZmCPL3_CDS	AATGATCCTCTGAAGGCTGTCTCCTCATATCAGCAGAAAGTATGGCCAGAAATCTGTATATCCAAGTGATGATCTACCAAG	1370			
		1620	1640	1660	1680
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	CCCAACCCCATCAGGAGAAO---CTAAT-----GATGGCAATGGAGACGTTGGTGGAGAGGTTTCCAGTTCT-----	1371			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	TCCAACCTCCTTCAGGTGACTG---TGAG-----GATGAGATTGTTGATACAAACGAGGAGGTCTCTAGTGCT-----T	1438			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	TCCAACCTCCTTCAGGTGACTG---TGAA-----GATGAGGTTGTTGATACAAACGAGGAGGTCTCTAGTGCT-----T	1450			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	TCCAACCTCCTCTGAAGAGGG---TGAT-----AGTGGCAAGGGGACATTGGTGGGAGGTCACCAGTCTT-----G	1342			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	TCCAACCTCCTTCTGAAGATGGCAATGAA-----GGAGGAGCTGATGACTCTAATGAAGAGGTTTCTAGTTCTAATGCTT	1393			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	CCCAACCCCATCTGATGATGGTGATAAATCTGGAGACAAAGAAGGTGATATATTTGGTGAAGTTTCAAGCTTTTCAGCTT	1405			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	CCCAACCCCATCTGATGATGGGGATAAATCTGGAGACAAAGAAGGTGATATATTTGGTGAAGTTTCAAGCTTTTCAGCTT	1408			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	CCCAACCCCATCTGATGATGGGGATAAATCTGGAGACAAAGAAGGTGATATATTTGGTGAAGTTTCAAGCTTTTCAGCTT	1408			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	TCCAACCTCCATCTGGTGATGAGGGTAAATCTGCAGATAAAGGTGGTGACATATTTAGTGAGGTTTCCAGCTTCCCTGTTT	1399			
Zea mays ZmCPL3_CDS	TCCAACCTCCATCTGGTGATGAGGGTAAACCTGCAGATAAAGGTGGTGATATATTTAGTGATGTTTCCAGCTTCCCTGTTT	1450			

Фиг. 2А (продолжение)

	1700	1720	1740	1760
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	- - GTTGTTAAGAGCTCGA - ACCCGGGGAGTCACCTAATTTATGG - - GCAAGACGTTCCCTCTGCCCTCCAATTTTAAATCT	1446		
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	CTACTGGTGATTTTTTAACAAGCACTAAGCCAACTCTTTTGGATCTGCCACCTGTTTCTGCTACTTCC - - ACAGATAGG	1515		
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	CTACTGGTGATTTTTTAACAAGCACTAAACCAACTCTTTTGGATCAGCCACCTGTTTCTGCTACTTCC - - ATGGATAGG	1527		
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	ATGTTGTACATAATGCTAGGCATCTGAATGAATCTAGCATGGGCAACCAATATTGTCTTCTGTTCCCGAGACCAATATT	1422		
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	ATACTAATGTTGTTAGTAGGACAACAAATTCCTCTGTAGTGCCACAACCAAGTTGTTTCTTCTGCTGCTTATACAAGTAGT	1473		
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	CTAAT - - - - - CTGATACCTGCCCTCCCGACCTAGTGCAAGTTATCAGCAGCA - - - - -	1450		
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	CTAATAAGTCTGCTCCGCCAAGTGGAATCTGATACCTGCCCTCCCGACCTAGTGCAAGTTATCAGCAGCA - - - - -	1477		
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	CTAATAAGTCTGCTCCGCCAAGTGGAATCTGATGCTGCTTCCCGACCTAGTGCAAGTTATCAGCAGCA - - - - -	1477		
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	CAAAGAGTATTGCATTGCCAAGTACAAGCCAGATGCCTGCTTCTCAACCTAGCAGAGTCAGCAGCAGT - - - - -	1487		
Zea mays ZmCPL3_CDS	CAAAGAGTATTGTATTACCAAGTACAAGTCAGATGCCTGCTTCTCAACCTAGCAGAGTCAGCAGCAGCAGTATTAGTTAT	1630		
	1780	1800	1820	1840
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	AG - - - - - AAGCATGCCTGTTTGCAAAATTCGTTTCTAGCACTGTTCCACC	1490		
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	TC - - - - - CAGCTTGCATGGATTCAATAGTT - - - CTAGAGTTGATGCAGC	1556		
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	TC - - - - - CAGCATGCATGGATTCAATAGTT - - - CTAGAGTGGATGCAAC	1568		
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	CT - - - - - TGATGGACAAGGACTGGGAAGTC - - - CTCCGACTG - - - - C	1457		
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	TC - - - - - AACCATGCAAGGGGTGATCAGTGCTAGTGTGCTGAGAGTTT	1517		
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	- - - - - ATGACAGTTTTGCAGGTGGTCCCTCC	1475		
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	- - - - - ATGACAGTTTTGCAGGTGGTCCCTCC	1502		
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	- - - - - ATGACAGTTTTGCAGGTGGTCCCTCC	1502		
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	- - - - - GGTATTAGTTATGCATCTGGTCCACC	1493		
Zea mays ZmCPL3_CDS	GCTTCAAGTACAAGTCAGATGGCTGCTTCTCAACCTATCACAGTCAGCAGTAGCGGTATTAGTTATGGCTCTGGTCCACC	1610		
	1860	1880	1900	1920
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	ACATCATCTGTCAATTCATGCTATTTCTGCACCAACTGCCTCTGATCAGACAGTGAAACCTTCTGCAAAAGAGTCGAGATC	1670		
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	AGGTCCCTGGGTC - - - - - TTTGCC - - - AGTGAAAAGCTCT - - - - - GCAAAAGATAGAGATC	1603		
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	AGGTCCCTGGGTC - - - - - TTTCCC - - - GGTGAAAAGCTCT - - - - - GCAAAAGATAGAGATC	1616		
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	AGATCCTCTGAG - - - - - TTTTCT - - - GCCAAATCCTTCTTTGGGATCT - - - - - TCTACAGCAAAAAGTAGAGATC	1619		
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	TAGTGTCGGGTC - - - - - TTCTCCTTCACTGGGAGCCTCT - - - - - GCAAAAGAGCCGAGATC	1667		
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	AGGCTATG - - - CTAACAAATTTGAACAGTCTGTTTCAGGACCCAGCCATGCTCTTAAGCCTTCAGCTAAAAGTAGAGATC	1652		
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	AGGCTATG - - - CTAACAAATTTGAACAGTCTGTTTCAGGACCCAGCCATGCTCTTAAGCCTTCAGCTAAAAGTAGAGATC	1679		
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	AGGTTATG - - - CTAACAAATTTGAACAGTCTGTTTCAGGACCCAGCCATGCTCTTAAGCCTTCAGCTAAAAGTAGAGATC	1679		
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	TGGTTTTG - - - CTAACAAATTTGAGCAGCCGGTTGCAGGTCCCAATCATGCAATAAAGGCAGCATCCAAAAGTAGAGATC	1670		
Zea mays ZmCPL3_CDS	TGGTTTTG - - - CTAACAAATTTGAGCAGTCGACTGCAGGTCCGAATCATGCAATAAAGGCAGCATCCAAAAGTAGAGATC	1687		

Фиг. 2А (продолжение)

		1940		1960		1980		2000	
	Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	CAAGACTAAGGCTTGC	GAAACCTGAT---	GCTGCCAATGTAACCATTTATTCGT---	ACTCGTCTGCG	GACGCTAGAAAT	1644		
	Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	CTAGGCTTCGTTTCGTTAATTCTGAT---	GCAAGTGCCGTGGA-----	TAACCCATCTACATTGATACATAAT	1668				
	Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	CCAGGCTTCGTTTCATTAATTCTGAT---	GCAAGTGCTGTGGA-----	TAACCTGTCTACATTGATAAATAAT	1680				
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	CCAGACTCAGACTGGCAACCAGCGAT---	GCAGTTGCTCAGAACACGAATAAAAAATATCTTGGCTATCCCAGACATTGAT	1596						
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	CTAGGCTTCGGCATCTTAATCCTAAT---	TTTGGCTCGTTAGACCTTAGTTTTTGTCCGTCTCCTATGGTTCCCAGTTCA	1644						
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	CAAGGCTCAGGTTTTTTGAACCGTGATTCTGGTGGTACTGCAGATGCAAATAGACATGTAAATTTGGCAGAGCCAAATG--	1630							
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	CAAGGCTCAGGTTTTTTGAACCGTGATTCTGGTGGTACTGCAGATGCAAATAGACATGTAAATTTTGCAGAGCCAAATG--	1657							
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	CAAGGCTCAGGTTTTTTGAACCGTGATTCTGGTGGTACTGCAGATGCAAATATACATGTAAATTTGGCAGAGCCAAATG--	1657							
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	CAAGGCTCAGGTTTTTTGAACCGTGATTCTGCTGGTGTCTACAGATGTGAATCGGCGCGCAAATTTTTTCAGAACTGAA----	1646							
Zea mays ZmCPL3_CDS	CGAGGCTCAGATTTTTTTGAACCGTGATTCTGCTGGTGTCTACAGATGTAAATTGGCGTGCAAATTTTTTCAGAACTGAA----	1763							
		2020		2040		2060		2080	
	Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	CTTTCAAAAGTAGAGCTTTCTGCAGACTTGGTGAACCCAA-----	GAAACAAAAAGCCGCTGATGAATTTTTTAATTGAT	1719					
	Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	ATGCCATAAGTGGGAATATGCTGGAAACAACAATC---	TCAA-----	GGAAACAAAAGGCTGCTGAAGAACCCTTCTTTGGAT	1740				
	Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	ATGTCTAAAGTGGGAATATTCTGGAAACAACAATC---	TCAA-----	GGAAACAAAAGGCTGCTGAAGAACCCTTCTTTGGAT	1752				
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	TTGAAATTGGAGGCTTCTTTAGACATGATTGGT---	TCAA-----	AAAAGCAGAAGACAGTAGACCTACCAGTCTTTGGT	1668					
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	GCATCTAAATTGGAGCCGCTAGGGGAAATTATGAAATCAA-----	AGAAGACCAAGGCACCTTGAGGGGGCCCTTCTGGAT	1719						
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	CTTCCAAAGATGGGACCTTGGGGGGTGTGTATCAGATAATAGCCGGAAGCACAAGGCAACTGGCCAACCTCTCAGGGAT	1710							
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	CTTCCAAAGATGGGACCTTGGGGGGTGTGTATCAGATAATAGCCGGAAGCACAAGGCAACTGGCCAACCTCTCAGGGT	1737							
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	CTTCCAAAGATGGGACCTTGGGGGGTGTGTATCAGATAATAGCCGGAAGCACAAGGCAACTGGCCAACCTCTCATGGAT	1737							
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	-----GGATGGGAACCTTGGGTGGAGCG--	TCAGTTGGTAACCGTAAACACAAAGCAATTGATGATCCTCAGGTGGAT	1716						
Zea mays ZmCPL3_CDS	-----GGATGGGAACCTTGGGTGGAGTT--	TCAGTTGGTAACCGTAAACAGAAAGCAGTTGATGATCCTCAGGTGGAT	1833						
		2100		2120		2140		2160	
	Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	GGGCCTGCATGGAAAAGACAAAAGAGT-----	GATACGGATGCACCAAAAAGC--	AGC	1769				
	Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	GTTACTGTATCAAAAAGACAAAAGAGTCCATTGGAAAATACTGA---	GCA---	TAATATGAGCGAAGTAAG-----	AAC	1808			
	Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	GTTACTGTATCAAAAAGACTAAAAAGTTCTTTGGAAAATACTGA---	GCA---	TAATATGAGCGAAGTAAG-----	AAC	1820			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	GCTCCATTGCCGAAAAGACAAAGAGT-----	GAACAGACTGA---	TTCAATCATTGTGAGTGATGTGGCTCCTTCGAC	1739					
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	GGTCCCTACTGCCAAGAGAGACCAAGAAATGGCCTGGAAACTGAAGATATGTCCATGAATGCAATCAAGTAAAACTCTCCA	1799							
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	GAAACCGTGTTAAAAAGAGCTAGGGAG-----	AGTACTGGGAATCCAGAGACATGCAGGT	1766						
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	GAAACCGTGTTAAAAAGAGCTAGGGAG-----	AGTACTGGGAATCCAGAGACATGCAGGT	1793						
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	GAAACCGTGTTAAAAAGAGCTAGGGAG-----	AGTACTGGGAGTCCAGAGACATTCTGGT	1793						
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	GAAAATGTGTTAAAAAGATTTAGGGGC-----	GGAACTGCAATCCGAGAGACTTGCAA--	1770						
Zea mays ZmCPL3_CDS	GACAATGCGTTAAAAAGATTTAGGGGC-----	GGAAATGCGAATCAGAGAGACATGCAG--	1887						

Фиг. 2А (продолжение)

		2180	2200	2220	2240
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	TGGA	ACTGGTGGCTGGCTAGAGGATACAGAATCATCGGGACTTCTA-----AACTGGAATCCAAGCCCAGGCTAATTGA	1844		
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	TGGA	ATTGGTGGTTGGTTGGAAGAGCATACTGGGCCTGGAGCTCAGTTTATAGAGAGGAATCATTTAATGGACAAATTTG	1888		
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	TGGA	AGTGGTGGTTGGTTGGAAGAGAATACTGGGCCTGGAGCTCAGTTGATAGAGAGGAATCATTTAATGGACAAATTTG	1900		
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	TGG	AAATGGTGGTTGGTTAGAGGATAGAGGGACTGCTGGGTTGCCAATTACGAGTAGTAACGTGTGCTACAGATAGCAGTG	1819		
Beta vulgaris g12082.t1_CDS	GGG	AAGTACTCG-----AATGGAGACTTCTAGTTCTAG-----TATTTTGGGACCACAGTCTTCCAGCAGAGGACTCTT	1888		
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	ACC	ACTGGTAG-----AGATGGAAGTAACATTAGCTCCTATTTCAGGTAACAGGGTTCAATCAAATCAGCATAAAG	1837		
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	ACC	ACTAGTAG-----AGATGGAAGTAACATTAGCTCCTATTTCAGGTGACAGGGTTCAATCAAATCAGCATAAAG	1884		
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	ACC	ACTGGTAG-----AGATGGAAGTAACATCAGCTCCTATTTCAGGTGACAGGGTTCAATCAAATAAGCATACAG	1884		
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	----	CCTACAGG-----GAAT-----CCTAATCAGCT-----	1793		
Zea mays ZmCPL3_CDS	----	CCTACGGG-----GAAC-----CCCAATCAGCT-----	1810		
		2260	2280	2300	2320
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	GA-----	ACGGTGTAACATCTATGACATCAAGTGTATGCC-----ACG-----	1884		
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	GACC-----	TGAACCCCAAAAGACTTTGAATACAGTCAGTAGTTCTTGTACT-----	1935		
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	GACC-----	CGAAGCCCAAAAGACTTTGAATACAGTCAGTAGTTCTTGTACT-----	1947		
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	ACAA-----	TGATATTAGGAAA--TTGGA-GCAAGTAACAGCT-----ACT-----	1857		
Beta vulgaris g12082.t1_CDS	GGG	CCCAGCTATTGATCCTCGGAAACCAGGAAGTGGTACCGTTTCTCCGGGATT-----	1923		
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	GGC-----	TTGAAACTAAGGCAGCCGGGAATCCTAGTATTAGGACCAGCAGTCAACTTATTAGCAATGTAAGTAGTA	1909		
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	GGC-----	TTGAAACTAAGGCAGCCGGGAATCCTAGTATTAGGACCAGTAGTCAACTTATTAGCAACGTAAGTAGTA	1936		
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	GGC-----	TTGAAACTAAGACAGCCAGGAATCCTAGTATTAGGACCAGTAGTCAACTTATTAGCAATGTAAGTAGTA	1936		
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	-----	TATGAACATTAGGGCTCCTACAAATAGTAGCGGTAT-----	1829		
Zea mays ZmCPL3_CDS	-----	TATGAACATCAGGGCTCCTACACATAGTAGCAGTAT-----	1946		
		2340	2360	2380	2400
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	-----	AGTGCTG----TTTCTGTGAGCCAAAAAGTACGGA-----CAGCTTCAACTGATACTGCATCA---	1938		
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	-----	GGTTCTGATAATTTCAATGCAACAAGCATTAGAAATGAGCAGGCACCAATTACAGTAGTAATGTGCTAGCT	2007		
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	-----	GGTTCTGATAATTTCAATGCAACAAGCATTAGAAATGAGCAGGCACCAATTACAGTAGTAATGTGCTAGCT	2019		
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	-----	ATCGCTACTATACCTAGTGTCTATAGTTAATGCTGCTGAGAACTTTCCAGTGACTGGCATTAGCAGCTCAACA	1929		
Beta vulgaris g12082.t1_CDS	-----	ACTACAAACAATCCTAGCATGGCAGTAAATAAAACGGGCAAAAGCCCTCAATGAATGTGAGTGGTTCTCCG---	1992		
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	TCC	CAGACAGTACTGGAACCTCTCCAAGCCTCCCAACCTAATTTCAG-----TTCCACAGACCAGTGCAGCTCCTATTGTT	1983		
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	TCC	CAGACAGTACTGGAACCTCTCCAAGCCTCCCAACCTAATTTCAG-----TTCCACAGACCAGTGCAGCTCCTATTGTT	2010		
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	TCC	CAGACAGTACTGGAACCTCTCCAAGCCTCCCAACCTAATTTCAG-----TTCCACAGACCAGTGCAGCTCCTATTGTT	2010		
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	-----	CAATATGAAAACCTTTGCAGCCCCCTCAAACCTACT---G-----CTCCACATGTCAGTGCAGCTCCTGCTGTC	1893		
Zea mays ZmCPL3_CDS	-----	CAATATGAAAACCTTTGCAGCCTCTCAAACCTACT---G-----CTCCACATGTCAGTGCAGCTCCTGCTGTC	2010		

Фиг. 2А (продолжение)

		2420	2440	2460	2480
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	---	TTGCAATCCCTTTT---	GAAGGATATTGCAGTAAATCCTACAATGCTACTGAATCTCCTGAAAATGGGAGAAAGACA	2012	
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	TCCTTACCTGCTCTATT---	GAAAGGTGCAGCTGTAAATCCAACCATGCTGGTTAACTTACTTAGAATAGCAGAAGGCCA	2084		
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	TCCTTACCTGCTCTATT---	GAAAGAAGCATCTGTAAATCCAATCATGCTTGTTAAACATACTTAGATTAGCTGAAGGCCA	2096		
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	ACTTTGCATTCTTTGTT---	AAAAGATATAGCTATAAATCCATCGATATGGATGAATATAATCAAGATGGAA-----CA	2000		
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	TCCTTGCAGTCACTGTT---	GAAAGACATTGCAGGGAATCCAGGAGCATGGATGAATATTATTAAGGAG-----CA	2060		
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	TCATTGCCTGCAGTGTT---	AAAGGACATTGCTGTGAACCCGACTGTGCTCATGCATTGGATTCAAATGGAACA---TCA	2057		
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	TCATTGCCCGCAGTGTT---	AAAGGACATCGCTGTGAACCCGACTGTGCTCATGCATTGGATTCAAATGGAACA---TCA	2084		
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	TCATTGCCTGCAGTGTT---	AAAGGACATTGCTGTGAACCCGACTGTGCTCATGCATTGGATTCAAATGGAACA---TCA	2084		
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	CCAGTGCCTTCTATGTTGTTAAAGGACATTGCTGTGAACCCAACATTGCTTATGCATTTGATCCAAATGGAACA...TCA	1970			
Zea mays ZmCPL3_CDS	CCATTGCCTCCTATGTTGTTAAAGGACATTGCTGTGAACCCAGCATTGCTTATGCATTTGATCCAAATGGAACA...TCA	2087			
		2500	2520	2540	2560
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	AAAGGTACCTGAAAAAGCTATTTCAGAAACCCATGGATCCAAGAAGAGCAGCACAACCTCCCTGGCTCTTCCGTACAACCAG	2092			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	GAAGAAATCTGCTGATTCTGCTA-----CAATATGCTGTTGCATCCAACAAGCTCAAATTCGGCTATGG	2149			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	GAAGAAATCTGCTGATTCTGCTG-----CAATTATGCTGCTGCATCCAACAAGCTCAAATCCGGCAATGG	2161			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	GCAGAAATCTGCTGATGCTTCTA-----GAACTACTACAGCACAAGCTTCAAGTTCTAAATCTATTCTTG	2065			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	GAACAAATCCAGTGAACCTTTAC-----AAAGTGT---GTCACATTCAATGAACTCAAATTCATATTAG	2122			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	GAAGTGGTCAG-----CATCAGAGCCTCAGCCTGCTTCAGGTATCATCTCTAGTGGCATGATCAATAATGTCACTGCTG	2131			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	GAAGAGGTGAG-----CATCAGAGCCTCAGCCTGCTTCAGGTATTATCTCTAGTGGCATGATCAATAATGTCACTGCTG	2159			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	GAAGAGGTGCG-----CATCAGAGCCTCAGCCTGCTTCAGGTATCATCTCTAGTGGCATGATCAATAATGTCACTGCTG	2159			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	AAAGAAGTCAG-----CATCAGAAAGTCAG-----GGTGGCATGTCTAGTGGGATGAGCAACAATGGAATTGCAG	2035			
Zea mays ZmCPL3_CDS	AAAGAAGTCAG-----CATCAGAAAGTCAG-----GGTGGCATGTCTAGTGGGATGACCAACAATGGAATTGCAG	2152			
		2580	2600	2620	2640
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	GGGTATCAACACCGCTTAGTATACCTGCATCAAAATGCTTTAGCTGCTAATTCTTTAAACTCAGGAGTACTTCAGGATTCT	2172			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	GAACAGACTCAACTGCGAGTATTGGTTCATCAATGCCCACTGGTCTTCTTCAAAGTTCTGTTGGAATGCTTCAGTTTCA	2229			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	GAACAGACTCAACAGCGAGTATTGGTTCATCAATGCCCACTGGTCTTCTTCAAAGTTCTGTTGGAATGCTTCCTGTTTCA	2241			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	GAGCAGTTCCATCAACGGATGCAATAGCTCCAGATCTTCTGCTATTGGCCAGAGATCAGTAGGAATACTTCAGACTCCT	2145			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	GAGCAGCACCCCTCTGCTATTGCTGTTCCACCTATATCATCTGGGGTGGGACAGACAAGTGCAGGATTGCTTCAGGTCCCT	2202			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	GGATGGTTATACCACTGGCA---ATGCTCCGAAGACCCGAGAAGTTGCACACATTCCCTTCTTATAGGCCACAAGCAACA	2208			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	GGATGGTTATACCACTGGCA---ATGCTCTGAAGACCCGAGAAGTTGCACACATTCCCTTCTTATAGGCCACAAGCAACA	2235			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	GGATGGTTATACCACTGGCA---ATGCTCTGAAGACCCGAGAAGTTGCACACATTCCCTTCTTATAGGCCACAAGCAACA	2235			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	GCATGGTTTTACACCTGGCA---ATGCTCCGAAGATCACAGAAGCTGCACAAGTCCCTCTGTTAGGCCACAGGTTCCA	2112			
Zea mays ZmCPL3_CDS	GCATGGTTTTACACCTGGCA---ATGCTCCGAAGATCACAGAAGCTGCACAAGTCCCATCTGTTAGGCCACAGGTTCCA	2229			

Фиг. 2А (продолжение)

	2660	2680	2700	2720
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtCPL3_CDS	TCGCAAAACGCCCTGCA-----	GCCGAATCTGGAAGCATTGCGATGAAACCTCGTGATCCTCGCCGAAT	2237	
<i>Glycine max</i> Glyma.18g282300.2_CDS	TCACAATCAACTTCCATGACACAAACCTTCAAGATGATTGAGGAAAGATTGCGATGAAACCCCGTGATCCCCGGCGCAT	2309		
<i>Glycine max</i> Glyma.08g257900.1_CDS	TCACAATCAACTTCCACGGCACAACCTTCAAGATGATTGAGGAAAGATTGCGATGAAACCCCGTGATCCACGGCGCAT	2321		
<i>Solanum tuberosum</i> PGSC0003DMT400052897_CDS	ACACACACAGCATCAGCG-----	GATGAAGTGGCTATAGTCCGCGATGAAACCTCGTGACCTCGGCGGT	2210	
<i>Beta vulgaris</i> g12062.t1_CDS	TCTCCGAAAGTGGTCACG-----	AGCTCACAGGATGATTGCGCAAAACTTCGCGATGAAACCCCGTGACCTCGTCTGT	2276	
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-B_CDS	TCGCAACAGCCTCTGTG-----	AATTCACAAAATGACCTGGAGTAATACGTATGAAAGCCCGTGATCCCCGTCTGT	2282	
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-D_CDS	TCGCAACAGCCTCTGTG-----	AATTCACAAAATGACCTGGAGTAATACGTATGAAAGCCCGTGATCCCCGTCTGT	2309	
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-A_CDS	TCGCAACAGCCTCTGTG-----	AATTCACAAAATGACCTGGAGTAATACGTATGAAAGCCCGTGATCCCCGTCTGT	2309	
<i>Sorghum bicolor</i> Sb05g019010.1_CDS	GCGCAGACACCTTCTTTG-----	AACTCACAAAATGATGGTGGAAATCGTTGCGATGAAAGCCCGTGATCCACGACGCAT	2186	
<i>Zea mays</i> ZmCPL3_CDS	GTGCAGACACCTCCTTTG-----	AACTCACAAAATGATGGTGGAAATCGTTGCGATGAAAGCCCGTGATCCACGGCGCAT	2303	
	2740	2760	2780	2800
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtCPL3_CDS	CCTGCA--TGGAAGTACTOTTTCAAAGAACGGACTCTTCAATGGAAAAGCAGACCAAAGTGAATGATCCTTCCACTCTAG	2314		
<i>Glycine max</i> Glyma.18g282300.2_CDS	TCTCCACACTAATAATACTATCCAGAAGAGTGGGAAGTTGGGGAATGAGCAATTCAAAGCCATTGTATCCCCCGTGTCTA	2389		
<i>Glycine max</i> Glyma.08g257900.1_CDS	TCTCCACACTAATAATACTATCCAGAAGAGTGGGGAAGTTGGGGAATGAGCAATTCAAAGCCATTGTATCCCCCGTGTCTA	2401		
<i>Solanum tuberosum</i> PGSC0003DMT400052897_CDS	TCTTCA--TAATACTGCAGTTCTAAAGGGTGGTAATGTTGGATCAGATCAATGTAAAAGTGGTGTAGCA-----	G	2278	
<i>Beta vulgaris</i> g12062.t1_CDS	CCTGCATGCCAATATGGC--CCAAAGGACTGGCAGTTCTGTGCCAGAACAGCCTAAGGTAAATGGAGTACACAACACAA	2353		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-B_CDS	CCTCCA--CAATAACACATCACAGAAGAAGGATACTCCGAAGTCTGATCAAGCCAAAAGCAATGGAATCGCCCTGCCGG	2359		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-D_CDS	CCTCCA--CAATAACACATCACAGAAGAAGGATACTCCGAAGTCTGATCAAGCCAAAAGCAATGGAATCAACCTGCCGG	2366		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-A_CDS	CCTCCA--CAATAACACATCACAGAAGAAGGATACTCTGAAGTCTGATCAAGCCAAAAGCAATGGTATCGCCCTGCCGG	2366		
<i>Sorghum bicolor</i> Sb05g019010.1_CDS	CCTACA--CAATAACGTAGCACAGAATCTGATGCAATGGTCTTGGAGCAAGTGAAGCAATGGAATTAACGAGCCAG	2263		
<i>Zea mays</i> ZmCPL3_CDS	CCTACA--CAATAACATAGCACAGAATCTGATGCAATGAGCTTGGAGCAAGTGAAGCAATGGAATTAACGAGCCAG	2360		
	2820	2840	2860	2880
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtCPL3_CDS	GAACCTTGACTATGAAGGGTAAGGCAGAAGATTTGGAAACACCTCCCCAGCTTGATCCACGGCAAAATATTAGCCAGAAT	2394		
<i>Glycine max</i> Glyma.18g282300.2_CDS	ACAACCAGGGAAGTGGGGACAATG-----	TCAATGCCCGAGAAGCTTGAGGGTAGGGTG	2442	
<i>Glycine max</i> Glyma.08g257900.1_CDS	ACAACCAGAGAACAGGGGACAATG-----	TCAATGCCCGAGAAGCTTGAGGGTAGGGTG	2454	
<i>Solanum tuberosum</i> PGSC0003DMT400052897_CDS	GCACACACGGAACGATAAGCAATC-----	TTGGTTTCCAAAGTCAAGAGGAGCACTTG	2331	
<i>Beta vulgaris</i> g12062.t1_CDS	CAACACAAGGACTCCAGGAGAATA-----	TCAATGCTCAAAGATATGTTAATGGAACG	2406	
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-B_CDS	CCTTCCAGGACAGCAAGGACAATTTGA-----	TTAACCGTGAACAAGTGGCAGAGCAACTT	2415	
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-D_CDS	CCTTCCAGGACAGCAAGGACAATTTGA-----	TTAACCGTGAACAAGTGGCAGAGCAACTT	2442	
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-A_CDS	CCTTCCAGGACAGCAAGGACAATTTGA-----	TTAACCGTGAACAAGTGGCAGAGCAACTT	2442	
<i>Sorghum bicolor</i> Sb05g019010.1_CDS	ACTCTCAGGGCACCAAGGAC-----		2283	
<i>Zea mays</i> ZmCPL3_CDS	ACTCTCAGGGCACCAAGGAC-----		2400	

Фиг. 2А (продолжение)

	2900	2920	2940	2960
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	GGTACCAGCAAAATGAAAATTTCCGGTGAACCTCTCAGTGGGAAGACACCAGACTTTTCAACACAATTCACCAAAAACCT	2474		
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	GATAGTAAATTAGTGCCTACTC--AACCAAGTGCACA-----ACCTGATATTGCTCGACAATTCGCCCGGAATCT	2510		
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	GATAATAAATTAGTGCCTACTC--AATCAAGTGCACA-----ACCTGATATTGCTCGACAATTCACCCGGAATCT	2522		
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	GATAGGAAGTCAGCTGTGACTC--TTTCGACTACACC-----ACCAGACATTGCTCGCCAATTCACCAAAAATTT	2399		
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	AGTCCAAGTGCTGCGTCATCTC--AGACCCCAATCCT-----ACCTGATATAACTAAGCAATTTACAAAGAACTT	2474		
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	CAGACTACTGTGTTGCCATCTC--AACCAGTCTCATT-----ATCCAGCATTGCTCGACAGTCCACCATGAGCGC	2493		
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	CAGACTACTGTGTTGCCATCTC--AACCAGTCTCATT-----ATCCAGCATTGCTGGACAGTCCACCATGAGCGC	2510		
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	CAGACTACTGTGTTGCCATCTC--AACCAGTCTCATT-----ATCCAGCATTGCTGGACAGTCCACCATGAGCGC	2510		
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	CAGACTAGTTCAATGCCTTCTC--AAGCAACTTTGCC-----ATCTAGCGTTGCAAGGCCATTACAAA--ACAC	2348		
Zea mays ZmCPL3_CDS	CAGACTACTCCAGTGCCTTCTC--AAGCAGCCTTGCC-----GTCTAGCATTGCAAGGCCATTACGCA--GCGC	2495		
	2980	3000	3020	3040
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	GAAAAGTATTGCTGATATGTTGTCTGTATCACAA---CAACTTGGCAATCCCCC-----	2525		
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	GAAAAACATTGCTGATATTATGTCTGTTTCCCAAGAATCATCAACTCACACTCCTGTTGCTCAAATTTTTTTCTTCAGC--	2588		
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	GAAAAACATTGCTGATATTATGTCTGTTTCCCAAGAATCATCAACTCACACTCCTGTTTCTCAAATTTTTTTCTTCTGC--	2600		
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	GAAAAATATTGCTGACATGATCTCTGTTTCAACATCCACATCACTGT---CTGCTGCTTCTCAAACCTCAGAC---AC--	2470		
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	GAAAAACATTGCTGACATTATTTCTTCCCAACAAACGTCAAGTATACAGTCTCCGCTAGCAGTAAGTTCTTTGTGGGCGC	2554		
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	GAGTAA--GGTGGATCCTGTCTCTAATTCACAG---TTAGCTGCTTCATCGCTCATTGCTC-----CT---C	2542		
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	GAGTAA--GGTGGATCCTGTCTCTAATTCACAG---TTAGCTGCTTCATCACTCATTGCTC-----CT---C	2569		
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	GAGTAA--GGTGGATCCTGTCTCTAATTCACAG---TTAGCTGCTTCATCACTCATTGCTC-----CT---C	2569		
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	AAAAACA--TGTTGATCCTGTCTCTAATTCACAG---TTAGCTGCTACAGCTATAATGGCTC-----CTACAC	2410		
Zea mays ZmCPL3_CDS	AAAACA--TGTTGATCCTGTCTCTAATTCACAG---TTAGCTGCTACAGCTATTATGGCTC-----CGACAC	2527		
	3060	3080	3100	3120
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	-AGCAAGTATGCATTCCGGTACAGCTTAAGACGGAGAGAGATGTTAAACATAATCCTTCAAATCCC--AATGCCCAGGAT	2601		
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	-ATCTGTTCCCTTACTTCAG--A-TAG---AGGGGAACAGAAATCTGTTGTGTCA-----AACTCTCAGAAC	2649		
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	-ATCTGTTCCGCTTACTTCAG--A-TAG---AGGGGAACAAAAATCCGTTGTGTCA-----AGCTCTCAGAAC	2661		
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	-AATGCCATACAATCTCATCAG--AGTAG---ATCGGAAGGTAAGGAAGCAGTTTCT-----GAACCAAGTGAA	2532		
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	AAGCTAATTCCGATACGACAAGTATTAGTTCTGGTGGACAAGCAAGTTGTAGTTCTGGTGGACCCGTGATTACTGGTAAT	2634		
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	AAGAACTTTAGTCAGCGTAATA-----GGGCAGATCCAAGAGTAGCTGCTGGACAG-----AATGATTCCAAT	2607		
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	AAGAACTTTAGTCAGCGTAATA-----GGGCAGATCCAAGAGTAGCTGCTGGACAG-----AATGATTCCAAT	2634		
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	AAGAACTTTAGTCAGCGTAATA-----GGGCAGATCCAAGAGTAGCTGCTGGACAG-----AATGATTCCAAT	2634		
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	AACAAGCTTTGGGCAGCATATAATA-----AGGTGGATCCAAGACTAGCAGTTGAACAG-----AATGGCCAAAAT	2475		
Zea mays ZmCPL3_CDS	AA--GCTTTGAGTAGCGTAATA-----AGGTGGATCCAAGACTAGCAGTTGAACAG-----AATGGACAAAAT	2589		

Фиг. 2А (продолжение)

	3140	3160	3180	3200
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtCPL3_CDS	GAGGATGTGTCA	GTTTCAGCAGCATCAGTAACGGCTGCAGCTGGTCCCACTCGTTCCATGAACA	GTTGGGGAGATGTGGA	2681
<i>Glycine max</i> Glyma.18g282300.2_CDS	CTGGAGGCTGGCATGGTATCAGCTCATGAAACAGCTGCATCAGGTACCTGTCCGATCCCAGAATACATGGGGAGATGTTGA	2729		
<i>Glycine max</i> Glyma.08g257900.1_CDS	CTGCAGGCTGACATGGCATCTGCTCAGGAAACAGCTGCATCAGTTACCTCTCGATCCCAGAGTACATGGGGAGATGTTGA	2741		
<i>Solanum tuberosum</i> PGSC0003DMT400052897_CDS	CGGGTGAATGATGCTGGCTTAGCTTCTGAAAAAGGTTCTCCTGGTTTCATTGCAACCACAGATCTCTGGGGAGATGTTGA	2812		
<i>Beta vulgaris</i> g12062.t1_CDS	CAGCGTACTGTGTCTGCATTGAGGCCCGAAGAAGTTGTCTCGGGCCGTCCACAATCACAGAACAATTGGGGAGATGTTGA	2714		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-B_CDS	G-----ATGCTGCCCTGCTACAA--	CACTTGGTACCAGGCCACCAGCTAACCAGTGGGGTGATCTTGA	2669	
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-D_CDS	G-----ATGCTGCCCTGCTACAA--	CACTTGGTACCAGGCCACCAGCTAACCAGTGGGGTGATCTTGA	2696	
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-A_CDS	A-----ATGCTGCCCTGCTACAA--	CACTTGGTACCAGGCCACCAGCTAACCAGTGGGGTGATCTTGA	2696	
<i>Sorghum bicolor</i> Sb05g019010.1_CDS	GCTGATGCAACAACAATGATGCTTCTGCAACAG--	AACCTGAAGCTACACAGCCTGTTAGCCCATGGGGTAATCTTGA	2552	
<i>Zea mays</i> ZmCPL3_CDS	GCTGATGCAACAACAATGGTGCTTCTGCAACAA--	CACTTGAAGCTACACAGCCTGTTAGTCCATGGGGTGATGTTGA	2688	
	3220	3240	3260	3280
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtCPL3_CDS	ACACCTATTTGAAGGATATGATGACATTCAGAGAGTAGCTATTCAAAGAGAGAGAGTTGCTAGGTTAGAGGAACAGAATA	2761		
<i>Glycine max</i> Glyma.18g282300.2_CDS	GCATCTTTTTGAAGGTTATGATGAGCAGCAGAAAGGCTGCTATACAGAGAGAGAGGCAAGGAGAATTGAAGAACAGAATA	2809		
<i>Glycine max</i> Glyma.08g257900.1_CDS	GCATCTTTTTGAAGGTTATGACGAGCAGCAGAAAGGCTGCTATACAGAGAGAGAGGGCCAGGAGGATTGAAGAACAGAATA	2821		
<i>Solanum tuberosum</i> PGSC0003DMT400052897_CDS	GCATCTATTTGAGGGGTACAGCGACCAACAGAGAGCTGATATCCAGAGAGAAAGGGCTAGGAGGCTTGAGGAACAGAAAA	2892		
<i>Beta vulgaris</i> g12062.t1_CDS	GCATCTCTTTGACGGATATGATGATCAGCAAAAAGGCAGCTATTCAACAAGAGAGAGCTAGAAGGCTTGATGAGCAGAAACA	2794		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-B_CDS	TGATCTCCTCAACGGTTATGATGACCAGCAGAAAGGCTCTCATACAGAAGGAAAGGGCAAGACGGATCATGGAACAGCACA	2749		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-D_CDS	TGATCTCCTCAACGGTTATGATGACCAGCAGAAAGGCTCTCATACAGAAGGAAAGGGCAAGACGGATCATGGAACAGCACA	2776		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-A_CDS	TGATCTCCTTAACGGTTATGATGACCAGCAGAAAGGCTCTCATACAGAAGGAAAGGGCAAGACGGATCATGGAACAGCACA	2776		
<i>Sorghum bicolor</i> Sb05g019010.1_CDS	TCATCTCCTTGATGGATATGATGATAAGCAAAAAGCTCTGATACAGAAGGAAAGGGCAAGACGAATAACGGAACAGCACA	2632		
<i>Zea mays</i> ZmCPL3_CDS	TCATCTCCTTGATGGATATGATGACCAGCAAAAAGGCTCTGATACAGAAGGAAAGGGCAAGACGAATAACAGAACAACACA	2746		
	3300	3320	3340	3360
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtCPL3_CDS	AAATGTTTGCATCTCAAAAGCTCTCTCTTGTCTTGGATATAGACCACACCCCTTCTCAATTCAGCTAAGTTTAAATGAGGTT	2841		
<i>Glycine max</i> Glyma.18g282300.2_CDS	AAATGTTTGTCTGCTCGAAATTTGTGCCTTGATTGGATCTAGATCACACACTACTTAATTCTGCTAAGTTTGTGGAAGTT	2869		
<i>Glycine max</i> Glyma.08g257900.1_CDS	AAATGTTTGTCTGCTCGGAAATTTGTGCCTTGATTGGACCTAGACCACACGCTACTTAATTCTGCCAAGTTTGTGGAAGTT	2901		
<i>Solanum tuberosum</i> PGSC0003DMT400052897_CDS	AAATGTTTCTGTTTCGGAAGCTCTGTCTCGTCTTGGACTTGGACCATACTCTTCTGAATTCAGCAAGTTTGTGAAATC	2772		
<i>Beta vulgaris</i> g12062.t1_CDS	AAATGTTTGTCTGATCGCAAGTTGTGTCTTGTGCTGGATCTGGATCACACGCTTCTTAATTTCAGCAAGTTTTCAGAGGTA	2874		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-B_CDS	CGATGTTTTCATCGAGGAAACTTTGTTTAGTGCTTGATTTGGATCACACTCTCCTCAATTCTGCTAAGTTTATAGAAGTG	2829		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-D_CDS	CGATGTTTTCATCGAGGAAACTTTGTTTAGTGCTTGATTTGGATCACACTCTCCTCAATTCTGCGAAGTTTATAGAAGTG	2856		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-A_CDS	CGATGTTTTCATCGAGGAAACTTTGTTTAGTGCTTGATTTGGATCACACTCTCCTCAATTCTGCGAAGTTTATAGAAGTG	2856		
<i>Sorghum bicolor</i> Sb05g019010.1_CDS	AAATGTTTCTCAGCGCGAAAGCTATGCCTGGTGGCTTGATTTGGATCACACCCCTTCTTAATTCTGCAAGTTTATAGAAGTG	2712		
<i>Zea mays</i> ZmCPL3_CDS	AAATGTTTCTCAGCACGGAAGCTATGCCTGGTGGCTTGATTTGGATCACACCCCTTCTTAATTCTGCAAGTTTATAGAAGTG	2826		

Фиг. 2А (продолжение)

		3380	3400	3420	3440
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	GAATCCCGCCACGAGGAGATATTAAGAAAGAAGGAAGCAAGATCGTGAGAAACCATATAGACATCTCTTTTCGTTTCT	2921			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	GATCCTGTGCATGATGAGATATTGAGAAAGAAAGAAGAGCAGGACCGTGAGAAACCAACAGACATCTTTTTTCGCTTTCC	2969			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	GATCCTGTGCACGATGAGATATTGAGAAAGAAAGAAGAGCAGGACCGTGAGAAACCTCAGAGACATCTTTTTTCGCTTTCC	2981			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	GACCCAGTTTCATGAAGAGATATTGAGGAAGAAAGAGGAACAAGACCGTGAAAAGCCGTGTAGGCACCTATTCCGGTTTCC	2852			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	GATCCTGTGCATGATGAAATTCTGAGGAAGAAAGAGGAACAAGATCGTGAAAAGCCCTCGACGACATCTCTTTTCGTTTTC	2954			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	GATCCTATTTCATGAAGAGATTTTTCGGAAGAAAGAGGAACAAGACCGGGAAGGTCAGAGCGGCATCTGTTCCGATTCCA	2809			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	GATCCTATTTCATGAAGAGATTTTTCGGAAGAAAGAGGAACAAGACCGGGAAGGTCAGAGCGGCATCTGTTCCGATTCCA	2836			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	GATCCTATTTCATGAAGAGATTTTTCGGAAGAAAGAGGAACAAGACTGGGAAAGGTCAGAGCGGCATCTGTTCCGATTCCA	2836			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	GAACCCATTTCATGAAGAGATGTTACGGAAGAAAGAGGAGCAAGACAGGACTTTGCCAGAACGTCATCTCTACCGTTTTCA	2792			
Zea mays ZmCPL3_CDS	GAACCAATTTCATGAAGAGATGTTACGGAAGAAAGAGGAGCAAGACAGGACTTTGCCGTAACGTCATCTCTACCGTTTTCA	2806			
		3460	3480	3500	3520
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	GCACATGGGAATGTGGACTAAACTAAGACCAGGGATTTGGAATTTTTTGGAGAAGGCTAGCAAGCTGTACGAGTTACATC	3001			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	TCATATGGGAATGTGGACTAAACTCAGACCAGGAATCTGGAACCTCTTGGAGAAGGCCAGTAAGCTCTATGAGCTGCATC	3049			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	TCATATGGGAATGTGGACTAAACTCAGACCAGGAATCTGGAACCTCTTGGAGAAGGCTAGTAAGCTCTATGAGTTGCATC	3061			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	ACACATGGGAATGTGGACCAAGTTACGGCCTGGGATTTGGAATTTCTTGGAAAAGGCTAGCAATCTTTTTGAGCTGCATC	2932			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	ACATATGGCAATGTGGACAAAATTACGACCTGGTATTTGGAATTTCTTAGAGAAGGCTAGTAAGCTTTTTGAACTGCATC	3034			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	TCATATGCAAAATGTGGACTAAACTAAGACCAGGAATATGGAATTTTCTCGAGAAGGCCAGCAAGCTTTATGAGTTACATC	2989			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	TCATATGCAAAATGTGGACTAAACTAAGACCAGGAATATGGAATTTTCTCGAGAAGGCCAGCAAGCTTTACGAGTTACATC	3016			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	TCATATGCAAAATGTGGACTAAACTAAGACCAGGAATATGGAATTTTCTCGAGAAGGCCAGCAAGCTTTACGAGTTACATC	3016			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	TCATATGAATATGTGGACGAAGTTGAGGCCAGGAATATGGAACCTTTCTTGAGAAGGCTAGTAACCTATTTCGAGTTGCATT	2872			
Zea mays ZmCPL3_CDS	TCATATGAATATGTGGACGAAGCTGAGGCCAGGAATATGGAACCTTTCTTGAGAAGGCTAGTAACCTGTTTGAGTTGCATT	2986			
		3540	3560	3580	3600
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	TTTACACTATGGGAAACAAATTTGTATGCTACAGAGATGGCCAAAGCTGCTTGATCCCAAAAGGGTTCTATTTAATGGACGG	3081			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	TTTACACTATGGGAAACAAGCTATATGCAACAGAAATGGCAAAAGGTGCTTGATCCAAAGGGACTTTTGTGTTGCTGGAAGA	3129			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	TTTACACTATGGGAAACAAGCTATATGCGACAGAAATGGCAAAAGGTGCTTGATCCAAAGGGAGTTTTGTGTTGCTGGAAGA	3141			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	TCTATACCATGGGTAACAAGCTATATGCCACGGAGATGGCCAAATTGCTAGATCCAAAGGGGATCTGTTTGCTGGACGA	3012			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	TCTATACCATGGGGAACAAGTTGTATGCCACTGAAATGGCAAAAGTGTCTTGATCCAAAGGGAACTCTATTTGCTGGACGA	3114			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	TGTACACGATGGGGAACAAGCTGTATGCTACTGAGATGGCTAAGGTTCTTGATCCTAGTGGAACCCCTGTTTGACAGGGAGA	3069			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	TGTACACGATGGGGAACAAGCTGTATGCTACTGAGATGGCTAAGGTTCTTGATCCTAGTGGAACCCCTGTTTGACAGGGAGA	3096			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	TGTACACGATGGGGAACAAGCTGTATGCTACTGAGATGGCTAAGGTTCTTGATCCTAGTGGAACCCCTGTTTGACAGGGAGA	3096			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	TGTACACTATGGGAAACAACTGTATGCTACTGAGATGGCCAAAGTTCTTGATCCTACTGGAACCTTGTTTGCTGGACGA	2952			
Zea mays ZmCPL3_CDS	TATACACTATGGGAAACAACTGTATGCTACTGAGATGGCCAAAGTTCTTGATCCTACTGGGACCTTGTTTCGCTGGACGA	3066			

Фиг. 2А (продолжение)

		3620	3640	3660	3680
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	GT	-----CATATCGAAAGGAGATGATGGAGATCCTCTTGATGGAGACGAACGAGTACCTAAGAG	3140		
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	GT	-----TATCTCTAGAGGTGATGATACTGATTGAGTTGATGGTGAGGAGAGGGCTCCCAAAAG	3188		
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	GT	-----TATCTCTAGAGGTGATGATACTGATTGAGTTGATGGTGAGGAGAGGGTTCCCAAAAG	3200		
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	GT	-----GATCTCCAGGGGTGACGATGGAGATCCATTTGATGGGGATGAAAGGGTTCTTAAGAG	3071		
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	GT	-----TATCTCACGGGGTGATGATGGGGATCCTATTGATGGTGATGAGAGGGTACCGAAGAG	3173		
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	GT	CATCTCAAGAGGTGGTGATGGCATCTCAAGAGGTGGTGATGGTGATACATTTGACAGCGATGACCGTGTACCAAAAAG	3149		
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	GT	CATCTCAAGAGGTGGTGATGGCATCTCAAGAGGTGGTGATGGTGATACATTTGACAGCGATGACCGTGTACCAAAAAG	3176		
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	GT	TAATCTCAAGGGGTGGTGATGGTATCTCAAGAGGTGGTGACCGTGATACATTTGACAGCGATGACCGTGTACCAAAAAG	3176		
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	GT	-----CATATCAAGAGGTGATGATGGCGATCCCTTTGACAGTGATGAGCGAGTGCCGAAAAG	3011		
Zea mays ZmCPL3_CDS	GT	-----CATATCAAGAGGTGATGATGGTGATCCTTTTGACAGTGATGAACGAGTGCCCAAAAAG	3125		
		3700	3720	3740	3760
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	CAA	AGATTTAGAAGGAGTTATGGGTATGGAATCGTCTGTGGTGATCATAGATGACTCTGTCCGAGTGTGGCCTCAACACA	3220		
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	CAA	AGATTTGGAAGGCGTTTTGGGTATGGAATCATCTGTTGTAATTATAGATGATTCTGTGAGGGTCTGGCCTCATAACA	3288		
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	CAA	AGATTTGGAAGGCGTTTTGGGTATGGAATCATCTGTTGTAATTATAGATGATTCTGTGAGGGTCTGGCCTCATAACA	3280		
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	TAA	GGACTTTGGAGGGGGTTTTGGGCATGGAGTCAGCTGTTGTGATTATTGATGATTCTGTGAGAGTCTGGCCACATAACA	3151		
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	CAA	GGATTTAGAGGGTGTTATGGGTATGGAATCTTCTGTTGTAATAATAGATGATTCTGTAGAGTTTGGCCACATAACA	3253		
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	TAA	AGATCTTGATGGGGTATTGGGGATGGAATCTGCAGTAGTGATCATCGACGACTCTGTGAGAGTCTGGCCCCACAACA	3229		
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	TAA	AGATCTTGATGGGGTATTGGGGATGGAATCTGCAGTAGTGATCATCGACGATTCTGTGAGAGTCTGGCCCCACAACA	3256		
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	TAA	AGATCTTGATGGGGTATTGGGGATGGAATCTGCAGTAGTGATCATCGATGACTCTGTGAGAGTCTGGCCCCACAACA	3256		
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	TAA	AGATTTGGATGGGGTACTGGGTATGGAATCTGCAGTCGTGATCATAGATGATTCTGTAAGAGTCTGGCCTCATAACA	3091		
Zea mays ZmCPL3_CDS	TAA	AGATCTGGATGGGGTACTGGGTATGGAATCTGCAGTTGTGATCATAGATGATTCTGTAAGAGTCTGGCCTCATAACA	3205		
		3780	3800	3820	3840
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	AA	TGAATTTAATAGCTGTTGAAAGATATCTTTATTTCCCTTGTAGTAGACGGCAATTTGGGCTTCTTGGTCTTCTCTT	3300		
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	AA	CTGAACCTGATAGTGGTGGAAAGGTATACATACTTCCCTTGTAGTAGACGTCAGTTTGGACTGCCTGGCCCTTCCCTT	3348		
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	AA	CTGAACCTGATAGTGGTGGAAAGGTATACATACTTCCCTTGTAGTAGACGTCAGTTTGGACTGCCTGGCCCTTCCCTT	3350		
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	AG	CTAAATTTGATTGTTGTAGAGAGGTATATTTAOTTTCCCTTGACGTAGACGGCAATTTGGTCTCCCTGGTCTTCTCTT	3231		
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	AG	CTAACTTGATAGTCGTGGAAGGTATACTTACTTTCCCTTGTAGTAGGAAACAATTTGGGCTCCAGGACCTTCACCTT	3333		
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	AAA	ACAATATGATTGTTGTAGAGAGATACACTTATTTCCCTTGACGCAGACGGCAATTTGGCCTTCTTGGACCATCACTT	3309		
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	AAA	ACAATATGATTGTTGTAGAGAGATACACTTATTTCCCTTGACGCAGACGGCAATTTGGCCTTCTTGGACCATCACTT	3336		
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	AAA	ACAATATGATTGTTGTAGAGAGATACACTTATTTCCCTTGACGCAGACGGCAATTTGGCCTTCTTGGACCATCACTT	3336		
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	GG	CACAATTTGATAGTTGTAGAAAGATACACCTATTTCCCTTGACGCAGACGTCATTTGGCCTTCTTGGACCATCACTT	3171		
Zea mays ZmCPL3_CDS	GG	CACAATTTGATAGTTGTAGAGAGATACACCTATTTCCCTTGACGCAGGGCTCAATTTGGCCTTCTTGGACCATCACTT	3285		

Фиг. 2А (продолжение)

		3860	3880	3900	3920
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	CTTGAGTTAGATCGTGATGAGGTACCTGAGGAGGGCACATTGGCATCTTCATTAGCGGTTATTGAGAAAATACATCAAAA	3380			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	CTCGAGATTGATCATGATGAGAGACCTGAAGCTGGAACCTCTGGCATCCTCTCTGGCAGTTATTGAGAAAATACATCAAAT	3428			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	CTTGAGATTGATCATGATGAGAGACCTGAAGCTGGAACCTCTGGCATCCTCTTTGGCAGTTATTGAGAAAATACACCAAAT	3440			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	CTTGAGATTGATCATGATGAAAGACCAGAAGATGGGACATTGGCCTCTTGTGGGGTTATTCAAAGAATACATCAGAA	3311			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	CTTGAGATTGATCATGATGAGAGACCAGAAGAGGGAACCTCTGGCATCTTCTTTGGCAGTCATTGAGAAAATACACCAAAA	3413			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	CTTGAAATTGATCGTGATGAAAGGCCGGAGGATGGCACTCTTGCTTCTTCGTTGGCGGTTATTGGGGCATTTCATCAAAA	3389			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	CTTGAAATTGATCGTGATGAAAGGCCGGAGGATGGCACTCTTGCTTCTTCGTTGGCGGTTATTGGGGCATTTCATCAAAA	3416			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	CTTGAAATTGATCGTGATGAAAGGCCCTGAGGATGGCACTCTTGCTTCTTCGTTGGCGGTTATTGGGGCATTTCATCAAAA	3416			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	TTAGAGATTGACAGAGACGAGAGGGCCTGAGGATGGTACCCTTGCTTCTTCACCTTGGGTCATTGAGAGAATCCACCACAA	3251			
Zea mays ZmCPL3_CDS	CTAGAGATTGACAGAGATGAGAGGGCCTGAGGATGGTACCCTTGCTTCTTCACCTTGGGTCATTGAGAGAATCCACCACAA	3365			
		3940	3960	3980	4000
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	TTTCTTCTCGCACACTTCATTAGATGAAGTTGATGTGAGAAATATTTTAGCTTCTGAGCAACGAAAGATATTGGCTGGTT	3460			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	CTTTTTTGCTTCTCGATCCTTAGAAGAAGTGGATGTGAGAAATATACTAGCATCAGAGCAGAGAAAAATCTTAGCTGGTT	3508			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	CTTTTTTGCTTCTCAATCCTTAGAAGAAGTGGATGTGAGAAATATACTTGCATCAGAAACAGAGAAAAATCTTAGCTGGTT	3520			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	TTTTTTTCGCACATCGGTCCATAGATGAAGCTGATGTTAGGAACATTTTAGCGACAGAAACAAAAAAGATTCTGGCAGGTT	3391			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	CTTTTTCTCTCAAAAGTCCCTTGATGATGTGGATGTGAGAAATATATTGGGAGCTGAGCAGCGGAAGATTCTTGCTGGTT	3493			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	CTTCTTTTCCCATCCCAACCTCAATGATGCTGATGTGCGCAGCATACTATCATCTGAGCAGCGGAGGATCCTTGCGGGCT	3469			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	CTTCTTTTCTCATCCCAACCTCAATGATGCTGATGTGCGCAGCATACTATCATCTGAGCAGCGGAGGATCCTTGCGGGCT	3496			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	CTTCTTTTCTCATCCCAACCTCAATGATGCTGATGTGCGCAGCATACTATCATCTGAGCAGCGGAGGATCCTTGCGGGCT	3496			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	TTTCTTTTCACATCCTAACCTCAATGAGGCTGATGTGCGGAGCATACTAGCATCTGAGCAGCGAAGGATCCTTGCTGGTT	3331			
Zea mays ZmCPL3_CDS	TTTTTTTTACATCCTAACCTCAATGAGGCTGACGTGCGGAGCATACTAGCATCTGAGCAGCGAAGGATACTTACTGGTT	3445			
		4020	4040	4060	4080
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	GTAGGATTGTATTTAGTCGGATAATCCAGTGGGTGAAGCCAAACCGCACTTGCATCCCCTGTGGCAAACCTGCTGAGCAG	3540			
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	GTGCGATAGTATTTAGTAGGGTATTTCTGTTGGTGAAGCAAATCCTCACCTTCACCCATTATGGCAGACAGCTGAACAG	3588			
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	GTGCGATAGTATTTAGCAGGGTATTTCTGTTGGTGAAGCAAATCCTCACCTTCACCCATTATGGCAGACAGCTGAACAA	3600			
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	GCCGTATTGTCTTACGACAGAGTGTTCCTGTTGGTGAAGCCAAATCCTCATTTGCATCCTCTGTGGCAGACAGCTGAACAG	3471			
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	GCCGAATCTTGTACAGGGTTTTCCCTGTTGGGGAAGCTAATCCCATTTACACCCACTTTGGCAGACGGCAGAGCAG	3573			
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	GCCGTATTGTCTTTAGCCGGATTTTCCCTGTTGGGAGAGGCTAACCCCACTTGCATCCTCTGTGGCAGACTGCAGAGCAG	3549			
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	GCCGTATTGTCTTTAGCCGGATTTTCCCTGTTGGGAGAGGCTAACCCCACTTGCATCCTCTGTGGCAGACTGCAGAGCAG	3576			
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	GCCGTATTGTCTTTAGCCGGATTTTCCCTGTTGGGAGAGGCTAACCCCACTTGCATCCTCTGTGGCAGACTGCAGAGCAG	3576			
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	GTGATATTGTCTTTAGCCGGTTTTCCAGTTGGGAGCGCCAGCCCACTTGCATCCTCTGTGGCAGACTGCAGAGCAG	3411			
Zea mays ZmCPL3_CDS	GCCGTATTGTCTTTAGCCGGTTTTCCCGTTGGGAGAGCCAGCCCTCACTTGCATCCTCTGTGGCAGACTGCAGAACAG	3525			

Фиг. 2А (продолжение)

	4100	4120	4140	4160
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtCPL3_CDS	TTTGGTGCTGTCTGCACAAACCCAGGTGGATGAACATGTCACTCATGTTGTACAAAATTCTCTTGGAAACCGACAAGGTAA	3620		
<i>Glycine max</i> Glyma.18g282300.2_CDS	TTTGGTGCTTTTTGCACCAATCAGATTGACGAACAGGTTACTCAGCTTGTTCACAAATTCCTTGGGACTGATAAGGTGAA	3668		
<i>Glycine max</i> Glyma.08g257900.1_CDS	TTTGGTGCTGTTCGCACCAACCCAGATTGATGAACAGGTTACTCAGCTAGTTGCAAAATTCCTTGGGACTGATAAGGTGAA	3680		
<i>Solanum tuberosum</i> PGSC0003DMT400052897_CDS	TTTGGTGCTGTCTGCACCTAGTCAAATTGATGATCAGGTTACCCATGTGGTTGCAAAATTCCTTGGGACCGGATAAGGTAA	3551		
<i>Beta vulgaris</i> g12062.t1_CDS	TTTGGTGCTGTGTGCACCAATCAGCTAGATGAACAAGTTACCCACGTAGTGGCAAAATTCCTTAGGGACTGACAAGGTAA	3653		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-B_CDS	TTGGGTGCAGTGTGCACGAACCCAGATTGACGATCGGGTTACTCATGTTGTTGCCAACTCACTAGGAACCGACAAGGTGAA	3629		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-D_CDS	TTGGGTGCAGTGTGCACGAACCCAGATTGACGATCAGGTTACTCATGTTGTTGCCAACTCACTAGGAACCGACAAGGTGAA	3656		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-A_CDS	TTGGGTGCAGTGTGCACGAACCCAGATTGACGATCGGGTTACTCATGTTGTTGCCAACTCACTAGGAACCGACAAGGTGAA	3656		
<i>Sorghum bicolor</i> Sb05g019010.1_CDS	TTTGGTGCGGTCTGCACAAACCTGGTTGATGATCGGGTTACTCATGTTGTTGCCAACTCCCTGGGACAGACAAGGTGAA	3491		
<i>Zea mays</i> ZmCPL3_CDS	TTTGGTGCACTGTGCACAAACCTGGTTGATGATCGGGTCACTCATATTGTTGCAAACTCCCTGGGACAGACAAGGTGAA	3605		
	4180	4200	4220	4240
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtCPL3_CDS	TTGGGCACTAACCAGAGGTAGATTTGTTGTTTCATCCTGGCTGGGTGGAAGCATCAGCTTTTCTGTACGAGAGGCAAATG	3700		
<i>Glycine max</i> Glyma.18g282300.2_CDS	TTGGGCTCTAAACAACGGGAAGATTTGTTGTCCATCCTGGCTGGGTGGAAGCATCAGCATTGCTTTATAGGAGGGCGAATG	3748		
<i>Glycine max</i> Glyma.08g257900.1_CDS	TTGGGCTCTTAACAACGGGAAGATTTGTTGTCCATCCTGGCTGGGTGGAAGCATCAGCATTGCTGTATAGGAGGGCGAATG	3760		
<i>Solanum tuberosum</i> PGSC0003DMT400052897_CDS	TTGGGCACTTTCCACGGGACGATTTGTTGTTTCATCCTGGCTGGGTGGAGGCATCAGCTTTACTTTATCGGAGGGCAAATG	3631		
<i>Beta vulgaris</i> g12062.t1_CDS	TTGGGCTCTGTCAACTAAAAGATTTGTTGTACACCCCTAGCTGGGTTGAAGCTTCTGCATTGCTTTACAGAAGGGTTAATG	3733		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-B_CDS	TTGGGCACTACAAACAGGCAGATTGCTCGTTCAACCAGGATGGGTAGAAGCTTCAGCACTTCTATACCGGGCGTGCCAATG	3709		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-D_CDS	TTGGGCACTACAAACAGGCAGATTGCTCGTTCAACCAGGATGGGTAGAAGCTTCAGCACTTCTATACCGGGCGTGCCAATG	3736		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-A_CDS	TTGGGCACTACAAACAGGCAGATTGCTCGTTCAACCAGGATGGGTAGAAGCTTCAGCACTTCTATACCGGGCGTGCCAATG	3736		
<i>Sorghum bicolor</i> Sb05g019010.1_CDS	TTGGGCATTATCCAAAGGCAAATTTGTTGGTGCATCCAGGATGGGTAGAAGCTTCAGCCCTGTTGTACCGGGCGGCCAACG	3571		
<i>Zea mays</i> ZmCPL3_CDS	TTGGGCATTATCCAAAGGCAAATTCGTAGTGCATCCAGG- - -GGTAGAAGCTTCAGCTCTGTTGTACCGGGCGGCCAACG	3682		
	4260			
<i>Arabidopsis thaliana</i> AtCPL3_CDS	AGAACTTATATGCCATCAACCCGTAA	3726		
<i>Glycine max</i> Glyma.18g282300.2_CDS	AGCAAGATTTTGGCATTAAACCATAA	3774		
<i>Glycine max</i> Glyma.08g257900.1_CDS	AGCAAGATTTTGGCATTAAACCTTAA	3786		
<i>Solanum tuberosum</i> PGSC0003DMT400052897_CDS	AGCATGATTTTGTATTAAATCTTAA	3657		
<i>Beta vulgaris</i> g12062.t1_CDS	AGCAAGACTTTGGCATCAAAACCTTGA	3759		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-B_CDS	AACACGATTTTGCAGTAAAA- - -TAA	3732		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-D_CDS	AACACGATTTTGCAGTAAAA- - -TAA	3759		
<i>Triticum aestivum</i> TaCPL3-A_CDS	AACACGATTTTGCAGTAAAA- - -TAA	3759		
<i>Sorghum bicolor</i> Sb05g019010.1_CDS	AACATGACTTTGCAGTCAAA- - -TAA	3594		
<i>Zea mays</i> ZmCPL3_CDS	AACATGACTTTGCAGTCAAA- - -TAA	3705		

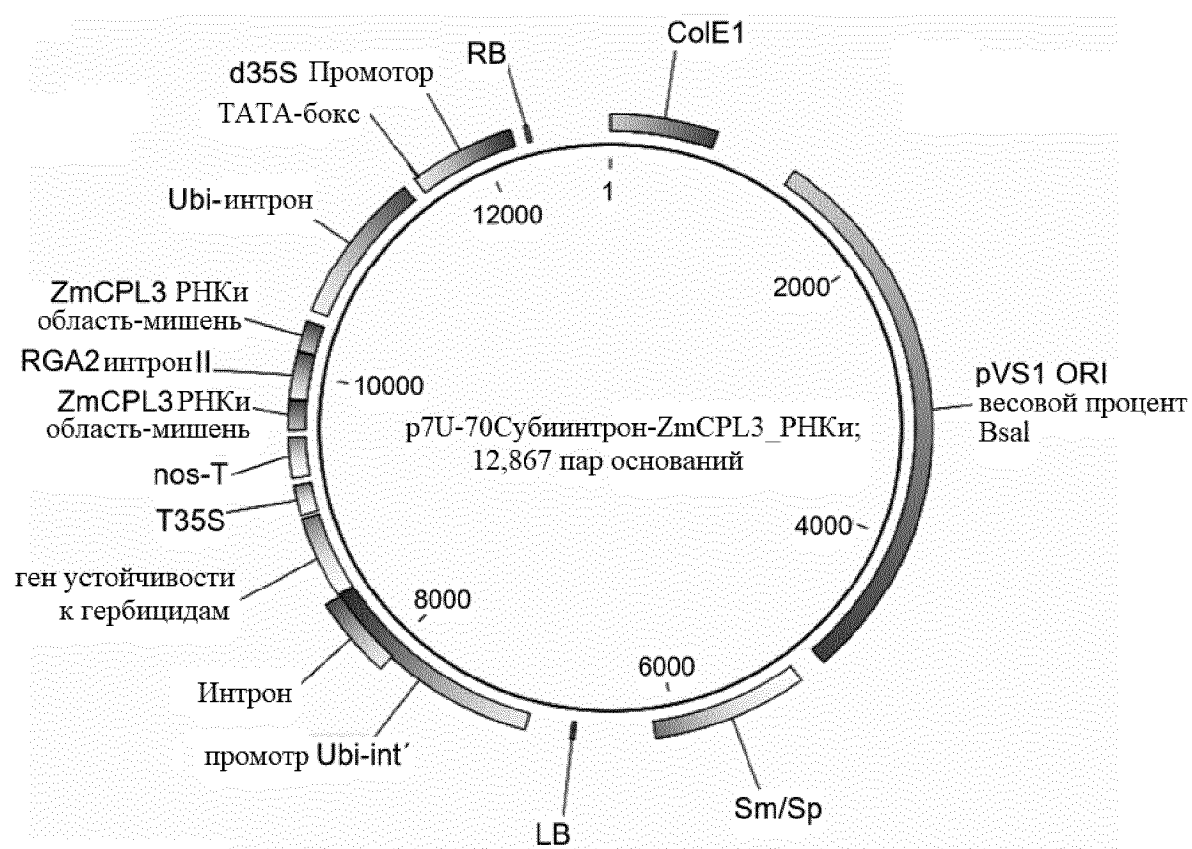
Фиг. 2А (продолжение)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Arabidopsis thaliana AtCPL3_CDS	1		52,85	52,28	50,72	49,37	45,35	45,34	45,62	45,61	44,18
Glycine max Glyma.18g282300.2_CDS	2			93,93	57,55	56,14	46,27	46,49	46,73	46,49	45,36
Glycine max Glyma.08g257900.1_CDS	3				58,23	56,69	45,74	45,96	46,16	46,45	45,50
Solanum tuberosum PGSC0003DMT400052897_CDS	4					54,52	44,87	45,12	45,14	44,58	43,85
Beta vulgaris g12062.t1_CDS	5						43,89	44,11	44,24	44,51	43,40
Triticum aestivum TaCPL3-B_CDS	6							97,87	97,02	69,76	69,04
Triticum aestivum TaCPL3-D_CDS	7								97,85	70,28	69,56
Triticum aestivum TaCPL3-A_CDS	8									70,12	69,45
Sorghum bicolor Sb05g019010.1_CDS	9										89,69
Zea mays ZmCPL3_CDS	10										

Фиг. 2В

	Пустой вектор	Имитационный контроль	Необработанные	Сайленсирующая последовательность TaCPL3_fragA	Сайленсирующая последовательность TaCPL3_fragB
Пикниды $\pm$ SD ANOVA	15,6 $\pm$ 10,9 a ¹	18,6 $\pm$ 10,5 a	20,1 $\pm$ 9,6 ab	4,9 $\pm$ 2,2 bc	3,4 $\pm$ 1,3 c
Споры $\pm$ SD ANOVA	45,3 $\pm$ 15,6 a	70,5 $\pm$ 11,9 a	75,3 $\pm$ 12,8 b	18,8 $\pm$ 4 c	12,8 $\pm$ 3,4 c

Фиг. 3



Фиг. 4

Линия	Номер растения	Оценка болезни (0-100%) 5 + 6. листьев	Биомасса грибов ² ± SD	Экспрессия гена ³ qRT-PCR относительно нетрансгенного сегреганта
A188	33	52,4 ± 20,3	165 ± 96,6	
MTR0374-T-038	8	40,6 ± 14	149,6 ± 74,8	39
MTR0374-T-038 ntg ¹	5	54 ± 5,8	199,3 ± 23,3	100
MTR0374-T-053	12	53 ± 14,3	153,6	50
MTR0374-T-053 ntg ¹	8	48 ± 12,9	213,3	100

Фиг. 5А

Линия	Номер растения	Средний размер растения ³ (см)	Средняя ширина листа (см)	Оценка болезни (0-100%) 5 + 6. листьев
A188	36	61,1	3,9	52,1 a ¹
MTR0374-T2-038	24	62,1	3,8	41,3 bc
MTR0374-T2-038 ntg ²	24	62,6	4,0	49,3 ab
MTR0374-T2-053	24	59,9	4,0	35,8 c
MTR0374-T2-053 ntg ²	24	58,9	3,9	48 ab

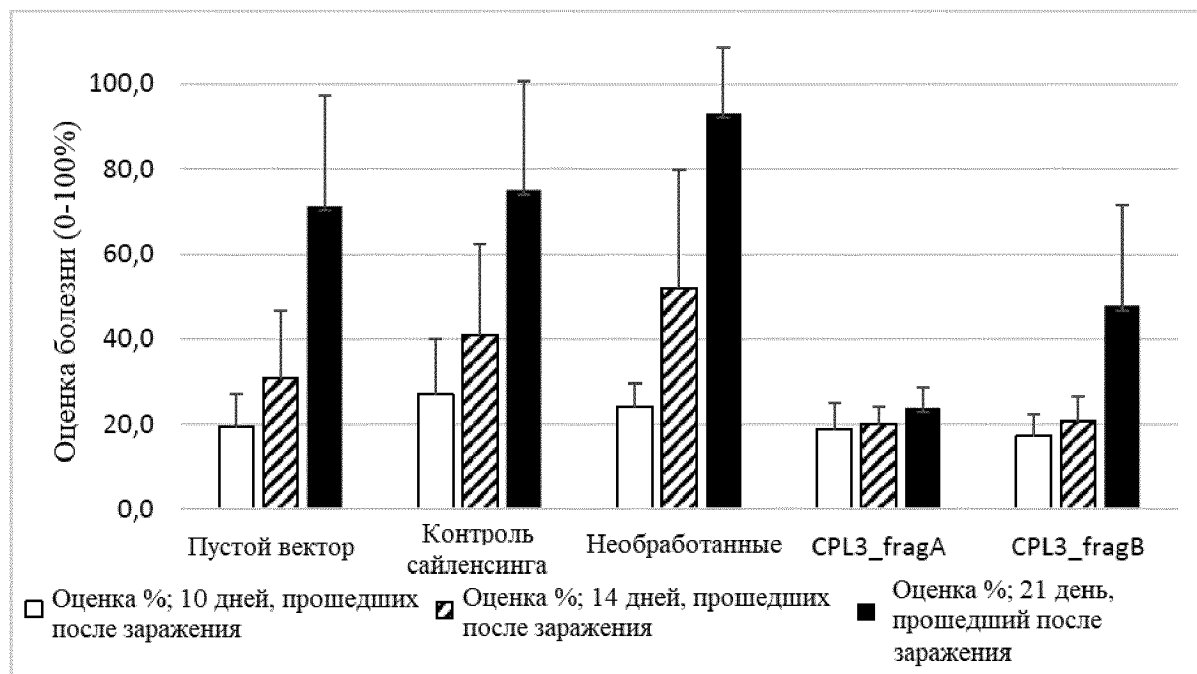
Фиг. 5В

МТR0374-Т2-038
трансгенной ZmCPL3_РНКи
(гомозиготная линия)

МТR0374-Т2-038-ntg
нетрансгенный сегрегант
(незиготическая линия)



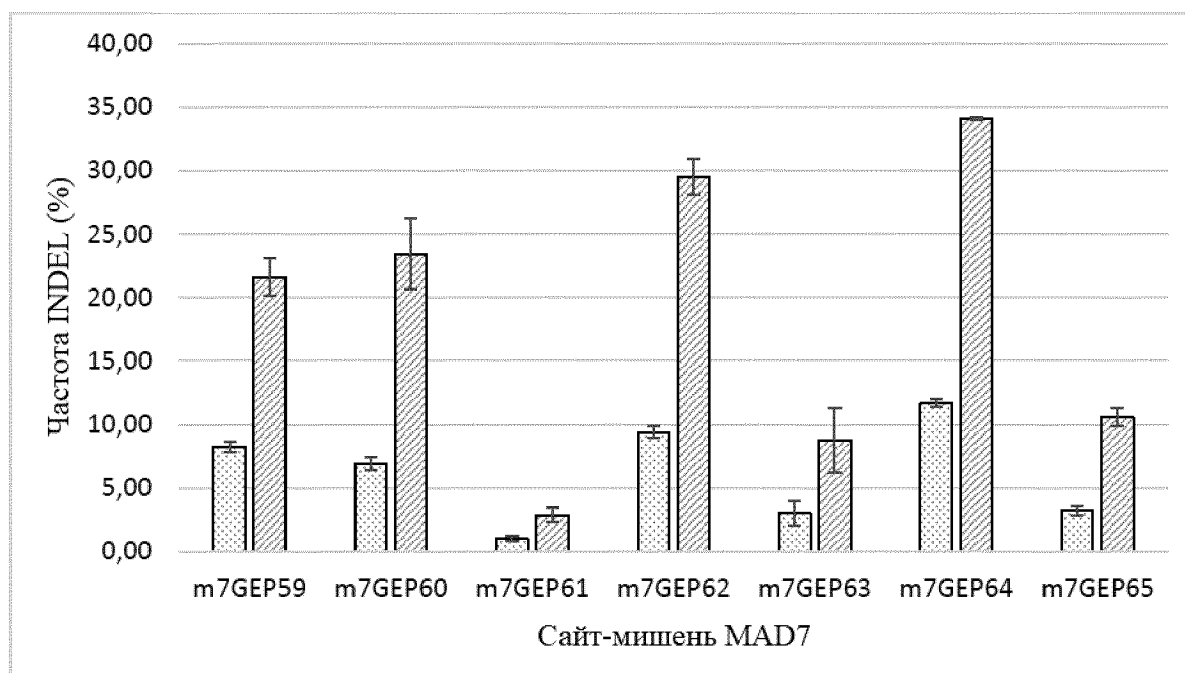
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

Фиг. 10