

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192906** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.25

(51) Int. Cl. **C07K 14/415** (2006.01)
C12Q 1/6895 (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.09.11

(54) ГЕН, МОДИФИЦИРУЮЩИЙ УСТОЙЧИВОСТЬ К ВИРУСУ НЕКРОТИЧЕСКОЙ ЖЕЛТОЙ ПРОЖИЛКИ СВЕКЛЫ (BNYVV)

(31) **18193892.9**

(32) **2018.09.11**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2019/074285**

(87) **WO 2020/053313 2020.03.19**

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

(72) Изобретатель:

**Мюннекхофф Анн-Катрин, Шульц
Бритта, Штирнвайс Даниэль Фабиан,
Торжек Отто, Борхардт Дитрих (DE)**

(74) Представитель:

Зуйков С.А. (RU)

(57) Способ установления, восстановления или повышения опосредованной геном Rz2 устойчивости к вирусу некротической желтой прожилки свеклы (BNYVV) в целевом растении обеспечивается посредством идентификации и предоставления гена, модулирующего указанную устойчивость по настоящему изобретению. В частности, устойчивость к BNYVV, опосредованная геном устойчивости Rz2, зависит от присутствия гена по настоящему изобретению. Ген, участвующий в придании указанной устойчивости, и варианты осуществления настоящего изобретения, которые описаны выше, предлагают дополнительные области применения, например применение аллеля гена, модифицирующего устойчивость, в цис-генетических или транс-генетических подходах с целью создания новых устойчивых сортов.

A1

202192906

202192906

A1

Ген, модифицирующий устойчивость к вирусу некротической желтой прожилки свеклы (BNYVV)

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, участвующий в опосредованной геном устойчивости Rz2 устойчивости к вирусу некротической желтой прожилки свеклы (BNYVV) в растении, в котором экспрессируется полипептид, а также к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей нефункциональный аллель полипептида, препятствующий указанной устойчивости против BNYVV в растении, в котором экспрессируется полипептид. Настоящее изобретение также относится к соответствующим полипептидам, кодируемым молекулами нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, изобретение относится к растению, растительной клетке, органу растения, ткани растения, части растения или семени либо потомку растения, которые содержат любую одну молекулу нуклеиновой кислоты или их части в качестве эндогенного гена или трансгена. Кроме того, настоящее изобретение также включает способы придания, восстановления или повышения устойчивости к BNYVV у растения вида *Beta vulgaris*, содержащего ген устойчивости Rz2, а также способы получения или идентификации и, возможно, отбора растения, устойчивого к BNYVV. Настоящее изобретение также включает способы культивирования растений вида *Beta vulgaris*, противодействующих заражению культивируемых растений BNYVV, а также олигонуклеотидные зонды и праймеры для специфической гибридизации с любой молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Ризомания является наиболее экономически существенным заболеванием сахарной свеклы во всем мире, которое может стать причиной потери 50% урожая и более. Заболевание, также называемое «безумием корня», обуславливается вирусом некротической желтой прожилки свеклы (BNYVV) и передается через почвенный гриб *Polymyxa betae*. Инфекция BNYVV проявляется в виде усиленного разрастания тонких и боковых корней и формирования чрезвычайного уменьшенного тела корня со сниженным содержанием сахара. Зараженные растения обладают пониженным водопоглощением, поэтому менее засухоустойчивы. Когда инфекция распространяется на все растение, жилки листьев становятся желтыми, с некротическими поражениями и желтыми пятнами на листьях. Поскольку лечебный контроль заболевания подобно другим вирусным заболеваниям невозможен, ущерб можно предотвратить исключительно путем

выращивания устойчивых сортов. В настоящее время исследуются три основных гена против ризомании: Rz1 (также известный как «Холли»), Rz2 и Rz3.

Ген устойчивости Rz2, который был идентифицирован и описан в международной патентной заявке WO 2014/202044 A1, происходит от образца *Beta maritima* WB42 и, как известно, обеспечивает повышенную устойчивость к ризомании по сравнению с Rz1, при экспрессии в некоторых сортах сахарной свеклы. Кроме того, известна идентификация Rz3 из образца WB41 *Beta maritima*, который, крайне вероятно, является тем же или очень похожим аллельным вариантом Rz2.

Тем не менее в ходе разработки новых сортов сахарной свеклы было замечено, что определенные генетические фоны обуславливают ослабление или потерю устойчивости несмотря на присутствие устойчивого аллеля Rz2 или Rz3. До настоящего времени ничего не известно о молекулярно-генетическом фоне, обуславливающем наблюдаемый эффект. Тем не менее для достижения эффекта устойчивости, опосредованного Rz2 или Rz3, соответственно, применимого во всех генетических фонах, селекционеры растений рода *Beta* нуждаются в предотвращении наблюдаемого снижения или потери устойчивости.

В частности, цель состоит в идентификации механизма, лежащего в основе наблюдаемого снижения или потери устойчивости, и применении его для создания линий сахарной свеклы, которые демонстрируют стабильную устойчивость к ризомании на основе Rz2 и Rz3 соответственно. В соответствии с настоящим изобретением, эта цель достигается с помощью вариантов осуществления, охарактеризованных в формуле изобретения и описании.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, участвующий в устойчивости к *вирусу некротической желтой прожилки свеклы* (BNYVV), опосредованной геном устойчивости Rz2 в растении, а также к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей нефункциональный аллель полипептида, препятствующий указанной устойчивости против BNYVV, в котором экспрессируется полипептид. Таким образом, в растении продуцируется полипептид, кодируемый любой из молекул нуклеиновой кислоты.

Кроме того, изобретение относится к растению, растительной клетке, органу растения, ткани растения, части растения или семени либо потомку растения, которые эндогенно или трансгенно содержат любую одну из молекул нуклеиновой кислоты или их части. Согласно конкретному необязательному варианту осуществления, те растения и их

компоненты, которые были получены с помощью, по существу, биологического процесса, не подпадают под действие этого правила.

Способы придания, восстановления или повышения устойчивости к BNYVV в растении вида *Beta vulgaris*, содержащем ген устойчивости Rz2, а также способы получения или идентификации и, возможно, отбора растения, устойчивого к BNYVV, также охватываются настоящим изобретением. Настоящее изобретение также включает способы культивирования растений вида *Beta vulgaris*, противодействующих заражению культивируемых растений BNYVV, а также олигонуклеотидные зонды и праймеры для специфической гибридизации с любой молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением.

Таким образом, настоящее изобретение относится к вариантам осуществления, которые перечислены в приведенных ниже пунктах с [1] по [29] и проиллюстрированы на примерах и фигурах.

[1] Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, участвующий в устойчивости к вирусу некротической желтой прожилки свеклы (BNYVV), опосредованной геном устойчивости Rz2 в растении, в котором экспрессируется полипептид, при этом молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая выбирается из группы, состоящей из:

(a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID № 45;

(b) нуклеотидной последовательности, которая содержит кодирующую последовательность ДНК согласно SEQ ID № 44;

(c) нуклеотидной последовательности, гибридизующейся с комплементарной последовательностью нуклеотидной последовательности согласно (a) или (b) в жестких условиях;

(d) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, который, посредством замены, делеции и/или добавления одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности, отличается от полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью согласно (a) или (b);

(e) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 70% идентична аминокислотной последовательности согласно SEQ ID № 45; и

(f) нуклеотидной последовательности, включающей кодирующую последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности ДНК согласно SEQ ID № 44,

при этом аминокислотная последовательность кодируемого полипептида содержит пролин (P) в положении 25 в отношении SEQ ID № 45, пролин (P) в положении 72 в отношении SEQ ID № 45 и/или валин (V) в положении 186 в отношении SEQ ID № 45, или

при этом нуклеиновая кислота кодирующей последовательности ДНК имеет цитозин (с) в положении 73 в отношении SEQ ID № 44, цитозин (с) в положении 214 в отношении SEQ ID № 44 и/или гуанин (g) в положении 556 в отношении SEQ ID № 44.

[2] Молекула нуклеиновой кислоты согласно [1], в которой полипептид имеет аминокислотную последовательность SEQ ID № 8, 12, 16 или 20, или нуклеотидная последовательность, кодирующая указанный полипептид, представляет собой SEQ ID № 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18 или 19, или кодирующая последовательность ДНК представляет собой нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID № 7, 11, 15 или 19.

[3] Молекула нуклеиновой кислоты, которая специфически гибридизуется с молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с [1] или [2] и кодирует нефункциональный аллель полипептида, препятствующий устойчивости растения к BNYVV, опосредованной геном устойчивости Rz2 в растении, в котором экспрессируется полипептид, при этом молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из

(a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID № 4, или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична SEQ ID № 4, при этом полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну аминокислотную замену из-за одной или нескольких мутаций в нуклеотидной последовательности, предпочтительно пролин (P) в положении 25 в отношении SEQ ID № 45, пролин (P) в положении 72 в отношении SEQ ID № 45 и/или валин (V) в положении 186 в отношении SEQ ID № 45 заменен другой аминокислотой; и/или

(b) нуклеотидной последовательности, содержащей кодирующую последовательность ДНК согласно SEQ ID № 3, которая содержит кодирующую последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности ДНК согласно SEQ ID № 3, или которая гибридизуется с комплементарной последовательностью SEQ ID № 3 в жестких условиях, при этом нуклеотидная последовательность содержит по меньшей мере одну замену нуклеиновой кислоты из-за по меньшей мере одной мутации, приводящей к замене аминокислоты, предпочтительно отличающейся тем, что один или несколько нуклеотидов заменены в положениях 73–75 в отношении SEQ ID № 44, в положениях 214–216 в отношении SEQ ID № 44 и/или в положениях 556–558 в отношении SEQ ID № 44.

[4] Молекула нуклеиновой кислоты по п. [3], отличающаяся тем, что кодируемый полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую

(i) аланин (А) вместо пролина (Р) в положении 25, в отношении SEQ ID № 45,
(ii) треонин (Т) вместо пролина (Р) в положении 72, в отношении SEQ ID № 45,
и/или

(iii) изолейцин (I) вместо валина (V) в положении 186, в отношении SEQ ID № 45.

[5] Молекула нуклеиновой кислоты по п. [3] или [4], отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность ДНК, имеющую

(i) гуанин (g) вместо цитозина (c) в положении 73, в отношении SEQ ID № 44,
(ii) аденин (a) вместо цитозина (c) в положении 214, в отношении SEQ ID № 44,
и/или

(iii) аденин (a) вместо гуанина (g) в положении 556, в отношении SEQ ID № 44.

[6] Молекула нуклеиновой кислоты по любому из п. [3]–[5], отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит кодирующую последовательность ДНК, дополнительно содержащую

(i) аденин (a) вместо гуанина (g) в положении 72, в отношении SEQ ID № 44,
и/или

(ii) аденин (a) вместо гуанина (g) в положении 111, в отношении SEQ ID № 44.

[7] Полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с п. [1] или [2] или любым из пп. [3]–[6].

[8] Вектор или кассета экспрессии, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с п. [1] или [2] или любым из пп. [3]–[6], предпочтительно при этом молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с п. [1] или [2] или любым из пп. [3]–[6] функционально связана с гетерологическим регуляторным элементом, предпочтительно отличающимся тем, что регуляторный элемент является промотором.

[9] Клетка, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с п. [1] или [2] или любым из пп. [3]–[6], полипептид в соответствии с п. [7] или вектор либо кассету экспрессии в соответствии с п. [8].

[10] Растение или его часть, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с п. [1] или [2] эндогенно или трансгенно или вектор либо кассету экспрессии, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с п. [1] или [2], как определено в п. [8], как трансгенные.

[11] Растение или его часть по п. [10], отличающиеся тем, что дополнительно содержат ген устойчивости Rz2, опосредующий устойчивость к BNYVV эндогенно или трансгенно.

[12] Семя или потомок растения согласно п. [10] или [11], при этом семя или потомок эндогенно или трансгенно содержат молекулу нуклеиновой кислоты согласно п. [1] или [2], или вектор, или кассету экспрессии согласно п. [8].

[13] Семя согласно п. [12], прошедшее техническую обработку, при этом техническая обработка выбирается из группы, состоящей из:

- (a) шлифовки,
- (b) протравливания, предпочтительно гранулирования,
- (c) инкрустации и
- (d) окрашивания.

[14] Олигонуклеотид или пара олигонуклеотидов из по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20, предпочтительно по меньшей мере 21, 22, 23, 24 или 25, особенно предпочтительно по меньшей мере 30, 35, 40, 45 или 50 и более, особенно предпочтительно по меньшей мере 100, 200, 300 или 500 нуклеотидов в длину, при этом олигонуклеотид или пара олигонуклеотидов

(i) специфически гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, определенной в любом из пп. [3]–[6], но не с нуклеотидной последовательностью, определенной в п. [1] или [2];

(ii) специфически гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, определенной в п. [1] или [2], но не с нуклеотидной последовательностью, определенной в любом из пп. [3]–[6];

(iii) специфически гибридизуется с областью в геноме *Beta vulgaris*, которая в *Beta vulgaris* косегрегируется с молекулой нуклеиновой кислоты по любому из п. [3]–[6] и/или с молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп. [3]–[6] вместе с геном Rz2; и/или

(iv) специфически гибридизуется с участком генома *Beta vulgaris*, который в *Beta vulgaris* косегрегируется с молекулой нуклеиновой кислоты согласно п. [1] или [2] и/или с молекулой нуклеиновой кислоты согласно п. [1] или [2] вместе с геном Rz2.

[15] Олигонуклеотид или пара олигонуклеотидов согласно п. [14], при этом олигонуклеотид или пара олигонуклеотидов выбраны из группы, состоящей из SEQ ID №: 24–40.

[16] Способ придания, восстановления или повышения устойчивости к BNYVV у растения вида *Beta vulgaris*, содержащего ген устойчивости Rz2, опосредующий устойчивость к BNYVV эндогенно или трансгенно, включая следующие этапы:

(i) интеграция или интрогрессия молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с п. [1] или [2] посредством гомологически-направленной репарации или гомологичной рекомбинации, предпочтительно с помощью сайт-направленной нуклеазы, в геном по

меньшей мере одной клетки растения вида *Beta vulgaris* и, необязательно, регенерации растения из растительной клетки; или

(ii) повышение экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты согласно п. [1] или [2] в растении, предпочтительно посредством модификации нативного промотора или посредством слияния молекулы нуклеиновой кислоты с гетерологическим промотором, который проявляет более высокую активность по сравнению с нативным промотором, в частности после инфицирования BNYVV; или

(iii) повышение активности и/или стабильности функционального аллеля полипептида, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2], как определено в п. [7], посредством модификации нуклеотидной последовательности по п. [1] или [2];

(iv) трансформация растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2], или вектором, или кассетой экспрессии, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2], как это определено в п. [8] и, необязательно, регенерация трансгенного растения из трансформированной растительной клетки; или

(v) мутагенез растения или растительных клеток, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из пп. [3]–[6], и скрининг/отбор растений или растительных клеток, соответственно, в которых функциональный аллель полипептида, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2], был восстановлен и/или в которых была отменена экспрессия нефункционального полипептида.

[17] Способ получения BNYVV-устойчивого растения, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2], как это определено в п. [10], включающий следующие этапы:

(I) получение растения рода *Beta* или растительной клетки рода *Beta*, содержащей ген устойчивости Rz2, опосредующий устойчивость к BNYVV эндогенно или трансгенно; и

(IIa) трансформация растительной клетки (I) молекулой нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2], или вектором, или кассетой экспрессии, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2], как это определено в п. [8]; и

(IIb) регенерация трансгенного растения из трансформированной растительной клетки; или

(IIIa) введение сайт-направленной нуклеазы или нуклеазы и, необязательно, репарационной матрицы или сайт-направленного редактора оснований в клетку растения, при этом сайт-направленная нуклеаза способна генерировать по меньшей мере один одноцепочечный разрыв ДНК или по меньшей мере один двухцепочечный разрыв ДНК в

заданном месте в геноме клетки, а матрица репарации содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2], или отличающейся тем, что сайт-направленный редактор оснований может генерировать по меньшей мере один одноцепочечный разрыв ДНК в заданном месте генома клетки и преобразовывать по меньшей мере одно азотистое основание; и

(IIIb) необязательно, культивирование клетки из (IIIa) в условиях, которые позволяют модифицировать геном в заданном месте, выбранном из

- a) замены по меньшей мере одного нуклеотида;
- b) делеции по меньшей мере одного нуклеотида;
- c) вставки по меньшей мере одного нуклеотида;
- d) любой комбинации a) - c),

необязательно, путем гомологически направленной репарации или гомологичной рекомбинации,

при этом молекула нуклеиновой кислоты интегрирована в геном растения; и

(IIIc) регенерации растения из клетки, модифицированной в (IIIb); или

(IVa) скрещивания растения (I) с растением в соответствии по любому из пп. [10]–[12]; и

(IVb) идентификации и выбора растения, содержащего ген устойчивости Rz2, опосредующий BNYVV эндогенно или трансгенно, и молекулу нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2], эндогенно или трансгенно, при этом ген устойчивости Rz2 и/или молекула нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2] гомозиготно присутствует в геноме растения.

[18] Способ по п. [17], отличающийся тем, что заданное место находится в молекуле нуклеиновой кислоты по любому из пп. [3]–[6] или в положении, которое находится не более чем на 10.000 пар оснований выше или ниже от молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. [3]–[6].

[19] Способ идентификации растения вида *Beta vulgaris*, его части или семени, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с п. [1] или [2], при этом растение способно проявлять устойчивость к BNYVV, опосредованную Rz2, если он присутствует в геноме растения, содержащего:

(i) обнаружение присутствия и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2], или присутствия полипептида, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2], как это определено в п. [7], в растении, его части или его семени; и/или

(ii) обнаружение по меньшей мере одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2] или в одной или нескольких их косегрегационных областях; и

(iii) идентификация и, необязательно, отбор растения вида *Beta vulgaris*, его части или его семени, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2], которое способно проявлять устойчивость к BNYVV, опосредованную Rz2, если он присутствует в геноме растения, на основании обнаружения (i) и/или (ii).

[20] Способ идентификации растения вида *Beta vulgaris*, его части или его семени, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по любому из п. [3]–[6], включающий:

(i) обнаружение присутствия и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. [3]–[6], или присутствия полипептида, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты по любому из п. [3]–[6], как это определено в п. [7], в растении, его части или его семени; и/или

(ii) обнаружение, по меньшей мере, одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. [3]–[6] или в одной или нескольких ее косегрегационных областях; и

(iii) идентификация и, необязательно, выбор растения вида *Beta vulgaris*, его части или его семени, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. [3]–[6], на основании обнаружения (i) и/или (ii).

[21] Способ по п. [19] или [20], в котором обнаружение по меньшей мере одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2] или в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. [3]–[6] включает применение олигонуклеотида или пары олигонуклеотидов по п. 14 или 15, и в котором одна или несколько косегрегационных областей являются геномными интервалами в *Beta vulgaris* на хромосоме 3, которые содержат и фланкированы маркерными локусами, обнаруживаемыми с помощью

(i) маркеров *s3e5985s01* (SEQ ID № 33) и *s3p4348s01* (SEQ ID № 27), и/или

(ii) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e2247xxx* (SEQ ID № 40),

предпочтительно, с помощью

(i) маркеров *sxh1002s02* (SEQ ID № 34) и *s3p4348s01* (SEQ ID № 27), и/или

(ii) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *sxn1017s02* (SEQ ID № 39),

более предпочтительно, с помощью

(i) маркеров *sxh2499s01* (SEQ ID № 35) и *s3p4348s01* (SEQ ID № 27), и/или

(ii) маркеров *sxi0698s01* (SEQ ID № 36) и *s3p4348s01* (SEQ ID № 27), и/или

(iii) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *sxe7357s01* (SEQ ID № 38), и/или

- (iv) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *sxh8485s01* (SEQ ID № 37), и/или
- (v) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e5853s01* (SEQ ID № 26), и/или
- (vi) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e5800s01* (SEQ ID № 32), и/или
- (vii) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e4913xxx* (SEQ ID № 31), и/или
- (viii) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e5782s01* (SEQ ID № 30).

[22] Способ по п. [19] или [21], дополнительно включающий

(A) обнаружение присутствия и/или экспрессии гена *Rz2* или присутствия полипептида, кодируемого геном *Rz2*, в растении, его части или его семени; и/или

(B) обнаружение по меньшей мере одного маркерного локуса в гене *Rz2* или в одной или нескольких областях, косегрегационных с геном *Rz2*, предпочтительно косегрегированных с хромосомным интервалом, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2] и ген *Rz2*;

при этом в (iii) по п. [19] идентифицированное и, необязательно, выбранное растение, его часть или его семя содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2], и ген *Rz2*, на основании обнаружения (i) и/или (ii) по п. [19] и обнаружения (B).

[23] Способ по п. [22], в котором по меньшей мере один маркерный локус в нуклеотидной последовательности гена *Rz2* обнаруживается с помощью маркера *s3e5853s01* (SEQ ID № 26), и в котором одна или несколько областей, косегрегированных с геном *Rz2*, представляют собой геномные интервалы в *Beta vulgaris* на хромосоме 3, которые включают и фланкированы маркерными локусами, обнаруживаемыми с помощью

(i) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e5853s01* (SEQ ID № 26), и/или

(ii) маркеров *s3e5853s01* (SEQ ID № 26) и *s3e2247xxx* (SEQ ID № 40),

предпочтительно, с помощью

(i) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e5853s01* (SEQ ID № 26), и/или

(ii) маркеров *s3e5853s01* (SEQ ID № 26) и *sxn1017s02* (SEQ ID № 39),

более предпочтительно, с помощью

(i) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e5853s01* (SEQ ID № 26), и/или

(ii) маркеров *s3e5853s01* (SEQ ID № 33) и *sxe7357s01* (SEQ ID № 38), и/или

(iii) маркеров *s3e5853s01* (SEQ ID № 26) и *sxh8485s01* (SEQ ID № 37).

[24] Способ по п. [22], в котором в одной или нескольких областях, косегрегированных с хромосомным интервалом, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2], и ген *Rz2* являются геномными интервалами в *Beta vulgaris* на хромосоме 3, которые содержат в себе и фланкированы маркерными локусами, обнаруживаемыми с помощью

(i) маркеров *s3e5985s01* (SEQ ID № 33) и *s3p4348s01* (SEQ ID № 27), и/или

(ii) маркеров *s3e5853s01* (SEQ ID № 26) и *s3e2247xxx* (SEQ ID № 40),

предпочтительно, с помощью

(i) маркеров *sxh1002s02* (SEQ ID № 34) и *s3p4348s01* (SEQ ID № 27), и/или

(ii) маркеров *s3e5853s01* (SEQ ID № 26) и *sxn1017s02* (SEQ ID № 39),

более предпочтительно, с помощью

(i) маркеров *sxh2499s01* (SEQ ID № 35) и *s3p4348s01* (SEQ ID № 27), и/или

(ii) маркеров *sxi0698s01* (SEQ ID № 36) и *s3p4348s01* (SEQ ID № 27), и/или

(iii) маркеров *s3e5853s01* (SEQ ID № 26) и *sxe7357s01* (SEQ ID № 38), и/или

(iv) маркеров *s3e5853s01* (SEQ ID № 26) и *sxh8485s01* (SEQ ID № 37).

[25] Применение олигонуклеотида или пары олигонуклеотидов по п. [14] или [15] для идентификации и/или выбора растения вида *Beta vulgaris*, способного проявлять устойчивость к BNYVV, опосредованной Rz2, если он присутствует в геноме растения, или способность которого проявлять устойчивость к BNYVV, опосредованной Rz2, если он присутствует в геноме растения, нарушена.

[26] Способ культивации растений вида *Beta vulgaris*, в том числе

(i) посадка саженцев растения в соответствии с п. [10] или [11] или посев семян в соответствии с п. [12] или [13], и

(ii) выращивание растений из рассады или семян, и,

(iii) необязательно, сбор корнеплодов свеклы выращенных растений;

при этом способ противодействует заражению культивируемых растений BNYVV.

[27] Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2] или молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. [3]–[6], полипептида по п. [7], вектора или кассеты экспрессии по п. [8] и/или клетки по п. [9] для идентификации молекул нуклеиновых кислот, участвующих в опосредованной Rz2 устойчивости к BNYVV.

[28] Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2] или молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. [3]–[6], полипептида по п. [7] и/или вектора или кассеты экспрессии по п. [8] для получения устойчивых к BNYVV растений, предпочтительно растений вида *Beta vulgaris*, более предпочтительно растений *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *vulgaris*, *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *conditiva*, или *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *crassa/alba*.

[29] Молекула нуклеиновой кислоты по пп. [1]–[6], растение или его часть по п. [11], олигонуклеотид или пара олигонуклеотидов по п. [14] или [15], способы по любому из пп. [16]–[19] и [22]–[24], и применение по п. [25] и [27], при этом ген Rz2 или ген устойчивости Rz2 представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, выбранную из

а) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID № 22 или SEQ ID № 23;

б) нуклеотидной последовательности, содержащей кодирующую последовательность последовательности ДНК согласно SEQ ID № 21;

с) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, полученный путем замены, делеции и/или добавления аминокислоты в аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью согласно а) или б), из полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью согласно а) или б),

д) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью согласно а) или б), или

е) нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере положения 168–227 аминокислоты SEQ ID № 22 и по меньшей мере в положениях 591–613 аминокислоты SEQ ID № 22 и по меньшей мере в положениях 1013–1072 аминокислоты SEQ ID № 22, или кодирующей по меньшей мере положения 182–241 аминокислоты SEQ ID № 23 по меньшей мере в положениях 605–627 аминокислоты SEQ ID № 23 и по меньшей мере в положениях 1027–1086 аминокислоты SEQ ID № 23.

[30] Способ по п. [19], в котором обнаружение в соответствии с этапом (i) и/или этапом (ii) основано на ПЦР, предпочтительно на конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP), в которой, необязательно, применяются меченые праймеры.

[31] Способ по п. [20], в котором обнаружение в соответствии с этапом (i) и/или этапом (ii) основано на ПЦР, предпочтительно на конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP), в которой, необязательно, применяются меченые праймеры.

[32] Способ по п. [26], в котором посев по п. (i) осуществляется механическим устройством, которое предпочтительно выбирается из группы, состоящей из сеялки, сеялки с баночными высевальными аппаратами и рядовой сеялки.

[33] Способ по п. [26] или [32], в котором уборка урожая по п. (iii) осуществляется механическим устройством, которым может быть комбайн, предпочтительно комбайн для уборки сахарной свеклы.

[34] Способ по п. [26], [32] или [33], в котором листья растения удаляют механически, во время сбора урожая, по п. (iii), в котором механическое удаление предпочтительно выполняется комбайном, как это определено в п. [33].

[35] Способ по п. [26], [32], [33] или [34], содержащий дополнительный этап

(iv) извлечение сахара, предпочтительно сахарозы, из собранных корнеплодов свеклы.

[36] Применение по п. [25] олигонуклеотида или пары олигонуклеотидов по п. [14] или [15], при котором олигонуклеотид или пара олигонуклеотидов помечены, предпочтительно флуоресцентно-меченные, более предпочтительно флуоресцентно-меченные FAM или HEX.

[37] Клеточный экстракт клетки по п. [9], растения или его части по п. [10] или [11].

[38] Клеточный экстракт по п. [37], содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. [1].

[39] Клеточный экстракт по п. [37] или [38], в котором клеточный экстракт содержит сахарозу.

[40] Клеточный экстракт по п. [37], [38] или [39], в котором концентрация сахарозы составляет не менее 10%, предпочтительно не менее 15%, более предпочтительно не менее 20% и наиболее предпочтительно 10–20%, при этом концентрация указана в качестве массовой концентрации [г/дл].

[41] Способ по п. [19] или [20], в котором идентифицированное растение или его семя применяются в способе по п. [26], [32], [33] или [34].

[42] Полипептид по п. [7], в котором белок содержит одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен в последовательности SEQ ID № 45.

[43] Полипептид по п. [7], в котором полипептид представляет собой искусственное соединение, не встречающееся в природе.

[44] Способ получения молекулярных маркеров для идентификации молекулы нуклеиновой кислоты по п. [1], включающий следующие этапы:

а) Обеспечение выравнивания последовательностей между SEQ ID № 54 и SEQ ID № 55.

б) Идентификация по меньшей мере одного полиморфизма между SEQ ID № 54 и SEQ ID № 55.

с) Разработка еще одного молекулярного маркера, подходящего для обнаружения полиморфизма, указанного в п. б).

[45] Способ по п. [44], в котором по меньшей мере один полиморфизм представляет собой однонуклеотидный полиморфизм.

[46] Применение молекулярного маркера на нуклеотидной последовательности по SEQ ID № 54 для идентификации молекулы нуклеиновой кислоты по п. [1] или для идентификации растения, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по п. [1].

Во-первых, некоторые термины, используемые в этой заявке, подробно объясняются ниже:

В сочетании с указанием длины нуклеотидной последовательности термин «приблизительно» означает отклонение на +/- 200 пар оснований, предпочтительно на +/- 100 пар оснований и более предпочтительно на +/- 50 пар оснований.

«Растение рода *Beta*» принадлежит к семейству амарантовых (*Amaranthaceae*). Среди этих растений есть растения видов *Beta macrocarpa*, *Beta vulgaris*, *Beta lomatogona*, *Beta macrorrhiza*, *Beta corolliflora*, *Beta trigyna* и *Beta nana*. Растение вида *Beta vulgaris* является, в частности, растением подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*. Например, среди них существуют *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *altissima* (сахарная свекла в более узком смысле), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *vulgaris* (мангольд), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *conditiva* (свекла / красная свекла), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *crassa/alba* (свекла кормовая).

«Функциональный фрагмент» нуклеотидной последовательности означает сегмент нуклеотидной последовательности, который имеет функциональность, идентичную или сопоставимую с функциональностью полной нуклеотидной последовательности, из которой происходит функциональный фрагмент. Таким образом, функциональный фрагмент может иметь нуклеотидную последовательность, идентичную или гомологичную общей нуклеотидной последовательности на протяжении по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% или 99%. Это также в явной форме охватывает диапазон от 90 до 100%. Кроме того, «функциональный фрагмент» нуклеотидной последовательности может также означать сегмент нуклеотидной последовательности, модифицирующий функциональность всей нуклеотидной последовательности, например, в ходе посттранскрипционного или транскрипционного сайленсинга гена. Таким образом, функциональный фрагмент нуклеотидной последовательности может включать по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25, предпочтительно по меньшей мере 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 или 140 и особо предпочтительно по меньшей мере 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 последовательных нуклеотидов общей нуклеотидной последовательности. Это также в явной форме охватывает диапазон от 21 до 50 нуклеотидов.

«Функциональная часть» белка подразумевает сегмент белка или часть аминокислотной последовательности, кодирующей белок, отличающийся тем, что этот сегмент может обладать функциональностью, идентичной или сопоставимой с функциональностью всего белка в растительной клетке. В длину не менее 50%, 55%, 60%,

65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% или 99%, функциональная часть белка имеет аминокислотную последовательность, которая идентична или, с учетом консервативных и полуконсервативных замен аминокислот, аналогична белку, из которого происходит функциональная часть.

Термин «гетерологический» означает, что введенный полинуклеотид происходит из клетки или организма с другим генетическим фоном того же или другого вида или гомологичен прокариотической или эукариотической клетке-хозяину, но затем помещается в другое генетическое окружение и, таким образом, отличается от соответствующего полинуклеотида, который, возможно, есть в природе. Гетерологический полинуклеотид может присутствовать в дополнение к соответствующему эндогенному гену.

В смысле изобретения под «гомологом» понимается белок того же филогенетического происхождения; под «аналогом» понимается белок, выполняющий ту же функцию, но имеющий другое филогенетическое происхождение; под «ортологом» понимается белок другого вида, выполняющий ту же функцию; под «паралогом» понимается белок, который появился у вида из-за дупликации, при этом эта копия либо сохраняет ту же функцию белка, изменяет его шаблон экспрессии, но не функцию, изменяет его функцию белка, либо делит на части функцию исходного гена между обеими копиями.

Под «скрещиванием», или «гибридизацией» понимается процесс, в котором одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты соединяется с цепью нуклеиновой кислоты, которая является максимально комплементарной, т. е. образует с ней пары оснований. Стандартные способы гибридизации описаны, например, в Сембрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001. Под этим предпочтительно подразумевается, что по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80% или 85% и особо предпочтительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% оснований молекулы нуклеиновой кислоты образуют пару оснований с цепью нуклеиновой кислоты, которая является максимально комплементарной. Возможность такого отжига зависит от жесткости условий гибридизации. Термин «жесткость» относится к условиям гибридизации. Высокая жесткость наблюдается в случае, если спаривание оснований затруднено; низкая жесткость наблюдается в случае, если спаривание оснований упрощается. Например, жесткость условий гибридизации зависит от концентрации соли или ионной силы и температуры. Как правило, жесткость может быть увеличена за счет повышения температуры и/или уменьшения содержания соли. Под «жесткими условиями гибридизации» следует понимать такие условия, при которых гибридизация преимущественно происходит исключительно между гомологичными молекулами

нуклеиновой кислоты. Термин «условия гибридизации», таким образом, относится не только к условиям, преобладающим при фактическом добавлении нуклеиновых кислот, но и к условиям, преобладающим на следующих этапах экстракции. Например, жесткие условия гибридизации — это условия, при которых преимущественно гибридизуются только те молекулы нуклеиновых кислот, которые имеют по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей. Жесткими условиями гибридизации являются, например: гибридизация при $4 \times \text{SSC}$ при 65 °C и последующая повторная экстракция при $0,1 \times \text{SSC}$ при 65 °C в течение в целом примерно 1 часа. Гибридизация предпочтительно происходит в жестких условиях.

В отношении нуклеиновой кислоты в форме двухцепочечной ДНК «комплементарная» нуклеотидная последовательность означает, что вторая цепь ДНК, комплементарная первой цепи ДНК, имеет нуклеотиды, соответствующие основаниям первой цепи, в соответствии с базовыми правилами спаривания. Комплементарная последовательность предпочтительно полностью комплементарна контрпоследовательности и, таким образом, предпочтительно имеет аналогичную длину.

Под «изолированной молекулой нуклеиновой кислоты» понимается молекула нуклеиновой кислоты, извлеченная из ее естественного или исходного окружения. Термин также включает охватывает молекулу нуклеиновой кислоты, полученную синтетическим путем. Под «изолированным полипептидом» понимается полипептид, экстрагированный из его естественного или исходного окружения. Термин также включает полипептид, полученный синтетическим путем.

«Молекулярный маркер» представляет собой нуклеиновую кислоту, полиморфную в популяции растений и используемую в качестве опорной точки или ориентира. Маркер для обнаружения события рекомбинации должен быть подходящим для мониторинга различий или полиморфизмов в популяции растений. Таким образом, такой маркер способен обнаруживать и различать различные аллельные состояния (аллели). Термин «молекулярный маркер» также относится к нуклеотидным последовательностям, которые комплементарны или по меньшей мере в значительной степени комплементарны или гомологичны геномным последовательностям, например, нуклеиновым кислотам, используемым в качестве зондов или праймеров. Эти различия на уровне ДНК следует искать в виде маркеров, и они представляют собой, например, различия полинуклеотидных последовательностей, например, SSR (*простые повторы последовательностей*), RFLP (*полиморфизмы длины рестрикционных фрагментов*), FLP (*полиморфизмы длины фрагментов*) или SNP (*одиночные нуклеотидные полиморфизмы*). Маркеры могут

происходить из геномных или экспрессированных нуклеиновых кислот, например, сплайсированной РНК, кДНК или маркеров экспрессируемых последовательностей, а также могут относиться к нуклеиновым кислотам, которые применяются в качестве зондов или пар праймеров и, как таковые, подходят для амплификации фрагмента последовательности с применением способов на основе ПЦР. Маркеры, описывающие генетический полиморфизм (между частями популяции), могут быть обнаружены с применением хорошо зарекомендовавших себя способов из предшествующего уровня техники (Введение в генетический анализ, 7-е издание, Гриффитс, Миллер, Сузуки, *и соавт.*, 2000). Например, к ним относятся ДНК-секвенирование, сиквенс-специфичная амплификация на основе ПЦР, верификация RFLP, проверка полинуклеотидных полиморфизмов посредством аллель-специфической гибридизации (ASH), обнаружение амплифицированных переменных последовательностей генома растения, обнаружение 3SR (*самоподдерживающаяся репликация последовательности*), обнаружение SSR, SNP, RFLP или AFLP (*полиморфизмы длины амплифицированного фрагмента*). Кроме того, также известны способы обнаружения EST (*маркерные экспрессируемые последовательности*) и маркеров SSR, происходящих из последовательностей EST и RAPD (*случайно амплифицированная полиморфная ДНК*). В зависимости от контекста, термин «маркер» в описании может также означать конкретное положение хромосомы в геноме вида, где может быть обнаружен конкретный маркер (например, SNP).

Маркеры также включают синтетические олигонуклеотиды, которые могут быть связаны с одной или несколькими молекулами обнаружения, при этом молекулы обнаружения могут применяться для реакции обнаружения или формирования сигнала в рамках способа верификации. Синтетические олигонуклеотиды также включают меченые праймеры. Меченый праймер включает флуоресцентно-меченые праймеры. Флуоресцентно-меченные праймеры могут быть помечены FAM или HEX. Синтетические олигонуклеотиды и меченые праймеры можно применять в рамках полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также в рамках конкурентной аллель-специфической ПЦР. Синтетические олигонуклеотиды и меченые праймеры являются искусственными соединениями, они не встречаются в природе и их невозможно изолировать из природной среды. Получение таких соединений более подробно описано ниже.

«Промотор» представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность ДНК, расположенную, как правило, перед кодирующей областью, которая содержит точку связывания для РНК-полимеразы и инициирует транскрипцию ДНК. Промотор дополнительно содержит другие элементы, которые действуют в качестве гена-регулятора экспрессии гена (например, цис-регуляторные элементы). «Ядерный или

минимальный промотор» — это промотор, имеющий основные элементы, необходимые для инициации транскрипции (например, ТАТА-бокс и/или инициатор).

«Патоген» — это организм, который при взаимодействии с растением вызывает симптомы заболевания в одном или нескольких органах растения. Например, к этим патогенам относятся животные, грибковые, бактериальные или вирусные организмы, или оомицеты.

Под «патогенной инфекцией» следует понимать самый ранний момент времени, когда патоген взаимодействует с тканью растения-хозяина. В этом смысле «заражение» означает возникновение контакта между патогеном и хозяином. Например, вирусный патоген BNYVV передается через почвенный гриб *Polymyxa betae*. Полимикса формирует споры, которые могут сохраняться в почве десятилетиями. В этих спорах выживает и вирус. Если эти постоянные споры приводят к формированию планоспор, вирус может прорасти через них в клетки ткани растения-хозяина и взаимодействовать с хозяином (Esser (2000) Kryptogamen 1: Cyanobakterien Algen Pilze Flechten Praktikum und Lehrbuch. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 3-е издание).

«Органы» растения подразумевают, например, листья, побеги, стебель, корни, гипокотиль, вегетативные почки, меристемы, зародыши, пыльники, семязачатки, семена или плоды. «Части растения» включают, но не ограничиваются побегами или стеблями, листьями, цветами, соцветиями, корнями, плодами и семенами, а также пыльцой. Термин «части растения» также означает объединение нескольких органов, например, цветка или семени, или часть органа, напр. поперечный разрез побега растения. «Ткани» растений — это, например, каллусная ткань, запасная ткань, меристематическая ткань, ткань листа, ткань побега, ткань корня, ткань опухоли растения или репродуктивная ткань, а также камбий, паренхима, сосудистая ткань, склеренхима и эпидермис. Тем не менее ткань не ограничивается этим списком. Например, под растительными «клетками» следует понимать, например, изолированные клетки, имеющие клеточную стенку или ее агрегаты, или протопласты.

Уровень устойчивости, например, к BNYVV, может быть определен качественно у растений рода *Beta* путем определения «рейтинговых баллов» (схемы рейтинговых баллов для растений рода *Beta* известны из предыдущего уровня техники, например, для сахарной свеклы. Мечелке (1997)).

В отношении настоящего изобретения термин «регуляторная последовательность» относится к нуклеотидной последовательности, влияющей на специфичность и/или силу экспрессии, напр., в том смысле, что регуляторная последовательность придает определенную тканевую специфичность. Такая регуляторная последовательность может

находиться перед точкой инициации транскрипции минимального промотора, но также и после него, напр. в транскрибируемой, но не транслируемой лидерной последовательности или внутри интрона.

Термин «устойчивость» следует понимать в широком смысле, он охватывает диапазон защиты от ретардации до полного блокирования развития заболевания. Одним из примеров важного патогена является *вирус некротической желтой прожилки свеклы* (BNYVV). Устойчивая растительная клетка по этому изобретению или устойчивое растение по этому изобретению предпочтительно достигает устойчивости к BNYVV. Устойчивость к патогену должна быть приравнена к устойчивости к болезни, которую вызывает этот патоген; например, устойчивость к BNYVV также является устойчивостью к «безумию корня» (ризомании).

Ген устойчивости к Rz2, который был идентифицирован и описан в международной патентной заявке WO 2014/202044 A1, происходит от образца *Beta maritima* WB42 и, как известно, обеспечивает устойчивость к ризомании при экспрессии в некоторых сортах сахарной свеклы. Кроме того, известна идентификация Rz3 из образца WB41 *Beta maritima*, который, крайне вероятно, является тем же или очень похожим аллельным вариантом Rz2. Таким образом, гены Rz2 и Rz3 и соответствующие белки, по существу, идентичны, и обозначения «Rz2» и «Rz3» могут применяться взаимозаменяемо.

«Реморины» представляют собой семейство растение-специфичных белков, содержащих вариабельную N-концевую область и консервативный C-концевой домен и играющих роль в различных биотических и абиотических стрессах, включая взаимодействия хозяина и микроба. В настоящем изобретении существует различие между геном реморина, кодирующим функциональный белок реморина, т. е. белком реморина, участвующим в установлении Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV в растении, в котором этот белок экспрессируется, и геном реморина, кодирующим нефункциональный белок реморина, т. е. белок реморина, препятствующий опосредованной Rz2 устойчивости к BNYVV в растении, в котором этот белок экспрессируется. В этом контексте термин «участвующий» включает повышение устойчивости, а также существенное значение для установления устойчивости в отношении BNYVV в растении, дополнительно содержащем ген устойчивости к Rz2, в частности высокий уровень устойчивости к BNYVV. Термин «нефункциональный» применяется в отношении неспособности придавать устойчивость в сочетании с геном Rz2.

Соответственно, термины «функциональная форма», «функциональный белок (реморина)», «функциональный полипептид (реморина)», «функциональный вариант (реморина)», «функциональный аллель (реморина)», «функциональный ген (реморина)» и

«функциональная молекула нуклеиновой кислоты» по настоящему изобретению применяются взаимозаменяемо в настоящем изобретении, так же как и термины «нефункциональная форма», «нефункциональный белок (реморина)», «нефункциональный полипептид (реморина)», «нефункциональный вариант (реморина)», «нефункциональный аллель (реморина)», «нефункциональный ген (реморина)» и «нефункциональная молекула нуклеиновой кислоты» по настоящему изобретению.

«Трансгенное растение» относится к растению, в геном которого интегрирован по меньшей мере один полинуклеотид. Таким образом, это может быть гетерологичный полинуклеотид. Полинуклеотид предпочтительно является стабильно интегрированным, что означает, что интегрированный полинуклеотид стабильно сохраняется в растении, экспрессируется, а также может стабильно передаваться потомкам. Стабильное введение полинуклеотида в геном растения также включает интеграцию в геном растения предыдущего родительского поколения, при этом полинуклеотид может стабильно передаваться дальше. Термин «гетерологический» означает, что введенный полинуклеотид происходит из клетки или организма с другим генетическим фоном, того же или другого вида, или гомологичен прокариотической или эукариотической клетке-хозяину, например, но затем помещается в другое генетическое окружение и, таким образом, отличается от соответствующего полинуклеотида, который, возможно, присутствует в природе. Гетерологический полинуклеотид может присутствовать в дополнение к соответствующему эндогенному гену.

«Сырье для промышленного производства сахара» означает растительный материал, который можно применять на объекте для производства сахара, специализирующемся на экстракции сахара из сахарной свеклы. Таким сырьем, как правило, является тело свеклы (стержневой корень) собранного урожая сахарной свеклы. Для обеспечения соответствия процессу экстракции тело свеклы должно иметь достаточную массу, объем и коническую форму для того, чтобы сырье можно было механически разрезать на куски (свекловичная стружка). Эта свекловичная стружка увеличивает площадь поверхности для экстракции сахара и должна иметь низкое содержание натрия, калия и азота для обеспечения эффективной экстракции. После экстракции оставшийся свекольный жом прессуют, сушат и применяют в качестве корма для животных.

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

«Моногерм» означает, что семя вырастает ровно в одно растение, в то время как многоплодное или мультиплодное семя (также называемое «сросток») вырастает в несколько растений.

«Стрелкование» — это получение цветущего стебля (или стеблей) сахарной свеклы в естественной попытке произвести семена и размножиться. Стрелкование сахарной свеклы обуславливается яровизацией, т. е. стрессом от охлаждения, который может возникнуть, напр., во время перезимовки. Тем не менее выращиваемая в промышленных масштабах сахарная свекла собирается перед стрелкованием, так как процесс стрелкования и последующая завязка семян снижают содержание сахарозы в теле свеклы.

«Конкурентная аллель-специфическая ПЦР», или «KASP», означает гомогенный вариант генотипирования полимеразной цепной реакции на основе флуоресценции. Она основана на аллель-специфическом удлинении олигонуклеотидов и резонансном переносе энергии флуоресценции для формирования сигнала. Эту химическую реакцию можно применять для обнаружения конкретных последовательностей нуклеиновых кислот в геномной ДНК. Как правило, для ПЦР применяют праймер с флуоресцентной меткой. В качестве флуоресцентных меток могут применяться FAM и HEX.

Конструкции и варианты осуществления настоящего изобретения описаны в качестве примера со ссылкой на ожидаемые последовательности и фигуры.

Фиг. 1: Модель, изображающая возможный способ взаимодействия между белком TGB1 *вируса некротической желтой прожилки свеклы* (BNYVV), рецепторным белком Rz2 NBS-LRR и (A) функциональным вариантом белка реморина или (B) нефункциональным вариантом белка реморина. В варианте (A) белок TGB1 связывается с функциональным белком реморина и модифицирует его, что можно обнаружить рецепторным белком Rz2 NBS-LRR аллеля устойчивости, и, таким образом, инициируется реакция устойчивости. В варианте (B) рецепторный белок Rz2 NBS-LRR не может обнаружить нефункциональный белок реморина, модифицированный TGB1, и, таким образом, реакция устойчивости не инициируется.

Фиг. 2: Выравнивание последовательностей между кодирующей ДНК (кДНК) последовательностью гена реморина, кодирующего нефункциональный белок реморина, т. е. белок реморина, который препятствует Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV в растении, в котором экспрессируется этот белок (гаплотип 1, Har1-ORF), и последовательностями кДНК 4 гаплотипов гена реморина, кодирующего функциональные белки реморина, т. е. белки реморина, которые участвуют в установлении Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV в растении, в котором экспрессируются эти белки (Har2-ORF, Har3-ORF, Har4-ORF и Har5-ORF). Полиморфизмы выделены серым цветом.

Фиг. 3: Выравнивание белковой последовательности между нефункциональным белком реморина, т. е. белком реморина, препятствующего Rz2-

опосредованной устойчивости к BNYVV в растении, в котором этот белок экспрессируется (Нар1), и 4 функциональными белками реморина, т. е. белками реморина, участвующими в установлении Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV в растении, в котором экспрессируются белки (Нар2, Нар3, Нар4 и Нар5). Полиморфизмы выделены серым цветом.

Фиг. 4: Схематический обзор анализа транзientной экспрессии для сравнения реакции гибели клеток после экспрессии гена TGB1, полученного из BNYVV, в ткани листа сахарной свеклы, содержащей аллель устойчивости Rz2 и дополнительно содержащей либо функциональный аллель реморина (REM (f)), либо нефункциональный аллель реморина (REM (n-f)). Более подробно эксперимент объясняется в примере 2.

Фиг. 5: Схематический обзор анализа транзientной экспрессии для сравнения реакции гибели клеток после экспрессии гена TGB1, полученного из BNYVV, в сочетании либо с нефункциональным аллелем реморина (REM (n-f)), либо с функциональным аллелем реморина (REM (f)), или с контролем пустого вектора в ткани листа сахарной свеклы, содержащим аллель устойчивости Rz2 и функциональный аллель реморина (REM (f)). Более подробно эксперимент объясняется в примере 2.

Фиг. 6: Схематический обзор анализа транзientной экспрессии для сравнения реакции гибели клеток после экспрессии гена TGB1, полученного из BNYVV, и аллеля устойчивости Rz2, в сочетании либо с нефункциональным аллелем реморина (REM (n-f)), либо с функциональным аллелем реморина (REM (f)) в ткани листа сахарной свеклы, которая не содержит ни аллеля устойчивости Rz2, ни функционального аллеля реморина (REM (f)). Более подробно эксперимент объясняется в примере 2.

Фиг. 7: Схематическое изображение хромосомы 3 *Beta vulgaris*, отображающее положения гена реморина и гена Rz2, а также положения различных маркеров. Реморин расположен примерно на 0,75 сМ дистальнее гена Rz2 на длинном плече хромосомы 3. **Слева:** положения маркеров дистальнее реморина и проксимальнее Rz2, определяющих фланкирующие области, которые можно применять для маркерной селекции (MAS); **справа:** связывание маркеров в гене реморина, в гене Rz2, а также в области между обоими генами.

Фиг. 8: Визуальная иллюстрация маркерного анализа 2730 растений делящейся популяции в отношении присутствия различных комбинаций аллелей гена устойчивости Rz2 и гена реморина в рекомбинантах, где **A** указывает на присутствие гена реморина, кодирующего нефункциональный белок реморина, а **B** указывает на присутствие гена реморина, кодирующего функциональный белок реморина. **H** обозначает, что генотипы гетерозиготны по нефункциональному аллелю реморина.

Фиг. 9 На рисунке показан лист *Nicotiana benthamiana* после инфильтрации *Agrobacterium tumefaciens*. Белыми обведенными пятнами отмечены инфильтрованные области, каждая из которых была инфильтрована с помощью различных комбинаций векторов. Комбинации векторов подробно объясняются в соответствующем примере.

Фиг. 10 Измерение активности люциферазы в трансформированных листовых дисках сахарной свеклы. Были предоставлены различные конструкции:

1: пустой вектор; 2: Rz2_C48 + пустой вектор; 3: BNYVV_TGB1 + пустой вектор; 4: Rz2_C48 + BNYVV_TGB1; 5: Rz2_C48_D491V (автоактивированный вариант); 6: p70S-165-176_D80N (автоактивированный домен СС, позитивная регуляция)

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для выявления механизма, лежащего в основе наблюдаемого эффекта, заключающегося в том, что у определенных сортов сахарной свеклы Rz2-опосредованная устойчивость к вирусу некротической желтой прожилки свеклы (BNYVV) ослаблена или даже полностью утеряна, несмотря на присутствие аллеля устойчивости Rz2, а также для применения полученных знаний с целью улучшения процессов выращивания были проведены обширные эксперименты по скрещиванию, а также молекулярно-биологические эксперименты, включая тонкое генетическое картирование, идентификацию, выделение и описание гена, кодирующего белок, который, в его функциональной форме, важен или имеет решающее значение для установления Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV в растениях и который, в своей нефункциональной форме, обуславливает подавление указанной устойчивости.

Идентификация обоих аллельных вариантов, т. е. одного, кодирующего функциональный белок, и другого, кодирующего нефункциональный белок, имеет большое значение при селекции устойчивых к BNYVV разновидностей, которые должны обладать устойчивостью Rz2. С одной стороны, важно иметь возможность отделения нефункционального аллеля от аллеля устойчивости Rz2 с целью применения линий сахарной свеклы, демонстрирующих сниженную или утерянную Rz2-опосредованную устойчивость к BNYVV, но в остальном имеющие хорошие селекционные и агрономические свойства, в выращивании устойчивых к BNYVV сортов сахарной свеклы. С другой стороны, особый интерес представляет понимание механизма развития Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV у растений, т. е. идентификация функционального аллеля для эффективного создания устойчивых к BNYVV растений.

Соответственно, настоящее изобретение в целом относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, участвующий в Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV. В этом контексте термин «участвующий» включает повышение устойчивости, а также существенное значение для установления устойчивости к BNYVV, в частности высокого уровня устойчивости к BNYVV. Таким образом, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и кодируемый полипептид, соответственно, модифицируют Rz2-опосредованную устойчивость к BNYVV в растении, в котором экспрессируется полипептид. Предпочтительно, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению увеличивает устойчивость к BNYVV или необходима для установления устойчивости к BNYVV в растении, в котором экспрессируется соответствующий полинуклеотид. Ради простоты данная молекула нуклеиновой кислоты упоминается как «функциональная форма», «функциональный вариант», «функциональный аллель», «функциональный ген» или «функциональная молекула нуклеиновой кислоты» по настоящему изобретению.

Предпочтительно, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению модифицирует Rz2-опосредованную устойчивость к BNYVV у растения, принадлежащего к роду *Beta*, предпочтительно к виду *Beta vulgaris*, более предпочтительно к подвиду *Beta vulgaris subsp. vulgaris*.

Настоящее изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая специфически гибридизуется с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и кодирует нефункциональный аллель полипептида, т. е. нефункциональный вариант, который препятствует устойчивости к BNYVV, опосредованной геном устойчивости Rz2 в растении, в котором экспрессируется полипептид. Ради простоты данная молекула нуклеиновой кислоты упоминается как «нефункциональная форма», «нефункциональный вариант», «нефункциональный аллель», «нефункциональный ген» или «нефункциональная молекула нуклеиновой кислоты» по настоящему изобретению.

В частности, нефункциональная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению способна снижать или подавлять Rz2-опосредованную устойчивость к BNYVV в растении, в котором экспрессируется соответствующий полинуклеотид. Предпочтительно указанное растение принадлежит к роду *Beta*, предпочтительно к виду *Beta vulgaris*, более предпочтительно к подвиду *Beta vulgaris subsp. vulgaris*.

Ген устойчивости Rz2, который был ранее идентифицирован и описан в международной патентной заявке WO 2014/202044 A1, происходит от образца *Beta maritima* WB42 и, как известно, обеспечивает устойчивость к ризомании при экспрессии в некоторых сортах сахарной свеклы. Соответствующая последовательность нуклеиновой

кислоты раскрыта в WO 2014/202044 A1 и включена здесь в качестве ссылки. Был идентифицирован Rz3 из образца *Beta maritima* WB41, который, вероятно, является аллельной версией Rz2. Таким образом, гены Rz2 и Rz3, по существу, идентичны, и целесообразно ожидать, но не ограничиваться теорией, что молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению также участвует в Rz3-опосредованной устойчивости к BNYVV или препятствует ей.

Идентификация и генетическая локализация молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению были выполнены согласно подробному описанию в примере 1. Первоначально основное внимание уделялось идентификации и локализации нефункционального аллеля. Путем генетического картирования было показано, что нефункциональный аллель локализован возле локуса Rz2. Тем не менее в этой области все еще было слишком много генов для точного указания конкретного кандидата. Особой проблемой было тесное генетическое сцепление/соединение нефункционального аллеля с геном устойчивости Rz2. Если бы он был расположен на другой хромосоме или на большем расстоянии от гена Rz2, эффект был бы виден при картировании QTL как отдельный эффект. Таким образом, при применении обычных способов селекции было невозможно объяснить, почему генотипы были подвержены ризомании несмотря на наличие аллеля устойчивости Rz2.

Параллельно с генетическим картированием были проанализированы профили молекулярных маркеров в мультигенном селекционном материале. Маркер *s3e5798s01* (см. таблицу 5) показал самые высокие доказательства позиционирования эффекта репрессора. Анализ эталонной последовательности для этой области показал, что маркер *s3e5798s01* расположен в модели аннотированного гена (g23238.t1). Ген содержит домен реморина (С-концевую область) и экспрессируется в плазмалемме. Реморины, семейство растение-специфичных белков, содержащих вариабельную N-концевую область и консервативный С-концевой домен, играют роль в различных биотических и абиотических стрессах, включая взаимодействия хозяина и микроба. Тем не менее до сих пор их функция полностью не изучена.

В литературе есть указания на то, что реморины могут играть роль в распространении вирусов через плазмодесмы (PD) и, в частности, что они могут действовать в качестве отрицательного регулятора движения вирусов (Раффаэль *и соавт.*, Растительная клетка (2009), 21 (5)), 1541–1555; Пепраки *и соавт.*, FEMS Letters (2014), 588 (9), 1699–1705). Как правило, PD обеспечивают межклеточные соединения, которые обеспечивают симпластический транспорт молекул от 1 до 60 кД. Вирусы могут

перемещаться через PD для достижения локального распространения инфекции и симпластической загрузки во флоэму, чтобы инициировать системную инфекцию.

Более подробно было описано у Раффалея *и соавт.* 2009, о том, что в картофеле реморин препятствует перемещению *X-вируса картофеля* от клетки к клетке и напрямую связывается с транспортным белком вируса TGBp1 (белок Triple Gene Block 1). У не накапливающих реморин растений наблюдалось значительное увеличение скопления вирусов в листьях инфицированных растений, а очаги инфекции были значительно больше, нежели у растений дикого типа. Соответственно, уменьшенное скопление вирусов и меньшие очаги инфекции наблюдались у сверхэкспрессирующих реморин растений. Таким образом, реморин, по-видимому, оказывает антагонистический эффект на распространение вируса. В этом контексте у Перраки *и соавт.*, 2014, было показано, что в картофеле ген реморина ограничивает способность *X-вируса картофеля* TGBp1 увеличивать проницаемость PD.

Кроме того, недавно опубликованная работа Ветцеля и Варрельманна (Международный симпозиум по иммунитету растений — 1-й симпозиум IRTG 2172 PRoTECT, 14 и 15 июня 2018 г., г. Геттинген, Германия) предполагает, что продуцируемый геном Rz2 белок, т. е. рецепторный белок Rz2 NBS-LRR, может взаимодействовать с белком TGBp1 вируса BNYVV, обуславливающего возникновение ризомании. Отсутствующая связь между рецепторным белком Rz2 NBS-LRR и белком TGBp1 BNYVV может быть реморином, идентифицированным по настоящему изобретению. Из этого можно получить возможный способ действия, который показан на фигуре 1А. Таким образом, следует предположить, но не ограничиваться какой-либо одной теорией, что ген реморина по настоящему изобретению выполняет аналогичную или даже такую же функцию у *Beta vulgaris*, как это описано выше, т. е. что он действует в качестве отрицательного регулятора движения BNYVV.

Нефункциональный аллель гена реморина, идентифицированный по настоящему изобретению, по-видимому, является нефункциональным белком. Один из возможных способов действия представлен на фигуре 1В, где рецепторный белок Rz2 NBS-LRR аллеля устойчивости не может обнаруживать модификацию этого аллеля белком TGB1 BNYVV. Следовательно, реакции сопротивления не возникает.

Дальнейшие эксперименты, проведенные по настоящему изобретению, подтвердили эту гипотезу, поскольку первые результаты показали, что комбинация аллеля устойчивости Rz2 с нефункциональным аллелем реморина приводит к тому, что растения

все еще подвержены ризомании, в то время как растения, содержащие аллель устойчивости Rz2 и функциональный аллель реморина, проявляют резистентность; см. пример 2.

Знания, полученные в ходе идентификации и анализа нефункционального аллеля реморина, впоследствии были применены для идентификации функционального аллеля реморина. В частности, был проведен сравнительный анализ геномных последовательностей сорта сахарной свеклы, содержащего нефункциональный аллель реморина и, таким образом, демонстрирующего отсутствие или сниженную устойчивость к BNYVV, несмотря на присутствие гена Rz2 с последовательностями 80 дополнительных генотипов сахарной свеклы, чтобы идентифицировать последовательность функционального гена реморина.

Всего было обнаружено пять различных гаплотипов (аллелей). Гаплотип нефункционального гена реморина (гаплотип 1) можно отличить от других четырех гаплотипов, т. е. функциональных генов реморина, по трем маркерам KASP (*s3p4348s01* (SEQ ID №: 27; нефункциональный аллель: G), *s3p4349s01* (SEQ ID №: 28; нефункциональный аллель: T), *s3p4351s01* (SEQ ID №: 29; нефункциональный аллель: T); см. таблицу 5. Кодирующая последовательность, т. е. открытая рамка считывания (ORF) нефункционального аллеля, указанная в SEQ ID №: 3, имеет пять малых нуклеотидных полиморфизмов (SNP), которые отличают гаплотип (Hap1) от других четырех гаплотипов (Hap2-5; SEQ ID №: 7, 11, 15 и 19) (фигура 2). Соответственно, кодирующая последовательность (CDS) Hap1 имеет A вместо G в позиции 72, G вместо C в позиции 73, A вместо G в позиции 111, A вместо C в позиции 214 и A вместо G в позиции 556; см. таблицу 1. Последовательность белка нефункционального аллеля, представленная в SEQ ID №: 4, однозначно отличается по трем аминокислотам от других четырех гаплотипов (SEQ ID №: 8, 12, 16 и 20); см. таблицу 2. Как показано на фигуре 3, транслируемый нефункциональный полипептид, кодируемый нефункциональным геном реморина, имеет Ala вместо Pro в положении 25, Thr вместо Pro в положении 72 и Ile вместо Val в положении 186; см. также таблицу 2.

Таблица 1: Идентифицированные SNP в кодирующих последовательностях (ORF) нефункционального аллеля реморина (= гаплотип 1, Hap1) по сравнению с ORF других четырех гаплотипов, т. е. функциональных аллелей реморина. Отмеченные * позиции обуславливают замены аминокислот, что может быть причиной нефункциональности реморина.

Положение нуклеотида CDS	Hap1 (SEQ ID №: 3)	Hap2 (SEQ ID №: 7)	Hap3 (SEQ ID №: 11)	Hap4 (SEQ ID №: 15)	Hap5 (SEQ ID №: 19)
72	A	G	G	G	G
73*	G	C	C	C	C
111	A	G	G	G	G
214*	A	C	C	C	C
556*	A	G	G	G	G

Таблица 2: Идентифицированные аминокислотные замены в предсказанной последовательности полипептида нефункционального аллеля реморина (= гаплотип 1) по сравнению с предсказанной последовательностью полипептида других четырех гаплотипов, т. е. функциональных аллелей реморина.

положение аминокислоты	Hap1 (SEQ ID №: 4)	Hap2 (SEQ ID №: 8)	Hap3 (SEQ ID №: 12)	Hap4 (SEQ ID №: 16)	Hap5 (SEQ ID №: 20)
25	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro
72	Thr	Pro	Pro	Pro	Pro
186	Ile	Val	Val	Val	Val

Для простоты была создана консенсусная последовательность, объединяющая последовательности кДНК гаплотипов 2–5 (SEQ ID № 44) и другая последовательность, объединяющая аминокислотные последовательности гаплотипов 2–5 (SEQ ID № 45).

Соответственно, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, который участвует в Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV, при этом аминокислотная последовательность кодируемого полипептида содержит пролин (P) в положении 25 в отношении SEQ ID № 45, пролин (P) в положении 72 в отношении SEQ ID № 45 или валин (V) в положении 186 в отношении SEQ ID № 45. Конечно, аминокислотная последовательность кодируемого полипептида может содержать две из упомянутых аминокислот в указанных положениях, т. е. пролин (P) в положении 25 и пролин (P) в положении 72 в отношении SEQ ID No. 45; пролин (P) в положении 25 и валин (V) в

положении 186 в отношении SEQ ID № 45; или пролин (P) в положении 72 и валин (V) в положении 186 в отношении SEQ ID № 45; а также три из упомянутых аминокислот в указанных положениях, т. е. пролин (P) в положении 25, пролин (P) в положении 72 и валин (V) в положении 186 в отношении SEQ ID № 45.

Что касается кодирующей последовательности ДНК указанной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность ДНК имеет цитозин (с) в положении 73 в отношении SEQ ID № 44, цитозин (с) в положении 214 в отношении SEQ ID № 44, или гуанин (g) в положении 556 в отношении SEQ ID № 44. Конечно, кодирующая последовательность ДНК может иметь две из упомянутых аминокислот в указанных положениях, т. е. цитозин (с) в положении 73 и цитозин (с) в положении 214 в отношении SEQ ID № 44; цитозин (с) в положении 73 и гуанин (g) в положении 556 в отношении SEQ ID № 44; или цитозин (с) в положении 214 и гуанин (g) в положении 556 в отношении SEQ ID № 44; а также три из упомянутых аминокислот в указанных положениях, т. е. цитозин (с) в положении 73, цитозин (с) в положении 214 и гуанин (g) в положении 556 в отношении SEQ ID № 44.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, участвующий в Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV, при этом полипептид имеет аминокислотную последовательность SEQ ID № 8, 12, 16 или 20, или нуклеотидная последовательность, кодирующая указанный полипептид, представляет собой SEQ ID № 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18 или 19, или кодирующая последовательность ДНК представляет собой нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID № 7, 11, 15 или 19.

Кроме того, в нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению могут быть внесены замены, делеции, вставки, добавления и/или любые другие изменения, которые, по отдельности или в комбинациях, действительно изменяют нуклеотидную последовательность, при этом модифицированная нуклеотидная последовательность может тем не менее выполнять ту же функцию, что и исходная последовательность. В данном случае речь идет о кодировании аминокислотной последовательности, участвующей в устойчивости к BNYVV, опосредованной геном устойчивости Rz2.

Таким образом, в следующем варианте осуществления, настоящее изобретение включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который представляет собой производное полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью по настоящему изобретению, или который включает аминокислотную последовательность по настоящему изобретению. Производная аминокислотная последовательность, которая имеет по меньшей мере одну замену,

делецию, вставку или добавление одной или нескольких аминокислот, при этом функциональность кодируемого полипептида/белка сохраняется, представляет собой производное полипептида. Замены, делеции, вставки, добавления и/или любые другие изменения, по отдельности либо в комбинациях, которые действительно изменяют нуклеотидную последовательность, но выполняют ту же функцию, что и исходная последовательность, могут быть, таким образом, введены в нуклеотидную последовательность с применением обычных способов, которые известны на предшествующем уровне техники, напр. посредством сайт-направленного мутагенеза, ПЦР-опосредованного мутагенеза, транспозонного мутагенеза, редактирования генома и т. д.

Замена одной аминокислоты на другую, имеющую такие же или эквивалентные либо подобные химические/физические свойства, называется «консервативной заменой» или «полуконсервативной заменой». Примерами физических/химических свойств аминокислоты являются гидрофобность или заряд. То, какая аминокислотная замена представляет собой консервативную или полуконсервативную замену, известно специалисту в данной области техники. Кроме того, общий опыт позволяет специалисту в данной области техники распознавать, идентифицировать и определять то, какие делеции и добавления аминокислот безвредны для функциональности белка устойчивости и в каких положениях они возможны. Специалисту в данной области техники известно, что в случае настоящего функционального белка реморина для модификаций аминокислотной последовательности (замены, делеции, вставки или добавления одной или нескольких аминокислот), функциональность, в частности консервативные домены, напр. домен реморина, должна быть сохранена, поэтому в этих доменах возможны только ограниченные предыдущие модификации.

Таким образом, настоящее изобретение включает функциональный фрагмент нуклеотидной последовательности по данному изобретению. Термин «фрагмент», таким образом, включает гены с нуклеотидной последовательностью, достаточно похожей с вышеупомянутой нуклеотидной последовательностью. Термин «достаточно похожий» означает, что первая нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность имеет достаточное или минимальное количество идентичных или эквивалентных нуклеотидов либо аминокислотных групп относительно второй нуклеотидной последовательности или второй аминокислотной последовательности.

Что касается аминокислотной последовательности, то после модификации с помощью вышеупомянутого способа она также имеет общий структурный домен и/или

обладает общей функциональной активностью. Нуклеотидные или аминокислотные последовательности, имеющие идентичность по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или по меньшей мере приблизительно 100% с нуклеотидной последовательностью или аминокислотной последовательностью по данному изобретению определены здесь как достаточно похожие. Это также в явной форме охватывает диапазон от 90 до 100%. Для функциональных фрагментов достаточное сходство устанавливается, если нуклеотидная или аминокислотная последовательность, как правило, имеет то же свойство, что и вышеупомянутая нуклеотидная или аминокислотная последовательность по настоящему изобретению. Те нуклеотидные последовательности, которые кодируют производное или производную аминокислотную последовательность, генерируются либо непосредственно, либо косвенно (например, посредством этапов амплификации или репликации) из исходной нуклеотидной последовательности, которая соответствует нуклеотидной последовательности в соответствии с настоящим изобретением по всей длине или хотя бы частично.

Соответственно, настоящее изобретение включает нуклеотидную последовательность, способную гибридизоваться в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности в соответствии с настоящим изобретением, или нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая специфически гибридизуется с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и кодирует нефункциональный аллель полипептида, т. е. нефункциональный вариант реморина, который препятствует устойчивости к BNYVV, опосредованной геном устойчивости Rz2 в растении, в котором экспрессируется полипептид. Ради простоты данная молекула нуклеиновой кислоты упоминается как «нефункциональная форма», «нефункциональный вариант», «нефункциональный аллель» или «нефункциональный ген» либо «нефункциональная молекула нуклеиновой кислоты» по настоящему изобретению.

Как показано в примере 2, в частности в анализе 2, аллель нефункционального полипептида (реморина), по-видимому, доминирует над функциональным аллелем полипептида. Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения нефункциональный полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по п. [3], доминирует над функциональным аллелем полипептида, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты по п. [1] или [2]. «Доминирует» означает, что в гетерозиготном состоянии растения, напр. в растении, содержащем нефункциональный аллель и функциональный аллель полипептида, нефункциональный аллель подавляет или предотвращает развитие устойчивости, и в результате растение является восприимчивым к заражению BNYVV и распространению вируса внутри растения соответственно.

В частности, нефункциональная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению способна снижать или подавлять Rz2-опосредованную устойчивость к BNYVV в растении, в котором экспрессируется соответствующий полинуклеотид. Предпочтительно указанное растение принадлежит к роду *Beta*, предпочтительно к виду *Beta vulgaris*, более предпочтительно к подвиду *Beta vulgaris subsp. vulgaris*.

Кодирующая нуклеотид и аминокислоту указанного нефункционального аллеля последовательность характеризуется полиморфизмом, который отличает ее от функционального аллеля, т. е. молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, модифицирующей Rz2-опосредованную устойчивость к BNYVV в растении, в котором экспрессируется полипептид. В принципе последовательность нефункционального гена по настоящему изобретению и соответствующего полипептида соответственно основана на последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, как это описано выше, но включает одну или несколько мутаций, как это уже было определено выше, что обуславливает возникновение нефункционального варианта. Конечно, существует множество возможностей для мутаций, ведущих к возникновению нефункционального варианта, и специалист в данной области техники, конечно, знает, как ввести единичные мутации, а также как проверить, действительно ли сгенерированный ген и полипептид, соответственно, неактивны. Подробности, касающиеся подходящих способов, описаны в другом месте данного документа.

В предпочтительном варианте осуществления нефункциональная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID № 4, или полипептид, который является по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере

приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичным SEQ ID № 4, при этом полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну аминокислотную замену из-за одной или нескольких мутаций в нуклеотидной последовательности, при этом предпочтительно пролин (P) в положении 25 в отношении SEQ ID № 45, пролин (P) в положении 72 в отношении SEQ ID № 45 и/или валин (V) в положении 186 в отношении SEQ ID № 45 заменен другой аминокислотой. Конечно, аминокислотная последовательность может иметь одну, две или три аминокислотные замены в указанных положениях. Таким образом, в одном из вариантов осуществления пролин (P) в положении 25, пролин (P) в положении 72 или валин (V) в положении 186 в отношении SEQ ID № 45 заменен другой аминокислотой. В другом варианте осуществления пролин (P) в положении 25 и пролин (P) в положении 72 в отношении SEQ ID № 45 заменены другой аминокислотой; или пролин (P) в положении 25 и валин (V) в положении 186 в отношении SEQ ID № 45 заменены другой аминокислотой; или пролин (P) в положении 72 и валин (V) в положении 186 в отношении SEQ ID № 45 заменены другой аминокислотой. Как альтернатива, пролин (P) в положении 25, пролин (P) в положении 72 и валин (V) в положении 186 в отношении SEQ ID № 45 заменены другой аминокислотой.

В предпочтительном варианте осуществления нефункциональный полипептид реморина по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, содержащую аланин (A) вместо пролина (P) в положении 25 в отношении SEQ ID № 45, треонин (T) вместо пролина (P) в положении 72 в отношении SEQ ID № 45 и/или изолейцин (I) вместо валина (V) в положении 186 в отношении SEQ ID № 45. Конечно, аминокислотная последовательность может иметь одну, две или все три аминокислотные замены в указанных положениях, как это объяснено выше.

Что касается кодирующей последовательности ДНК, в предпочтительном варианте осуществления нефункциональный ген реморина по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность, содержащую кодирующую последовательность ДНК согласно SEQ ID № 3, которая включает кодирующую последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности ДНК согласно SEQ ID № 3, или которая гибридизуется с комплементарной последовательностью SEQ ID № 3 в жестких условиях, при этом нуклеотидная последовательность включает по меньшей мере одну

замену нуклеиновой кислоты из-за по меньшей мере одной мутации, обуславливающей замену аминокислоты, предпочтительно при этом один или несколько нуклеотидов заменены в положениях 73–75 в отношении SEQ ID № 44, в положениях 214–216 в отношении SEQ ID № 44 и/или в положениях 556–558 в отношении SEQ ID № 44. Конечно, кодирующая последовательность ДНК может содержать замененные нуклеотиды в одном, двух или всех трех указанных положениях. Таким образом, в одном варианте осуществления один или несколько нуклеотидов заменены в положениях 73–75, в положениях 214–216 или в положениях 556–558 в отношении SEQ ID № 44. В другом варианте осуществления один или несколько нуклеотидов заменены в положениях 73–75 и 214–216 в отношении SEQ ID № 44; или один или несколько нуклеотидов заменены в положениях 73–75 и 556–558 в отношении SEQ ID № 44; или один или несколько нуклеотидов заменены в положениях 214–216 и в положениях 556–558 в отношении SEQ ID № 44. Как альтернатива, один или несколько нуклеотидов заменены в положениях 73–75, в положениях 214–216 и в положениях 556–558 в отношении SEQ ID № 44.

В предпочтительном варианте осуществления кодирующая последовательность ДНК содержит гуанин (g) вместо цитозина (c) в положении 73 в отношении SEQ ID № 44, аденин (a) вместо цитозина (c) в положении 214 в отношении SEQ ID № 44 и/или аденин (a) вместо гуанина (g) в положении 556 в отношении SEQ ID № 44. Конечно, как упомянуто выше, кодирующая последовательность ДНК может содержать замененные нуклеотиды в одном, двух или всех трех указанных положениях.

Необязательно, кодирующая последовательность ДНК дополнительно содержит аденин (a) вместо гуанина (g) в положении 72 в отношении SEQ ID № 44 и/или аденин (a) вместо гуанина (g) в положении 111 в отношении SEQ ID № 44.

Тем не менее, как это описано выше в отношении функционального аллеля реморина, специалист в данной области техники, конечно, знает, что могут быть внесены дальнейшие замены, делеции, вставки, добавления и/или любые другие изменения, которые, по отдельности или в комбинации, действительно фактически изменяют нуклеотидную последовательность, но выполняют ту же функцию, что и исходная последовательность — здесь нуклеотидная последовательность, кодирующая нефункциональный вариант гена реморина.

Молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением, включая молекулу нуклеиновой кислоты, участвующую в придании устойчивости к патогену BNYVV и соответствующего нефункционального варианта, препятствующего указанной устойчивости, может быть изолированной молекулой нуклеиновой кислоты. Предпочтительно это ДНК и особенно предпочтительно — кДНК (кодирующая ДНК).

Функциональный белок реморина участвует в придании устойчивости к патогену BNYVV, который обуславливает возникновение болезни ризомании у растений, более предпочтительно он модифицирует Rz2-опосредованную устойчивость к BNYVV у растения, в котором экспрессируется этот белок, т. е. который увеличивает указанную устойчивость к BNYVV или необходим для установления указанной устойчивости. Нефункциональный белок реморина препятствует указанной устойчивости. Кроме того, полипептид участвует в придании устойчивости к этому патогену и препятствует, соответственно, указанной устойчивости, в частности у растений рода *Beta*. Растение предпочтительно представляет собой растение вида *Beta vulgaris*, особенно предпочтительно растение подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*; среди которого, например, сорта сахарной свеклы, свеклы, кормовой свеклы, мангольда и мангольда листового.

Если не указано иное, если речь идет о молекуле нуклеиновой кислоты или полипептиде по настоящему изобретению, то включены молекула нуклеиновой кислоты и полипептид, соответственно, которые участвуют в Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV, т. е. функции гена реморина и функционального полипептида/белка реморина, а также молекула нуклеиновой кислоты и полипептид, соответственно, который препятствует Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV, т. е. нефункциональный ген реморина и нефункциональный полипептид/белок реморина.

Ген, модифицирующий Rz2-опосредованную устойчивость или кодирующий полипептид, способный модифицировать Rz2-опосредованную устойчивость, не известен из предшествующего уровня техники. Как уже было описано выше, в сортах, ранее доступных на рынке, было замечено, что определенные генетические фоны обуславливали ослабление или потерю устойчивости к BNYVV, несмотря на наличие устойчивого аллеля Rz2 в соответствующих растениях. После идентификации ответственного за этот эффект гена, т. е. нефункционального варианта гена реморина, который позволяет генерировать подходящие маркеры, теперь можно диагностировать нефункциональный аллель реморина благодаря его уникальному гаплотипу. Кроме того, точное знание генетического и физического положения гена Rz2 и гена реморина позволяет впервые идентифицировать рекомбинанты между генами и, таким образом, отделить нефункциональный ген реморина от аллеля устойчивости Rz2. В новых скрещиваниях с маркерами, расположенными на реморине и Rz2 или между ними, можно отобрать рекомбинанты, показывающие функциональный аллель партнера по скрещиванию. Кроме того, идентификация функционального аллеля реморина позволяет встраивать этот ген в растения, напр. в высокоурожайные сорта, имеющие ген устойчивости Rz2, но более не устойчивые к BNYVV из-за наличия нефункционального варианта реморина.

Таким образом, посредством включения молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в указанные растения, т. е. функционального гена реморина, необязательно, в сочетании с удалением нефункционального гена реморина, напр. посредством подавления его экспрессии вообще, или путем мутации нефункционального гена реморина с целью установления функционального варианта, теперь можно очень быстро вывести высокопродуктивные сорта с восстановленной устойчивостью к BNYVV. Соответственно, в рамках настоящего изобретения впервые предоставлены растения сахарной свеклы, мангольда, красной свеклы или растение свеклы, растение кормовой свеклы, имеющие устойчивость к BNYVV, опосредованную геном Rz2, и функциональный ген реморина в соответствии с настоящим изобретением, и которые, таким образом, охватываются настоящим изобретением. Поскольку все перечисленные растения представляют собой культивируемые растения, культуры или растения, пригодные для выращивания в сельском хозяйстве и обладающие устойчивостью в соответствии с настоящим изобретением, они являются частью изобретения. В частности, частью изобретения являются культуры, содержащие подземный орган запасаения, применяемый в качестве пищи, сырья или промышленного источника сахара, и обладающие устойчивостью в соответствии с настоящим изобретением, и которые являются дополнительным аспектом настоящего изобретения. Органом запасаения может быть, например, сахаросодержащее тело сахарной свеклы, потребляемое тело свеклы красной или питательное тело свеклы кормовой. Подземный орган запасаения может составлять более 50%, а для сахарной свеклы даже более 70% от общей массы взрослого растения. Кроме того, семена или посевной материал этих растений также являются частью изобретения. Семена или посевной материал можно обрабатывать технически, как это описано ниже.

Кроме того, настоящее изобретение относится к рекомбинантной и/или гетерологичной молекуле ДНК, которая содержит последовательности молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, т. е. молекуле нуклеиновой кислоты, участвующей в Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV, и молекуле нуклеиновой кислоты, которая препятствует указанной устойчивости, соответственно. Эта молекула ДНК, кроме того, предпочтительно имеет регуляторную последовательность. Таким образом, она может быть оперативно связана с этой регуляторной последовательностью или находиться под влиянием этой регуляторной последовательности. Такая регуляторная последовательность предпочтительно представляет собой последовательность промотора и/или другие последовательности элементов контроля транскрипции или трансляции, например, *cis*-элементов. Регуляторная последовательность, контролирующая экспрессию гена, который включает молекулу

нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно представляет собой последовательность, которая способна обеспечивать или модулировать экспрессию в результате патогенной инфекции. Этот промотор предпочтительно способен контролировать экспрессию последовательности ДНК конкретно в корнях растения. Регуляторная последовательность может быть гетерологичной экспрессирующей последовательности. Такой подход имеет преимущество в том, что специалист в данной области техники может лучше регулировать скорость экспрессии экспрессирующей последовательности, ткань, в которой происходит экспрессия, и момент времени, в который происходит экспрессия, в том смысле, что он выбирает ту регуляторную последовательность, которая лучше всего подходит для соответствующего варианта применения. Гетерологичная последовательность ДНК предпочтительно включает нуклеотидную последовательность, кодирующую компонент защиты растений от патогенов (например: гены устойчивости (R-гены) или гены, кодирующие ферменты, участвующие в передаче сигнала, такие как киназы или фосфатазы, и для G-белка, или кодирующие патогенный эффектор (так называемые гены авирулентности (*avr*))). Гетерологичная последовательность ДНК может быть одной из последовательностей ДНК в соответствии с настоящим изобретением. Гетерологичная последовательность ДНК может также дополнительно кодировать дополнительные компоненты защиты растений от патогенов. Следовательно, последовательность гетерологичной ДНК может быть сконструирована так, чтобы полицистронная мРНК создавалась после ее транскрипции.

Настоящее изобретение также относится к полипептиду, который может кодироваться молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением и ее функционально и/или иммунологически активным фрагментом, а также к антителу, которое специфически связывается с полипептидом или его фрагментом. Полипептид особенно предпочтительно имеет аминокислотную последовательность по любой из SEQ ID №: 4, 8, 12, 16 и 20. Рекомбинантное производство белков, полипептидов и фрагментов знакомо специалисту в данной области техники (Сембрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001, или Вингфилд, П. Т., 2008, Производство рекомбинантных белков; текущие протоколы в науке о белках, 52:5.0:5.0.1–5.0.4). Поликлональные или моноклональные антитела к белку, в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены специалистом в данной области техники известными способами (Е. Харлоу *и соавт.*, редактор, Антитела: Лабораторное руководство (1988)). Получение моноклональных антител, а также фрагментов Fab и F(ab')₂, которые также можно применять в способах обнаружения белков, можно осуществлять с помощью различных

традиционных способов (Годинг, Моноклональные антитела: принципы и практика, стр. 98–118, New York: Academic Press (1983)). Затем антитела можно применять для скрининга экспрессионных библиотек кДНК, чтобы идентифицировать идентичные, гомологичные или гетерологичные гены посредством иммунологического скрининга (Сембрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, или Аусубел *и соавт.*, 1994, “Текущие протоколы в молекулярной биологии.” John Wiley & Sons), или может применяться для вестерн-блоттинга.

В частности, настоящее изобретение относится к антителам, которые избирательно обнаруживают полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, участвующий в $Rz2$ -опосредованной устойчивости к BNYVV, т. е. функциональным аллелем реморина, и, по существу, не обнаруживают полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, который препятствует указанной устойчивости, т. е. нефункциональным аллелем реморина. В частности, они обнаруживают в 2 раза меньше, предпочтительно в 5 раз меньше и более предпочтительно в 10 или более раз меньше полипептида, кодируемого, соответственно, нефункциональным аллелем реморина, нежели полипептид, кодируемый функциональным аллелем реморина. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителам, которые избирательно обнаруживают полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, препятствующий $Rz2$ -опосредованной устойчивости к BNYVV, т. е. нефункциональным аллелем реморина, и, по существу, не обнаруживают полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, которая участвует в указанной устойчивости, т. е. функциональным аллелем реморина. В частности, они обнаруживают в 2 раза меньше, предпочтительно в 5 раз меньше и более предпочтительно в 10 или более раз меньше полипептида, кодируемого соответствующим функциональным аллелем реморина, нежели полипептид, кодируемый нефункциональным аллелем реморина.

В предпочтительном варианте осуществления антитело по данному изобретению отличается тем, что оно представляет собой синтетический полипептид, который не встречается в природе.

Кроме того, антитела по данному изобретению могут быть связаны с флуоресцентным красителем для их применения, например, в иммуногистохимическом методе и для окрашивания антител. Флуоресцентный краситель может быть флуорохромом. Антитела по данному изобретению также могут присутствовать в связанном с другими

сигнальными молекулами в виде. Среди них, например, биотин, радиоизотопы, репортерные ферменты, такие как щелочная фосфатаза, или олигонуклеотиды.

Дополнительным предметом изобретения являются векторы или кассеты экспрессии, включающие молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу рекомбинантной ДНК по данному изобретению, возможно, под контролем регуляторных элементов и, в частности, под контролем функциональных регуляторных элементов в растениях, а также как маркеры отрицательного и/или положительного отбора. Таким образом, скелет вектора гетерологичен молекуле нуклеиновой кислоты по данному изобретению, что означает, что такой вектор не встречается в природе и его невозможно изолировать из природной среды. Вектор представляет собой плазмиду, космиду, фаг или вектор экспрессии, трансформирующий вектор, вектор-челнок или клонирующий вектор; он может быть двухцепочечным или одноцепочечным, линейным или кольцевым; или он может трансформировать прокариотический или эукариотический организм путем интеграции в его геном либо внехромосомно. Молекула нуклеиновой кислоты или молекула ДНК по данному изобретению в векторе экспрессии или кассете экспрессии предпочтительно функционально связана с одной или несколькими регуляторными последовательностями, обеспечивающими транскрипцию и, необязательно, экспрессию в прокариотической или эукариотической клетке; (Сембрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001). Эти регуляторные последовательности предпочтительно являются промоторами или терминаторами, в частности точкой начала инициации транскрипции, местом связывания рибосомы, сигналом процессинга РНК, местом окончания транскрипции и/или сигналом полиаденилирования. Например, молекула нуклеиновой кислоты здесь находится под контролем приемлемого промотора и/или терминатора. Приемлемые промоторы могут быть конститутивными промоторами (например: промотор 35S из «вируса мозаики цветной капусты» (Оделл *и соавт.*, Nature 313 (1985), 810–812); промоторы, которые индуцируются патогенами, особенно приемлемы (например: промотор PR1 петрушки (Раштон *и др.*, EMBO J. 15 (1996), 5,690–5,700)). Особенно подходящими патогенно-индуцируемыми промоторами являются синтетические или химерные промоторы, которые не встречаются в природе, состоят из множества элементов, содержат минимальный промотор и имеют по меньшей мере один *цис*-регуляторный элемент перед минимальным промотором, в котором по меньшей мере один *цис*-регуляторный элемент служит местом связывания специальных факторов транскрипции. Химерные промоторы конструируются в соответствии с желаемыми требованиями и индуцируются или подавляются различными факторами. Примеры таких промоторов можно найти в WO 00/29592, WO 2007/147395 и WO

2013/091612. Например, подходящим терминатором является терминатор нопалин-синтазы (Депикер *и соавт.*, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 561–573). Подходящие промоторы и терминаторы также могут представлять собой нативный промотор и нативный терминатор. Векторы или кассеты экспрессии дополнительно содержат обычные индикаторные/репортерные гены или гены устойчивости для обнаружения переноса желаемого вектора или молекулы ДНК / молекулы нуклеиновой кислоты, а также для отбора индивидуумов, которые их содержат, поскольку прямое обнаружение через экспрессию гена по большей части довольно затруднительно.

Примерами индикаторных/репортерных генов являются, например, ген люциферазы и ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP). Кроме того, они также позволяют проводить тесты активности и/или регуляции промотора гена. Примерами генов устойчивости, в частности для трансформации растений, являются ген неомизинфосфотрансферазы, ген гигромицинфосфотрансферазы или ген, кодирующий фосфинотрицинацетилтрансферазу. Дополнительные маркеры положительной селекции могут быть ферментами, которые обеспечивают трансформированному растению селекционное преимущество перед нетрансформированным растением, в частности преимущество питательных веществ, например, маннозо-6-фосфат-изомеразу или ксилоизомеразу. Тем не менее это не препятствует появлению дополнительных индикаторных/репортерных генов или генов устойчивости, известных специалисту в данной области техники. В предпочтительном варианте осуществления вектор представляет собой растительный вектор. Кроме того, кассета экспрессии может присутствовать в качестве интегрированной в геном растения.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к клеткам, которые включают векторы, молекулы рекомбинантной ДНК и/или молекулы нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением. Клетка, в смысле изобретения, может быть прокариотической (например, бактериальной) или эукариотической клеткой (например, растительной или дрожжевой клеткой). Клетка предпочтительно представляет собой агробактерию, такую как *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes*, клетку *Escherichia coli* или клетку растения; клетка растения особенно предпочтительно представляет собой клетку растения рода *Beta*, вида *Beta vulgaris* или подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*. Клетка может также присутствовать в виде культуры. Следовательно, изобретение также охватывает культуру клеток, содержащую такие клетки. Культура клеток предпочтительно представляет собой чистую культуру или изолят, не содержащий клеток другого типа.

Специалисту в данной области техники известны многочисленные способы, такие как конъюгация или электропорация, с помощью которых он может ввести молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, молекулу рекомбинантной ДНК и/или вектор или кассету экспрессии в соответствии с настоящим изобретением в агробактерию, а также такие способы, как различные способы трансформации (биолистическая трансформация, опосредованная агробактериями трансформация), с помощью которых он может ввести молекулу нуклеиновой кислоты, в соответствии с настоящим изобретением, молекулу ДНК и/или вектор, в соответствии с настоящим изобретением, в растительную клетку (Сембрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001).

Кроме того, настоящее изобретение относится к растению, предпочтительно к растению вида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* или его части, которое содержит молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, которая участвует в устойчивости к BNYVV, т. е. функциональный ген реморина. Молекула нуклеиновой кислоты, в соответствии с настоящим изобретением, может быть либо введена, либо интрогрессирована в геном растения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, в соответствии с настоящим изобретением, является чужеродной для растения, т. е. она представляет собой гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты.

Таким образом, растение, в соответствии с настоящим изобретением, может содержать молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением в виде трансгена или эндогена или может содержать вектор либо кассету экспрессии в соответствии с настоящим изобретением, которая содержит указанную молекулу нуклеиновой кислоты в качестве трансгена. Кроме того, растение, в соответствии с настоящим изобретением, может содержать клетки, в соответствии с настоящим изобретением, несущие вектор и молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением соответственно. В предпочтительном варианте осуществления растение, в соответствии с настоящим изобретением, является гетерозиготным или предпочтительно гомозиготным по молекуле нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения растение, в соответствии с настоящим изобретением, дополнительно содержит ген устойчивости Rz2, опосредующий устойчивость к BNYVV эндогенно или трансгенно. Соответственно, в рамках настоящего изобретения впервые предоставлено растение сахарной свеклы,

мангольд, красная свекла или растение свеклы, растение кормовой свеклы, имеющее устойчивость к BNYVV, опосредованное геном Rz2, и функциональный ген реморина в соответствии с настоящим изобретением.

Таким образом, часть растения, в соответствии с настоящим изобретением, может быть клеткой, тканью, органом или комбинацией множества клеток, тканей или органов. Комбинация нескольких органов — это, например, цветок или семя. Растение в соответствии с настоящим изобретением, содержащее ген Rz2 и функциональный ген реморина в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно демонстрирует более высокую устойчивость к BNYVV, нежели соответствующее растение, которое содержит ген Rz2, но не содержит молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, т. е. функциональный ген реморина, и/или которое содержит молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, препятствующую Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV, т. е. нефункциональный вариант реморина (контрольные растения). Контрольные растения в идеале имеют тот же генотип, что и трансгенное растение, и культивируются в идентичных условиях, но не содержат молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, участвующую в Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV, и/или содержат молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, которая препятствует Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV.

Растительная клетка или растение или их часть в соответствии с настоящим изобретением, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, в частности растение рода *Beta*, предпочтительно проявляют более высокую устойчивость к патогену, в частности к BNYVV, нежели соответствующая растительная клетка или растение или их часть, которые не содержат молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением или содержат молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, препятствующую Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV.

В случае трансгенной растительной клетки или растения либо их части это включает молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу ДНК в соответствии с настоящим изобретением, т. е. функциональный ген реморина, в качестве трансгена или вектора либо кассеты экспрессии по настоящему изобретению. Такая трансгенная растительная клетка или растение либо их часть представляет собой, например, такую, которая трансформируется, предпочтительно стабильно, с указанной молекулой нуклеиновой кислоты, молекулой ДНК или с соответствующим вектором либо кассетой экспрессии. В

предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с одной или несколькими регуляторными последовательностями, обеспечивающими транскрипцию и, необязательно, экспрессию в растительной клетке. Полная структура, образованная указанной молекулой нуклеиновой кислоты и регуляторной(ыми) последовательностью(ями), затем представляет собой трансген. Такие регуляторные последовательности представляют собой, например, промотор или терминатор. Специалисту в данной области техники известны многочисленные функциональные промоторы и терминаторы, применимые в растениях.

Изобретение также включает вакуоль клетки в соответствии с настоящим изобретением и содержащиеся в ней вещества.

Кроме того, изобретение также относится к клеточному экстракту из клетки, предпочтительно из клетки растения, особенно предпочтительно из клетки *Beta vulgaris* и особенно предпочтительно из клетки одной из следующих культур: сахарной свеклы, мангольда или свеклы. Растение из клеточного экстракта восстановить нельзя.

Подобным образом настоящее изобретение охватывает геном растения, содержащий нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением, т. е. функциональный ген реморина. Растение из генома растения восстановить нельзя. Изобретение также относится к применению клеточного экстракта для производства сахара (сахарозы) или для производства сока, предпочтительно свекольного сока. Таким же образом изобретение охватывает сахар, в частности сахарозу, содержащуюся в клетках в соответствии с настоящим изобретением, и их вакуолях.

Дополнительным аспектом изобретения является посевной материал, содержащий семена, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, т. е. функциональный ген реморина. Указанная молекула нуклеиновой кислоты может присутствовать трансгенно или эндогенно. Посевной материал и семена могут быть подвергнуты технической обработке. Таким образом, изобретение также включает технически обработанный семенной материал и технически обработанные семена. Различные варианты осуществления технически обработанного семенного материала подробно объясняются ниже, при этом термин «семенной материал» также включает семена. Технически обработанный посевной материал может быть в шлифованном виде. Таким образом удаляется внешний слой семени, в результате чего семя принимает более округлую форму. Это удобно при посеве, когда оптимально однородная форма обуславливает равномерное распределение зерен семенного материала. Кроме того, технически обработанный посевной материал включает гранулированный посевной

материал. Посевной материал, таким образом, погружается в гранулирующую массу, которая защищает содержащийся в ней посевной материал и обуславливает формирование большой массы, таким образом гранулированный посевной материал демонстрирует большую устойчивость к ветровому сносу и, таким образом, менее подвержен уносу ветром, в то же время обеспечивается более точное размещение во время посева. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения все гранулированные зерна семенного материала партии или единицы, предназначенные для продажи, имеют, по существу, одинаковую форму и одинаковую массу. Возможны отклонения до 5% по диаметру и массе. Тем не менее отклонения предпочтительно не превышают 1%. В качестве одного из основных компонентов гранулирующая масса может содержать, например, минеральное соединение, такое как, например, глина, бентонит, каолин, гумус и/или торф. Можно добавлять клеящий материал, например, полиакриламид. Дополнительные возможные компоненты указаны в US 4,067,141. Кроме того, гранулирующая масса может содержать дополнительные химические вещества, которые на практике положительно влияют на культивирование. Это могут быть вещества, которые относятся к удобрениям. К ним относятся соединения, насыщенные одним или несколькими из следующих элементов: азот, фосфор и калий (макроэлементы). Следовательно, удобрения могут содержать, например, нитратный азот, аммонийный азот, нитрат магния, кальций-аммиачную селитру, монофосфат аммония, монофосфат калия и нитрат калия. Кроме того, гранулирующая масса может содержать фунгициды, инсектициды и/или антифиданты. Фунгициды могут представлять собой тирам и/или гимексазол и/или другие фунгициды. Инсектицид может быть веществом из группы неоникотиноидов. Вещество из группы неоникотиноидов предпочтительно представляет собой имидаклоприд (код АТС: QP53AX17) и/или клотианидин (№ CAS 210880-92-5). Кроме того, инсектицидом также могут быть цифлутрин (№ CAS 68359-37-5), бета-цифлутрин или тефлутрин. Следует отметить, что соединения, входящие в массу для протравливания или гранулирования, поглощаются растением и проявляют системное действие, обеспечивая тем самым подходящую защиту всего растения. Таким образом, растения, полученные из гранулированных семян, содержащих один или несколько пестицидов, отличаются от растений, встречающихся в природе, и демонстрируют лучшие характеристики в условиях биотического стресса. В этом контексте изобретение также включает смесь гранулируемой массы и посевного материала по настоящему изобретению. Кроме того, изобретение также включает способ производства гранулированных семян по настоящему изобретению, включающий следующие стадии:

- а) получение семян сахарной свеклы, содержащих нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, т. е. функциональный ген реморина,
- б) заделку семян сахарной свеклы в гранулируемую массу и
- с) обеспечение высыхания гранулируемой массы, при этом семена могут быть, необязательно, высеянными или предварительно проросшими семенами, или же семена могут быть примированны на этапе б).

Гранулированный посевной материал представляет собой конкретный вариант осуществления протравленного посевного материала. В этом контексте технически обработанный семенной материал также включает протравленный семенной материал. Тем не менее изобретение не ограничивается гранулированным семенным материалом, а, скорее, может применяться с любой формой протравленного семенного материала. Таким образом, изобретение также относится к протравленному посевному материалу, который включает гранулированный посевной материал, но не ограничивается этим. Таким образом, также охватывается сухая, влажная и суспензионная протравка. Таким образом, протравка также может содержать по меньшей мере один краситель, так что протравленный семенной материал можно быстро отличить от необработанного семенного материала, и, кроме того, после посева обеспечивается хорошая его видимость в окружающей среде. Протравка также может содержать агрохимикаты, которые описаны в контексте гранулируемой массы. Таким образом, изобретение включает такой протравленный семенной материал, при этом протравка содержит по меньшей мере один антифидант, такой как инсектицид и/или по меньшей мере один фунгицид. Необязательно, может применяться так называемая электронная протравка (протравка с применением электрической энергии). Тем не менее электронная протравка не является протравкой в прямом смысле этого слова.

Дополнительной формой технически обработанного посевного материала является инкрустированный посевной материал. В этом контексте принято говорить о том, что семенной материал имеет обработанное покрытие. Отличие от гранулированного посевного материала заключается в том, что семенные зерна сохраняют свою первоначальную форму, при этом данный способ особенно экономичен. Способ описан, например, в EP 0 334 258 A1. Дополнительная форма технически обработанного посевного материала представляет собой проросший или примированный посевной материал. Пророщенный семенной материал предварительно обрабатывают посредством предварительного проращивания, тогда как примированный семенной материал предварительно обрабатывают посредством примирования («прорастаная»). Предварительно проросшие и примированные семена имеют преимущество более быстрого

прорастания. Момент появления всходов после посева при этом более синхронизирован. Это обеспечивает лучшую агротехническую обработку во время выращивания и, в частности, во время сбора урожая, а также увеличивает урожайность. При предварительном проращивании семенной материал проращивается до тех пор, пока корешок не выйдет из оболочки семенного материала, после чего процесс останавливается. При примировании процесс останавливается до того, как корешок выйдет из оболочки семенного материала. По сравнению с предварительно проросшими семенами, семенной материал, который был подвергнут примированию, нечувствителен к стрессу от повторного высыхания и после такой повторной сушки имеет более длительный срок хранения по сравнению с предварительно проросшими семенами, для которых повторная сушка, как правило, не рекомендуется. В этом контексте технически предварительно обработанный семенной материал также включает примированный и повторно высушенный семенной материал. Процесс предварительного проращивания объяснен в патенте US 4,905,411 A. Различные варианты осуществления примирования описаны в EP 0 686 340 A1. В дополнение к этому также возможны одновременные высевание и примирование посевного материала в одном процессе. Этот способ описан в EP 2 002 702 B1. Настоящее изобретение охватывает примированный посевной материал, который, кроме того, гранулируется.

Технически обработанный семенной материал может дополнительно иметь один или несколько из описанных выше гербицидов. Это позволяет дополнительно улучшить агротехническое культивирование, поскольку технически обработанный семенной материал можно применять на поле, которое ранее было обработано средством для уничтожения сорняков и, следовательно, свободном от сорняков.

В дополнение к этому изобретение также включает смесь, содержащую посевной материал по настоящему изобретению или семена по настоящему изобретению и протравочную массу, как это определено выше. Таким образом, протравочная масса предпочтительно воплощается в виде гранулирующей массы, как это определено выше.

При хранении семенного материала по настоящему изобретению предпочтительно выбирать условия хранения, не имеющие отрицательного влияния на устойчивость или срок хранения семенного материала. Здесь могут особенно неблагоприятно сказаться колебания влажности. Частью изобретения является способ хранения семенного материала в мешке или контейнере, который одновременно является водоотталкивающим и воздухопроницаемым. Такой мешок или контейнер может быть выполнен в виде картонной коробки или упаковки. Такие картонная коробка или упаковка могут, необязательно, иметь внутренний пароизоляционный слой. Если картонная коробка или упаковка разработаны в виде двусторонней картонной упаковки, их устойчивость повышается. Контейнер, мешок,

картонная коробка или упаковка, содержащие семенной материал по настоящему изобретению или технически обработанный семенной материал по настоящему изобретению, также являются частью изобретения. Подобным образом частью изобретения является хранение семенного материала по настоящему изобретению или технически обработанного семенного материала по настоящему изобретению в таком мешке, контейнере, упаковке или картонной коробке.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения растение по настоящему изобретению представляет собой гибридное растение или двойное гаплоидное растение. Гибридные растения и растения с двойным гаплоидом не встречаются в природе, и их невозможно изолировать из природной среды. В другом варианте осуществления растения по настоящему изобретению молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, участвующая в Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV, присутствует в гетерозиготной или, более предпочтительно, в гомозиготной форме. Изобретение также включает гибридные семена и двойные гаплоидные семена, содержащие указанную молекулу нуклеиновой кислоты или соответствующий полипептид.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения включает растение предпочтительно вида *Beta vulgaris*, которое отличается тем, что устойчивость к BNYVV у этого растения дополнительно повышена. Например, это может быть реализовано посредством «пирамидирования генов», т. е. с помощью этого дозового эффекта повышается устойчивость. Для этого растения по настоящему изобретению, которые содержат ген Rz2, придающий устойчивость к BNYVV, и молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, участвующую в Rz2-опосредованной устойчивости, подвергаются избыточной трансформации, по меньшей мере последней из них или альтернативной обоим упомянутым генам, для увеличения количества транскрипции гена(ов) в растении. Дополнительные возможности для придания, восстановления или повышения устойчивости к BNYVV у растения вида *Beta vulgaris*, содержащего ген устойчивости Rz2, описаны ниже.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к растению сахарной свеклы или его части либо гранулированным семенам такого растения, которые собирают перед стрелкованием, так как в течение первых 10, 11, 12, 13, 14 или 15 месяцев после прорастания растения сахарной свеклы не формируют стрелок, и развитие тела свеклы в этот период заканчивается.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения растение сахарной свеклы или его часть либо гранулированные семена такого растения имеют геном,

позволяющий развиваться телу свеклы, имеющему в сумме массу по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80% или даже 90% от общей массы взрослого растения.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения растение сахарной свеклы или его часть либо гранулированные семена такого растения имеют геном, позволяющий развиваться телу свеклы, имеющему минимальную массу 200 г, 250 г, 300 г, 350 г, 400 г, 450 г или 500 г и максимальную массу 1000 г, 1100 г, 1200 г, 1300 г, 1400 г, 1500 г, 1600 г, 1700 г, 1800 г, 1900 г или даже 2000 г посредством фотосинтеза.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения направлен на растение сахарной свеклы или его часть либо гранулированные семена такого растения, в которых геном растения сахарной свеклы позволяет развиваться телу свеклы, имеющему концентрацию сахарозы не менее 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или даже 20%.

Настоящее изобретение также включает способ придания, восстановления или повышения устойчивости к BNYVV у растения вида *Beta vulgaris*, содержащего ген устойчивости Rz2, эндогенно или трансгенно опосредующий устойчивость к BNYVV. Возможные способы создания, восстановления или увеличения указанной устойчивости перечислены ниже, но не ограничиваются ими.

Придание, повышение и/или восстановление устойчивости к BNYVV может происходить путем интеграции молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функционального гена реморина, в геном по меньшей мере одной клетки растения вида *Beta vulgaris*, а также возможная регенерация растения из растительной клетки. Интеграция может происходить как посредством полового скрещивания, напр. скрещивания растения из рода *Beta*, содержащего ген устойчивости Rz2, эндогенно или трансгенно, опосредующего устойчивость к BNYVV, с растением, содержащим функциональный ген реморина по настоящему изобретению, необязательно, в комбинации с геном устойчивости Rz2, и последующим отбором, а также посредством гомологически направленной репарации или гомологичной рекомбинации. Два последних упомянутых способа предпочтительно поддерживаются сайт-направленными нуклеазами, которые могут быть выбраны из следующих, но не ограничиваются ими: нуклеаза CRISPR, включая нуклеазу Cas9, CasX, CasY или Cpf1, нуклеазу TALE, цинк-пальцевую нуклеазу, мегануклеазу, нуклеазу-аргонавт, эндонуклеазу рестрикции, включая FokI или ее вариант, рекомбиназу или две сайт-специфические, никующие эндонуклеазы.

Другой способ придания, повышения и/или восстановления устойчивости к BNYVV может иметь место посредством трансформации растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функциональным геном реморина,

соответствующей рекомбинантной молекулой ДНК, или вектором либо кассетой экспрессии по настоящему изобретению и регенерации трансгенного растения из трансформированной растительной клетки.

В общем, активность и/или стабильность полипептида, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая модифицирует Rz2-опосредованную устойчивость к BNYVV, т. е. функциональным геном реморина, а также экспрессия соответствующей молекулы нуклеиновой кислоты могут быть увеличены путем модификации последовательности нуклеиновой кислоты функционального гена реморина и/или его нативного промотора.

Мутации, обуславливающие указанные модификации, могут быть выполнены либо внутри самого организма, либо можно химически модифицировать соответствующие нуклеиновые кислоты в изолированном состоянии для достижения желаемых эффектов. Преимущество последнего подхода в том, что соединения можно редактировать более точно.

Способ получения организма, содержащего мутированную версию молекулы нуклеиновой кислоты согласно приведенному выше варианту [1] или [2] осуществления и/или мутированную версию нативного промотора, включает следующие этапы:

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

(II) увеличение скорости мутации организма или клетки либо мутагенеза организма или клетки;

(III) фенотипический отбор организма, который в результате мутации демонстрирует измененную устойчивость или измененный уровень устойчивости к BNYVV либо генотипический отбор организма или клетки, которые содержат мутацию в молекуле нуклеиновой кислоты и/или промоторе, при этом мутация была создана на этапе (II);

и, необязательно,

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

Организмом может быть растение. Предпочтительно растением является *Beta vulgaris*. Тем не менее в качестве бактерий также можно применять одноклеточные организмы. Бактерией может быть *E. coli*. Если организмом является растение, то способ можно применять как *in vivo*, так и *in vitro*. Если организмом является растение и способ применяется *in vitro*, может быть создана культура клеток растения, и в культуре клеток может произойти увеличение скорости мутации или мутагенезации. Увеличение частоты мутаций включает, например, применение мутагенных агентов, таких как, например, 5-

бромуратил или этилметансульфонат (EMS), или применение физических мутагенов, таких как ионизирующее излучение или УФ-свет. Мутагенизация также охватывает направленный мутагенез. Направленный мутагенез может быть достигнут такими точными способами, как редактирование генов (как это описано ниже). Регенерация организма из клеток объясняется в различных справочниках по клеточной биологии. Регенерация растений, например, объясняется в справочнике «Биотехнология растений: комплексная биотехнология, второе приложение» (Майкл В. Фаулер, Грэм Уоррен, Мюррей Му-Янг — Pergamon Press — 1992). Регенерация *Beta vulgaris* из клеточной культуры описана Линдси и Галлуа (1990).

В этих источниках также описано создание культуры клеток растений. Мутированная версия молекулы нуклеиновой кислоты, соответственно, промотора характеризует себя предпочтительно за счет скорости экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функционального гена реморина, который увеличивается в результате мутации. Такой эффект также может зависеть от наличия нескольких мутаций. Например, можно ввести две, три, четыре, пять или более мутаций в промотор или молекулу нуклеиновой кислоты.

Таким образом, путем введения мутаций в клетку может быть встроен белок, придающий большую устойчивость, или белок будет иметь лучший эффект. Таким образом, устойчивость по сравнению с контрольным растением, содержащим неизмененную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функциональный ген реморина, может быть увеличена, например, по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5 или более процентов. Увеличение можно измерить согласно указанному ниже описанию. Более того, обусловленная мутацией или мутациями устойчивость может быть увеличена по меньшей мере на один рейтинговый балл. Определение рейтинговых баллов объясняется в другом месте данного документа. Кроме того, белок, модифицирующий Rz2-опосредованную устойчивость, может оказывать, в результате мутаций, измененный эффект и в некоторых обстоятельствах может проявлять эффект против таких патогенов, которые адаптировались к первоначальному механизму устойчивости. В этом контексте настоящее изобретение также включает такие мутированные варианты нуклеиновых кислот по настоящему изобретению и мутированные варианты белка по настоящему изобретению. Предпочтительно изобретение охватывает такие варианты, которые не встречаются в природе и не могут быть изолированы из природной среды для обеспечения того, что патоген не имеет возможности адаптации к таким вариантам. Вышеописанный способ получения организма, содержащего мутированную версию молекулы нуклеиновой кислоты, может, кроме того, включать дополнительный этап, на котором

идентифицируются те организмы или, соответственно, растения, которые имеют дополнительную повышенную устойчивость, обусловленную мутацией или мутациями. В случае повышения устойчивости это может быть определено с помощью объясненных здесь рейтинговых баллов или измерения уровня устойчивости.

Как уже упоминалось выше, помимо описанного выше способа получения организмов, содержащих мутированную версию молекулы нуклеиновой кислоты или промотора, также возможна химическая модификация соответствующих нуклеиновых кислот в изолированном состоянии для достижения желаемых эффектов. Для этого предлагается следующий способ:

Получение химически модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты согласно приведенному выше варианту осуществления [1] или [2] и/или химически модифицированного промотора включает следующие этапы:

(I) предоставление молекулы нуклеиновой кислоты или промотора, как указано выше, в изолированной форме;

(II) химическая модификация молекулы нуклеиновой кислоты или промотора одним из следующих этапов:

(IIa) мутагенизация,

(IIb) редактирование генов,

(IIc) рестрикция и лигирование, соответственно вставка или удаление.

Кроме того, химические модификации могут быть произведены такими подходами, как указано в другом месте данного документа в контексте аллельных вариантов. Редактирование гена, приведенное на этапе (II) выше, эквивалентно термину «редактирование генома». Необязательно, химически модифицированная молекула нуклеиновой кислоты или химически модифицированный промотор могут быть впоследствии введены в клетку или стабильно интегрированы. С помощью такой клетки химически модифицированная молекула нуклеиновой кислоты и модифицированный промотор могут размножаться в контексте пролиферации клетки. Впоследствии они могут быть выделены в большом количестве, и могут быть выполнены анализы экспрессии. Анализы экспрессии, в частности, являются подходящими, когда химическая модификация касается промотора. Можно собрать клетки и выделить химически модифицированный белок устойчивости для химического анализа. Если клетка, содержащая химически модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты или модифицированный промотор, является растительной клеткой, из нее можно регенерировать целое растение. Подходы, описанные в этом параграфе, могут быть реализованы после завершения указанного выше способа получения модифицированной формы молекулы нуклеиновой кислоты и/или

модифицированного промотора, и полученные варианты также являются частью настоящего изобретения. Кроме того, растение, содержащее химически модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты или модифицированный промотор, также является частью настоящего изобретения. Таким образом, настоящее изобретение также относится к растению, полученному этим способом. Кроме того, изобретение также относится к химически модифицированным молекулам нуклеиновой кислоты, полученным этим способом, и к кодируемым полипептидам. Эти соединения могут быть оптимизированными версиями исходных (немодифицированных) соединений, в которых полученный в результате уровень устойчивости, как это объяснено выше, может быть увеличен по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5 или более процентов или по меньшей мере на один рейтинговый балл. В этом отношении способ получения химически модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты также является способом оптимизации молекулы нуклеиновой кислоты. Кроме того, способ оптимизации может содержать дополнительный этап, на котором идентифицируются те модифицированные варианты молекулы нуклеиновой кислоты, которые приводят, по сравнению с неизмененными вариантами, к повышенной устойчивости растения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения повышать указанную устойчивость к BNYVV можно путем увеличения экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая модифицирует Rz2-опосредованную устойчивость к BNYVV, т. е. к функционального гена реморина, в растении. Это может происходить посредством модификации нативного промотора, при этом модификация предпочтительно происходит посредством редактирования гена или сайт-направленного мутагенеза, который опосредуется сайт-направленными нуклеазами, и, необязательно, моделями репарации. Примеры таких нуклеаз уже приводились выше. Повышение экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению также может происходить посредством слияния молекулы нуклеиновой кислоты с гетерологичным промотором, который проявляет более высокую активность по сравнению с нативным промотором, в частности после инфицирования BNYVV. Слияние также может происходить посредством сайт-ориентированной нуклеазы и моделей репарации, но также посредством прямой вставки после двухцепочечного разрыва.

Как уже упоминалось, способ повышения устойчивости к BNYVV также может быть осуществлен посредством увеличения активности и/или стабильности полипептида по настоящему изобретению посредством модификации нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и может выполняться с

помощью способов, известных специалисту в данной области техники. Этот подход детально объясняется ниже.

Все упомянутые подходы, касающиеся либо введения молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функционального гена реморина, в геном целевого растения, либо посредством модификации указанной молекулы нуклеиновой кислоты для увеличения ее экспрессии и стабильности/активности соответствующего белка, могут быть, необязательно, осуществлены в комбинации с ингибированием экспрессии нефункционального аллеля реморина.

Как альтернатива, способ придания, восстановления или повышения устойчивости к BNYVV может быть осуществлен посредством мутагенеза растения или растительных клеток, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, препятствующую устойчивости к BNYVV, т. е. нефункциональный аллель реморина, и скрининга, и, необязательно, путем отбора растений или растительных клеток, в которых функциональный аллель полипептида, кодируемый функциональным аллелем реморина, был восстановлен и/или в котором экспрессия нефункционального полипептида была отменена. Это может быть выполнено посредством случайного или направленного мутагенеза последовательности нуклеиновой кислоты нефункционального гена реморина. Примеры полиморфизмов, позволяющие дифференцировать аллель чувствительности от аллеля устойчивости, представлены в таблицах 1 и 2.

Например, нефункциональный аллель может быть модифицирован посредством мутации гена с помощью нуклеаз TALE (TALEN) или цинк-пальцевых нуклеаз (ZFN), а также систем CRISPR/Cas, которые, среди прочего, описаны в качестве примера в WO 2014/144155 A1 ((Engineering plant genomes using CRISPR/Cas systems) и Осакабе и Осакабе, *Plant Cell Physiol.*, 56 (2015), 389–400. Этого также можно достичь с помощью метода, обозначенного как TILLING (*целенаправленный поиск индуцированных локальных повреждений в геномах*), в котором описано, например, в немецкой патентной заявке DE 10 2013 101617, как точечные мутации вызываются в чувствительном гене, и затем отбираются растения, которые демонстрируют подходящую, т. е. придающую устойчивость, мутацию, например ячмень, устойчивый к вирусу желтой мозаики; см. DE 10 2013 101617 на стр. 4, 8 и 12, в п. [0014], [0026] и [0038]. Метод TILLING также подробно описан в публикации Хеникофф и соавт. (Henikoff *et al.*, *Plant Physiol.* 135, 2004, 630–636).

Для обеспечения возможности разрыва в заданном сайте-мишени ферменты для целевого мутагенеза предпочтительно включают домен связывания/узнавания и домен расщепления. Конкретными ферментами, способными вызывать двухцепочечные или одноцепочечные разрывы, являются нуклеазы или нуклеазы (энзимы DSB1, индуцирующие

двухцепочечный разрыв, или SSBI, индуцирующие одноцепочечный разрыв), а также их варианты, включая такие молекулы, которые больше не содержат нуклеазную или никакую функцию, а действуют скорее, как распознающие молекулы в сочетании с другим ферментом. В последние годы было разработано много подходящих нуклеаз, в частности адаптированных эндонуклеаз, включая мегануклеазы, цинк-пальцевые нуклеазы, нуклеазы TALE, нуклеазы-аргонавы, полученные, например, из *Natronobacterium gregoryi*, и нуклеазы CRISPR, включая, например, Cas9, Cpf1, Csm1, нуклеазы CasX или CasY как часть системы кластерных коротких палиндромных повторов, разделенных регулярными промежутками (CRISPR). Таким образом, в предпочтительном аспекте настоящего изобретения компонент геномной инженерии содержит фермент, индуцирующий DSB или SSB, или его вариант, выбранный из эндонуклеазы CRISPR/Cas, предпочтительно эндонуклеазы CRISPR/Cas9, эндонуклеазы CRISPR/Cpf1 или CRISPR/Csm1, цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN), самонаводящейся эндонуклеазы, мегануклеазы и эффекторной нуклеазы TAL.

Редко расщепляющиеся эндонуклеазы представляют собой ферменты DSB/SSBI, имеющие сайт узнавания предпочтительно из примерно 14–70 последовательных нуклеотидов и, следовательно, имеют очень низкую частоту расщепления даже в более крупных геномах, таких как геномы большинства растений. Самонаводящиеся эндонуклеазы, также называемые мегануклеазами, относятся к семейству таких редко расщепляющихся эндонуклеаз. Они могут кодироваться интронами, независимыми генами или промежуточными последовательностями и обладать поразительными структурными и функциональными свойствами, которые отличают их от более классических рестрикционных ферментов, как правило от бактериальных систем рестрикции-модификации типа II. Их сайты узнавания имеют общую асимметрию, контрастирующую с характерной симметрией второго порядка большинства сайтов узнавания рестрикционных ферментов. Было показано, что несколько хоминг-эндонуклеаз, кодируемых интронами или интеинами, способствуют хомингу их соответствующих генетических элементов в аллельные безинтронные или безинтеиновые сайты. Создавая сайт-специфический двухцепочечный разрыв в безинтронных или безинтеиновых аллелях, эти нуклеазы создают рекомбиногенные концы, участвующие в процессе преобразования гена, который дублирует кодирующую последовательность и приводит к вставке интрона или промежуточной последовательности на уровне ДНК. Список других редко расщепляющихся мегануклеаз и их соответствующих сайтов узнавания представлен в таблице I, WO 03/004659 (страницы 17–20) (включена в настоящий документ в качестве ссылки).

Кроме того, доступны способы для создания специализированных редко расщепляющихся мегануклеаз, которые распознают практически любую выбранную последовательность-мишень нуклеотидов. Вкратце, химерные ферменты рестрикции могут быть получены с применением гибридов между цинк-пальцевым доменом, предназначенным для распознавания конкретной нуклеотидной последовательности, и неспецифическим доменом расщепления ДНК природного фермента рестрикции, такого как FokI. Такие способы были описаны, например, в WO 03/080809, WO 94/18313 или WO 95/09233 и Исалан и соавт. (2001). Быстрый общеприменимый способ создания цинковых пальцев, проиллюстрированный нацеливанием на промотор HIV-1. *Nature biotechnology*, 19(7): 656; Лью и соавт. (1997). Конструкция полидактильных цинк-пальцевых белков для уникальной адресации в сложных геномах. *Труды Национальной академии наук*, 94(11): 5525-5530.

Другой пример специально разработанных эндонуклеаз включает нуклеазы TALE (TALEN), основанные на эффекторах, подобных активаторам транскрипции (TALE), из бактериального рода *Xanthomonas*, слитых в каталитический домен нуклеазы (например, FokI или его вариант). Специфичность связывания ДНК этих TALE определяется повторяющимися вариабельными ди-остатками (RVD), tandemно расположенных повторяющихся единиц из 34/35 аминокислот, так что один RVD специфически распознает один нуклеотид в целевой ДНК. Повторяющиеся единицы могут быть собраны для распознавания практически любых последовательностей-мишеней и слиты в каталитический домен нуклеазы для создания последовательность-специфичных эндонуклеаз (см., напр., Бош и соавт. (2009). Нарушение кода специфичности связывания ДНК эффекторов TAL-типа III. *Science*, 326(5959), 1509–1512; Москоу и Богданове (2009). Простой код управляет распознаванием ДНК эффекторами TAL. *Science*, 326(5959), 1501–1501; и WO 2010/079430, WO 2011/072246, WO 2011/154393, WO 2011/146121, WO 2012/001527, WO 2012/093833, WO 2012/104729, WO 2012/138927, WO 2012/138939). WO 2012/138927 дополнительно описывает мономерные (компактные) TALEN и TALE с различными каталитическими доменами и их комбинациями.

Недавно был описан новый тип адаптируемой эндонуклеазной системы — так называемая система CRISPR/Cas. Система CRISPR, в ее естественном окружении, описывает молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну небольшую и индивидуальную некодирующую РНК в сочетании с нуклеазой Cas или другой нуклеазой CRISPR, такой как нуклеаза Cpf1 или нуклеаза Csm1 (Цетше и соавт., «Cpf1 — одиночная РНК-направляющая эндонуклеаза системы CRISPR-Cas класса 2», *Cell*, 163, стр. 1–13, октябрь 2015; US 2017/0233756 A1), которая может продуцировать специфический

двухцепочечный разрыв ДНК. В настоящее время системы CRISPR подразделяются на 2 класса, включающие пять типов систем CRISPR, систему типа II, например использующую Cas9 в качестве эффектора, и систему типа V, использующую Cpf1 в качестве эффекторной молекулы (Макарова и соавт., Nature Rev. Microbiol., 2015). В искусственных системах CRISPR, синтетическая некодирующая РНК и нуклеаза CRISPR и/или, необязательно, модифицированная нуклеаза CRISPR, модифицированная так, чтобы действовать в качестве никазы или лишенная какой-либо нуклеазной функции, могут применяться в комбинации по меньшей мере с одной синтетической или искусственной направляющей РНК или гРНК, сочетающая функцию crRNA и/или tracrRNA (Макарова и соавт., 2015, см. выше). Иммунный ответ, опосредованный CRISPR/Cas в естественных системах, требует CRISPR-РНК (crRNA), при этом созревание этой направляющей РНК, контролирующей специфическую активацию нуклеазы CRISPR, значительно варьируется между различными системами CRISPR, которые были охарактеризованы до сих пор. Во-первых, вторгающаяся ДНК, также известная как спейсер, интегрируется между двумя соседними повторяющимися областями на проксимальном конце локуса CRISPR. Системы CRISPR типа II кодируют нуклеазу Cas9 как ключевой фермент на этапе интерференции, при этом эта система содержит как crRNA, так и транс-активирующую РНК (tracrRNA) в качестве направляющего мотива. Они гибридизуются и образуют участки двухцепочечной (ds) РНК, которые распознаются РНКазой III и могут быть расщеплены с образованием зрелых крРНК. Затем они, в свою очередь, связываются с молекулой Cas, чтобы направить нуклеазу специально к целевой области нуклеиновой кислоты. Молекулы рекомбинантной пРНК могут включать как вариабельную область узнавания ДНК, так и область взаимодействия Cas и, таким образом, могут быть специально сконструированы независимо от конкретной нуклеиновой кислоты-мишени и желаемой нуклеазы Cas.

В качестве дополнительного механизма безопасности в целевой области нуклеиновой кислоты должны присутствовать PAM (мотивы, прилегающие к протоспейсерам); это последовательности ДНК, которые следуют непосредственно за ДНК, распознаваемой комплексом Cas9/РНК. Последовательность PAM для Cas9 из *Streptococcus pyogenes* была описана как NGG или NAG (стандартный нуклеотидный код IUPAC) (Хинек и соавт., «Программируемая двойная РНК-управляемая ДНК-эндонуклеаза в адаптивном бактериальном иммунитете», Science 2012, 337: 816-821). Последовательностью PAM для Cas9 из *Staphylococcus aureus* является NNGRRT или NNGRR(N). Известны и другие варианты систем CRISPR/Cas9. Таким образом, Cas9 *Neisseria meningitidis* расщепляет последовательность PAM NNNNGATT. Таким образом, Cas9 *Streptococcus thermophilus* расщепляет последовательность PAM NNAGAAG. Недавно был описан дополнительный

мотив PAM NNNNRYAC для системы CRISPR *Campylobacter* (WO 2016/021973 A1). В отношении нуклеаз Cpf1 было описано, что комплекс Cpf1-crRNA без tracrRNA эффективно распознает и расщепляет целевую ДНК с помощью короткого Т-богатого PAM, в отличие от обычно G-богатых PAM, распознаваемых системами Cas9 (Цетше и соавт., см. выше). Кроме того, применяя модифицированные полипептиды CRISPR, можно получить специфические одноцепочечные разрывы. Комбинированное применение нуклеаз Cas с различными рекомбинантными гРНК также может вызывать высокоспецифичные двухцепочечные разрывы ДНК посредством двойного разделения ДНК. Кроме того, применяя две гРНК, можно оптимизировать специфичность связывания ДНК и, таким образом, расщепление ДНК. Другие эффекторы CRISPR, такие как эффекторы CasX и CasY, первоначально описанные для бактерий, тем временем доступны и представляют собой дополнительные эффекторы, которые можно применять для целей геномной инженерии (Бурштайн и соавт., «Новые системы CRISPR-Cas из некультивируемых микробов», *Nature*, 2017, 542, 237–241).

Сайт расщепления фермента DSBI/SSBI относится к точному месту на ДНК или РНК, где индуцируется разрыв. Сайт расщепления может входить или не входить (перекрываться) в сайт узнавания фермента DSBI/SSBI, и, следовательно, указано, что сайт расщепления фермента DSBI/SSBI расположен на его сайте узнавания или возле него. Сайт узнавания фермента DSBI/SSBI, также иногда называемый сайтом связывания, представляет собой нуклеотидную последовательность, которая (специфически) распознается ферментом DSBI/SSBI и определяет его специфичность связывания. Например, мономер TALEN или ZNF имеет сайт узнавания, который определяется их повторами RVD или ZF соответственно, тогда как его сайт расщепления определяется его нуклеазным доменом (например, FokI) и, как правило, находится за пределами сайта узнавания. В случае димерных TALEN или ZFN сайт расщепления расположен между двумя сайтами узнавания/связывания соответствующих мономеров, при этом эта промежуточная область ДНК или РНК, где происходит расщепление, называется спейсерной областью.

Специалист в данной области техники сможет выбрать фермент DSBI/SSBI, распознающий определенный сайт узнавания и индуцирующий DSB или SSB в сайте расщепления в предварительно выбранном / заданном сайте или вблизи него, или разработать такой DSBI/SSBI фермент. Как альтернатива, сайт узнавания фермента DSBI/SSBI может быть введен в целевой геном с применением любого обычного способа трансформации или путем скрещивания с организмом, имеющим сайт узнавания фермента

DSBI/SSBI в своем геноме, и любая желаемая нуклеиновая кислота может быть впоследствии введена в сайт расщепления этого фермента DSBI/SSBI или вблизи него.

В контексте настоящего описания «фермент, индуцирующий двухцепочечный разрыв ДНК», «фермент, индуцирующий двухцепочечный разрыв» или «фермент DSBI» представляет собой фермент, способный индуцировать двухцепочечный разрыв ДНК в определенной нуклеотидной последовательности, называемой «место распознавания», или «заданное место», или «заданное местоположение». Соответственно, «фермент, индуцирующий одноцепочечный разрыв ДНК или РНК», «фермент, индуцирующий одноцепочечный разрыв» или «фермент SSBI» представляет собой фермент, способный индуцировать разрыв одноцепочечной ДНК или РНК в конкретной нуклеотидной последовательности, называемой «местом распознавания», или «заданным местом», или «заданным местоположением».

Используемый здесь термин «молекула репарации нуклеиновой кислоты» или «матрица репарации» представляет собой одноцепочечную или двухцепочечную молекулу ДНК или молекулу РНК, которая применяется в качестве матрицы для модификации геномной ДНК или РНК в заранее выбранном сайте вблизи сайта расщепления или на нем. Используемый здесь термин «применение в качестве матрицы для модификации геномной ДНК» означает, что молекула репарации нуклеиновой кислоты копируется или интегрируется в заранее выбранный сайт посредством гомологичной рекомбинации между фланкирующей(ими) областью(ями) и соответствующей(ими) гомологической(ими) областью(ями) в геноме-мишени, фланкирующем заранее выбранный сайт, необязательно, в комбинации с негомологичным концевым соединением (NHEJ) на одном из двух концов молекулы репарации нуклеиновой кислоты (напр., в случае наличия только одной фланкирующей области).

Используемый здесь термин «модификация генома» означает, что геном был изменен по меньшей мере в одном нуклеотиде или по меньшей мере в результате одного эпигенетического редактирования.

Используемые здесь термины «заранее выбранный сайт», «заданный сайт» обозначают конкретную нуклеотидную последовательность в геноме (например, ядерном геноме или геноме хлоропласта), где желательно вставить, заменить и/или удалить один или несколько нуклеотидов.

В различных вариантах осуществления по меньшей мере один редактор оснований по настоящему изобретению временно или постоянно связан по меньшей мере с одним сайт-специфическим ферментным комплексом DSBI/SSBI или по меньшей мере с одним

модифицированным сайт-специфическим ферментным комплексом DSBI/SSBI или, необязательно, с компонентом указанного по меньшей мере одного сайт-специфического ферментного комплекса DSBI/SSBI. Связь может быть ковалентной и/или нековалентной. Любой редактор оснований или сайт-специфический ферментный комплекс DSBI/SSBI, или его каталитически активный фрагмент, или любой компонент комплекса базового редактора или сайт-специфического ферментного комплекса DSBI/SSBI, как описано в данном документе, может быть введен в клетку в виде фрагмента нуклеиновой кислоты, при этом фрагмент нуклеиновой кислоты представляет или кодирует ДНК, РНК или эффекторный белок, или он может быть введен в виде ДНК, РНК и/или белка, или любой их комбинации.

Редактор оснований представляет собой белок или его фрагмент, обладающий способностью опосредовать целевую модификацию основания, т. е. преобразовывать интересующее основание, что приводит к интересующей точечной мутации. Предпочтительно по меньшей мере один редактор оснований в контексте настоящего изобретения временно или постоянно слит по меньшей мере с одним ферментом DSBI/SSBI или, необязательно, с компонентом по меньшей мере одного DSBI/SSBI. Слияние может быть ковалентным и/или нековалентным. Во многих публикациях показано целевое преобразование оснований, в первую очередь цитидина (C) в тимин (T), с применением нуклеазы CRISPR/Cas9 или нефункциональной нуклеазы, связанной с цитидиндезаминазным доменом, каталитическим полипептидом, редактирующим мРНК аполипопротеина В (APOBEC1), например, APOBEC1 получен из крысы. Дезаминирование цитозина (C) катализируется цитидиндезаминазами и приводит к образованию урацила (U), который имеет свойства тимина (T) относительно спаривания оснований. Большинство известных цитидиндезаминаз действуют на РНК, и несколько примеров, которые, как известно, принимают ДНК, требуют одноцепочечной (ss) ДНК. Исследования комплекса ДНК-мишени dCas9 показывают, что по меньшей мере девять нуклеотидов (nt) смещенной цепи ДНК не образуются при образовании комплекса Cas9-гид РНК-ДНК «R-петля» (Хоре и соавт., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 529–536 (2011)). Действительно, в структуре комплекса Cas9 R-петля первые 11 нуклеотидов протоспейсера на смещенной цепи ДНК неупорядочены, указывая, тем самым, что их движение не очень ограничено. Также предполагалось, что индуцированные Cas9 нуклеотидные мутации в цитозинах в нематричной цепи могут возникать из-за их доступности для клеточных ферментов цитозиндезаминазы. В качестве довода было приведено то, что подмножество этого участка ssДНК в R-петле может служить эффективным субстратом для цитидиндезаминазы, связанной с dCas9, для осуществления прямого программируемого превращения C в U в ДНК (Комор и соавт., см.

выше). Недавно Гоуделли и др., «Программируемое редактирование оснований А • Т в G • С в геномной ДНК без расщепления ДНК», *Nature*, 2017, 551 (7681), 464, описали редакторы оснований аденина (ABE), которые опосредуют преобразование А • Т к G • С в геномной ДНК.

Эти способы предпочтительно обуславливают повышение устойчивости по меньшей мере на один рейтинговый балл, в частности, предпочтительно, повышение устойчивости по меньшей мере на два, три или более рейтинговых баллов. После мутагенеза растительных клеток и последующей регенерации растений из мутагенизированных растительных клеток или мутагенеза растений затем можно идентифицировать растения, которые проявляют одну или несколько мутаций, как показано в таблицах 1 и 2, в молекуле эндогенной нуклеиновой кислоты. В этом контексте уже упомянутое растение по настоящему изобретению может быть охарактеризовано тем, что устойчивость повышается по меньшей мере на один рейтинговый балл, предпочтительно по меньшей мере на два или более рейтинговых балла. Как альтернатива, устойчивость растений по настоящему изобретению может быть увеличена, например по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5 или более процентов по сравнению с контрольным растением, которое не содержит нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению и/или которое включает её нефункциональный вариант. Увеличение можно измерить путем инокуляции одного здорового листа изолятом патогена и определения зараженной поверхности через 15 дней. Уменьшение зараженной поверхности на 5% соответствует увеличению устойчивости на 5%. Дополнительные параметры для проведения измерения могут быть получены из приведенного ниже варианта «проверка устойчивости».

Способ получения устойчивого к BNYVV растения, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функциональный ген реморина, в качестве альтернативного варианта включает, как описано выше, получение растения рода *Beta* или растительной клетки рода *Beta*, содержащей ген устойчивости Rz2, опосредующий устойчивость к BNYVV эндогенно или трансгенно, трансформацию указанной растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функциональным геном реморина, или соответствующим вектором либо кассетой экспрессии, и регенерацию трансгенного растения из трансформированной растительной клетки.

В альтернативном варианте осуществления изобретения способ получения растения, устойчивого к BNYVV, включает предоставление растения рода *Beta* или растительной клетки рода *Beta*, содержащей ген устойчивости Rz2, опосредующий

устойчивость к BNYVV эндогенно или трансгенно, введение сайт-направленной нуклеазы или никазы и, необязательно, матрицы репарации или сайт-направленного редактора оснований в клетку растения, при этом сайт-направленная нуклеаза способна генерировать по меньшей мере один одноцепочечный разрыв ДНК или по меньшей мере один двухцепочечный разрыв цепи ДНК в геноме клетки, предпочтительно в молекуле нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, препятствующей устойчивости к BNYVV, т. е. нефункциональному реморину, или перед указанной молекулой нуклеиновой кислоты либо после нее, а матрица репарации включает молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая участвует в устойчивости к BNYVV, т. е. функциональный ген реморина, или в которой сайт-направленный редактор оснований способен генерировать по меньшей мере один одноцепочечный разрыв ДНК в одном из упомянутых мест и для преобразования по меньшей мере одного азотистого основания. Азотистые основания, которые предпочтительно должны преобразовываться, перечислены в таблице 1 выше. Кроме того, способ, необязательно, включает культивирование созданной клетки в условиях, которые позволяют модифицировать геном в указанном месте, при этом модификация может представлять собой замену, делецию и/или вставку по меньшей мере одного нуклеотида. Модификация может, необязательно, происходить путем гомологически направленной репарации или гомологичной рекомбинации, при этом молекула нуклеиновой кислоты интегрируется в геном растения. Тем не менее замена одного нуклеотида также может происходить с помощью редакторов оснований, напр. инструментов CRISPR; таким образом, репарационная матрица не требуется. Кроме того, охватывается регенерация растения из модифицированной растительной клетки.

Способ получения устойчивого к BNYVV растения, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функциональный ген реморина, в качестве альтернативного варианта включает скрещивание растения рода *Beta*, содержащего ген устойчивости Rz2, опосредующий устойчивость к BNYVV эндогенно или трансгенно с растением, содержащим функциональный ген реморина по настоящему изобретению, необязательно, в комбинации с геном устойчивости Rz2, и идентификацию и необязательный выбор растения, содержащего ген устойчивости Rz2 и молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функциональный ген реморина как эндогенно, так и трансгенно, при этом ген устойчивости Rz2 и/или указанная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению гомозиготно присутствует в геноме растения.

Настоящее изобретение также относится к способу идентификации и, возможно, получения растения вида *Beta vulgaris*, его части или семени, содержащего молекулу

нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функциональный ген реморина, и которое способно проявлять устойчивость к BNYVV, опосредованной геном Rz2, отличающийся тем, что способ включает этап обнаружения присутствия и/или экспрессии указанной молекулы нуклеиновой кислоты или кодируемого полипептида в растении или образце, его части или семени. Соответственно, присутствие и экспрессия указанной молекулы нуклеиновой кислоты указывают на то, что растение способно проявлять опосредованную Rz2 устойчивость к BNYVV. Как альтернатива, отсутствие и недостаточность экспрессии, соответственно, указанной молекулы нуклеиновой кислоты и/или присутствие и/или экспрессия молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, препятствующей устойчивости к BNYVV, т. е. нефункционального гена реморина, указывает на то, что растение не способно или не может проявлять Rz2-опосредованную устойчивость к BNYVV. Кроме того, способ может включать идентификацию и, необязательно, отбор растения вида *Beta vulgaris*, его части или семени, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функциональный ген реморина, который способен проявлять устойчивость к BNYVV, опосредованный Rz2, если он присутствует в геноме растения.

Подобным образом настоящее изобретение относится к способу идентификации и, необязательно, отбора растения вида *Beta vulgaris*, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая препятствует устойчивости к BNYVV, т. е. нефункциональный ген реморина, отличающийся тем, что способ включает этап обнаружения присутствия и/или экспрессии указанной молекулы нуклеиновой кислоты или кодируемого полипептида в растении или образце, его части или семени.

Наличие и/или экспрессия молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или полипептида по настоящему изобретению может быть проверено с помощью стандартных способов, известных специалисту в данной области техники, например, с помощью ПЦР, ОТ-ПЦР или вестерн-блоттинга.

При точном картировании положение гена реморина в геноме *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* было определено, сам ген и окружающие его участки последовательности идентифицированы. В частности, реморин расположен примерно на 0,75 сМ дистальнее гена Rz2 на длинном плече хромосомы 3. Это, в свою очередь, представляет собой основу для разработки зондов гибридизации ДНК или генетических маркеров в целевой области, позволяющих различать растения, содержащие функциональный аллель реморина, и растения, содержащие нефункциональный аллель реморина, и позволяющих разрабатывать маркеры в одной или нескольких косегрегационных областях, которые можно применять для идентификации рекомбинантов между генами и, таким образом, для отделения аллеля

репрессора от аллеля устойчивости Rz2. Генетическое положение обоих генов по отношению друг к другу показано на фигуре 7.

Зонды гибридизации ДНК могут быть получены из последовательности гена реморина и применяться для скрининга геномных банков и/или банков кДНК желаемого организма. Зонды можно применять для амплификации идентифицированных гомологичных генов с помощью известного процесса полимеразной цепной реакции (ПЦР) и для проверки присутствия гена реморина эндогенно в организме или успешности его введения гетерологично.

Здесь специалист в данной области техники может прибегнуть к обычным способам гибридизации, клонирования и секвенирования, которые перечислены, например, Сембрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001). Специалист в данной области техники может также синтезировать и применять олигонуклеотидные праймеры для амплификации последовательностей гена реморина. Для достижения специфической гибридизации такие зонды должны быть специфичными и иметь длину не менее 15 нуклеотидов, предпочтительно не менее 20 нуклеотидов. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти у Тейссен, Лабораторные методы в биохимии и молекулярной биологии — гибридизация с зондами нуклеиновых кислот, часть 1, глава 2, «Обзор принципов гибридизации и стратегии анализа нуклеиновых кислот». Эльсевьер, New York (1993); и в «Текущие протоколы молекулярной биологии», глава 2, Аусубел *и соавт.*, ред., Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1995).

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к олигонуклеотидам по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20, предпочтительно по меньшей мере 21, 22, 23, 24 или 25, особенно предпочтительно по меньшей мере 30, 35, 40, 45 или 50 и особенно предпочтительно по меньшей мере 100, 200, 300, 500 или 1000 нуклеотидов длиной, которые специфически гибридизуются с нуклеотидной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая участвует в Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV, или которые специфически гибридизуются с нуклеотидной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая препятствует устойчивости к BNYVV, или молекулы нуклеиновой кислоты, которые комплементарны обоим последовательностям нуклеиновой кислоты. Кроме того, изобретение относится к паре молекул нуклеиновых кислот, предпочтительно в форме олигонуклеотидов, которые приемлемы для присоединения в качестве прямого и обратного праймера к области,

специфичной для одной из указанных молекул нуклеиновой кислоты, и для их амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Таким образом, настоящее изобретение также относится к маркерам в качестве олигонуклеотидов, в частности к праймерным олигонуклеотидам. Они включают молекулу нуклеиновой кислоты длиной по меньшей мере 15 нуклеотидов, которая специфически гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, определенной как это указано выше.

В частности, настоящее изобретение охватывает пару молекул нуклеиновых кислот, предпочтительно в форме олигонуклеотидов или набора, содержащего эту пару олигонуклеотидов, которые приемлемы для гибридизации в качестве прямого и обратного праймера к области, специфичной для нуклеиновой кислоты молекулы кислоты по настоящему изобретению и для ее амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР), или которые приемлемы в качестве прямого и обратного праймера для гибридизации с областью в геноме *Beta vulgaris*, которая в *Beta vulgaris* демонстрирует косегрегацию с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая участвует в Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV, т. е. с функциональным геном реморина, или с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая препятствует устойчивости к BNYVV, т. е. нефункциональным геном реморина. Как альтернатива или дополнительно олигонуклеотид или пара олигонуклеотидов приемлемы для гибридизации с областью в геноме *Beta vulgaris*, которая в *Beta vulgaris* косегрегирует с функциональным геном реморина вместе с геном Rz2 или с нефункциональным геном реморина вместе с геном Rz2.

Таблица 3: Маркеры, фланкирующие реморин и ген Rz2, как показано на фигуре 7.

название маркера	генетическое положение [cM]	физическое положение [bp]	нуклеотидные основания в геноме <i>Beta vulgaris</i> , содержащие нефункциональный ген реморина	S EQ ID №:
s3e5985	36,93186	7077769	C	33
s01	39			

sxh1002 s02	39,02103 34	7957425	G	34
sxh2499 s01	39,99585 61	8403820	A	35
sxi0698 s01	40,50907 06	8648395	T	36
sxh8485 s01	42,38078 76	9605012	A	37
sxe7357 s01	42,83776 16	9856523	C	38
sxn1017 s02	43,69030 85	1034848 0	T	39
s3e2247 xxx	45,75838 69	1169913 8	A	40

В предпочтительном варианте осуществления олигонуклеотид или пару олигонуклеотидов по настоящему изобретению выбирают из группы, состоящей из указанных в SEQ ID №: 24–40. В частности, между реморином и Rz2 было идентифицировано 74 маркера, примеры трех из них представлены на фигуре 7: *s3e5782s01* (SEQ ID №: 30; нефункциональный аллель: T), *s3e4913xxx* (SEQ ID №: 31; нефункциональный аллель: T) и *s3e5800s01* (SEQ ID №: 32; нефункциональный аллель: T). На фигуре 7 также показаны позиции маркеров дистальнее реморина и проксимальнее Rz2, которые определяют фланкирующие области, которые можно применять для селекции с помощью маркеров (MAS) с целью введения функционального реморина. Эти маркеры и их соответствующие генетические и физические положения показаны в таблицах 3–5.

Таблица 4: Маркеры, расположенные между реморином и геном Rz2, как показано на фигуре 7.

название маркера	генетическое положение [cM]	физическое положение [bp]	нуклеотидные основания в геноме <i>Beta vulgaris</i> , содержащие	SEQ ID №:
------------------	-----------------------------	---------------------------	---	-----------

			нефункциональ й ген реморина		
s01	s3e5782	41,15	8961406	T	30
xxx	s3e4913	41,38	9079399	T	31
s01	s3e5800	41,73	9260730	T	32

Таблица 5: Маркеры, расположенные в гене реморина, как показано на фигуре 7.

названи е маркера	генетиче ское положение [cM]	физичес кое положение [bp]	нуклеотид ные основания в геноме <i>Beta vulgaris</i> , содержащие нефункциональны й ген реморина	S EQ ID №:
s01 s3p4348	~41,0	8886686	G	27
s01 s3p4349	~41,0	8886781	T	28
s01 s3p4351	~41,0	8891242	T	29

Кроме того, олигонуклеотид по настоящему изобретению может быть связан с флуоресцентным красителем для генерации сигнала флуоресценции, например, при возбуждении светом с соответствующей длиной волны. Флуоресцентный краситель может быть флуорохромом. Олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут быть связаны с другими соединениями, подходящими для генерации сигнала. Такие олигонуклеотиды не встречаются в природе и также не могут быть изолированы из природной среды. Для получения таких меченых олигонуклеотидов выполняется следующее: ДНК может быть помечена биоортогонально. Для этого ДНК может быть помечена *in vivo* или *in vitro* аналогами нуклеозидов, которые, например, впоследствии могут быть связаны с флуорофором по реакции Штаудингера. В дополнение к этому ДНК также может быть

химически снабжена флуорофорами. Олигонуклеотиды можно маркировать посредством синтеза фосфорамидита с помощью флуорофоров, которые, например, применяются в кПЦР, секвенировании ДНК и гибридизации *in situ*. Кроме того, ДНК может генерироваться ферментативно в ходе полимеразной цепной реакции с флуоресцентными нуклеотидами или помечаться лигазой или концевой дезоксинуклеотидилтрансферазой. ДНК также может быть обнаружена косвенно через биотинилирование и флуоресценцию авидина. Для связывания в качестве флуорофоров, среди прочего, применяются флуоресцеин, флуоресцентные лантаноиды, наночастицы золота, углеродные нанотрубки или квантовые точки. Одним из наиболее часто применяемых флуоресцентных веществ является FAM (карбоксифлуоресцеин). Следовательно, олигонуклеотиды и, в частности, праймеры, обладающие маркировкой FAM, охватываются настоящим изобретением. FAM, предпочтительно, присутствует в качестве 6-FAM, при этом, в зависимости от желаемой длины волны излучения и возбуждения, тем не менее могут применяться и другие варианты FAM, например, 5-FAM. Примерами дополнительных маркеров флуоресценции являются AlexaFluor, ATTO, Dabcyl, HEX, Rox, TET, Texas Red и Yakima Yellow. В зависимости от области применения, олигонуклеотиды могут быть снабжены модификациями оснований или сахарофосфатного стержня. Среди них, среди прочего, аминок-dT, азид-dT, 2-аминопурин, 5-Br-dC, 2'-дезоксиинозин (INO), 3'-дезокси-A, C, G, 5-Met-dC, 5-OH-Met-dCN6-Met-dA и другие.

Таким образом, способ идентификации по настоящему изобретению также включает обнаружение молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функционального гена реморина, посредством обнаружения по меньшей мере одного полиморфизма между функциональным геном реморина и нефункциональным геном реморина, т. е. между последовательностями молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая участвует в Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV, и последовательностями варианта молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая препятствует указанной устойчивости, с применением молекулярных маркеров, которые обнаруживают один или несколько полиморфизмов. Примеры этих полиморфизмов приведены в таблице 1. Соответственно, присутствие по меньшей мере одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функционального гена реморина, или в области косегрегации указывает на то, что растение способно проявлять Rz2-опосредованную устойчивость к BYNVV. Как альтернатива, отсутствие маркерного локуса в нуклеотидной последовательности указанной молекулы нуклеиновой кислоты и/или присутствие по меньшей мере одного маркерного локуса в нуклеотидной

последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, препятствующего устойчивости к BNYVV, т. е. нефункционального гена реморина, или в области косегрегации указывает на то, что растение не способно или не может проявлять Rz2-опосредованную устойчивость к BNYVV. Кроме того, способ может включать идентификацию и, необязательно, отбор растения вида *Beta vulgaris*, его части или семени, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функциональный ген реморина, который способен проявлять устойчивость к BNYVV, опосредованный Rz2, если он присутствует в геноме растения.

Следуя тому же принципу, можно идентифицировать растение, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая препятствует устойчивости к BNYVV, т. е. нефункциональный ген реморина.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения нефункциональный вариант реморина содержит последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотную последовательность, соответственно, как определено выше, т. е. имеющую специфические замены нуклеиновой кислоты и аминокислоты, соответственно, как показано в таблицах 1 и 2 и изображено на фигурах 2 и 3. Предпочтительный вариант осуществления способа по настоящему изобретению, следовательно, включает обнаружение по меньшей мере одного полиморфизма, который представлен на фигуре 2, с применением молекулярных маркеров, обнаруживающих полиморфизмы, в частности диагностические полиморфизмы. Это обнаружение предпочтительно происходит с применением по меньшей мере одного молекулярного маркера на каждый полиморфизм, в частности на диагностический полиморфизм. Специалистам в данной области техники известно, какие маркерные методы следует применять для обнаружения соответствующего полиморфизма и как для этого конструируются молекулярные маркеры (см. Достижения в семеноводстве и технологии производства семян Том I, Ванангамуди *и соавт.*, 2008).

Как уже указывалось выше, способ идентификации по настоящему изобретению включает этап обнаружения по меньшей мере одного маркерного локуса в области, косегрегационной с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Предпочтительно косегрегационная область представляет собой геномный интервал в *Beta vulgaris* на хромосоме 3, который включает и фланкируется маркерными локусами, обнаруживаемыми с помощью

- (i) маркеров s3e5985s01 (SEQ ID № 33) и s3p4348s01 (SEQ ID № 27), и/или
 - (ii) маркеров s3p4351s01 (SEQ ID № 29) и s3e2247xxx (SEQ ID № 40),
- предпочтительно, с помощью

- (i) маркеров sxh1002s02 (SEQ ID № 34) и s3p4348s01 (SEQ ID № 27), и/или

(ii) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *sxn1017s02* (SEQ ID № 39),

более предпочтительно, с помощью

(i) маркеров *sxh2499s01* (SEQ ID № 35) и *s3p4348s01* (SEQ ID № 27), и/или

(ii) маркеров *sxi0698s01* (SEQ ID № 36) и *s3p4348s01* (SEQ ID № 27), и/или

(iii) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *sxe7357s01* (SEQ ID № 38), и/или

(iv) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *sxh8485s01* (SEQ ID № 37), и/или

(v) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e5853s01* (SEQ ID № 26), и/или

(vi) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e5800s01* (SEQ ID № 32), и/или

(vii) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e4913xxx* (SEQ ID № 31), и/или

(viii) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e5782s01* (SEQ ID № 30).

Расположение маркеров показано на фигуре 7.

Способ по настоящему изобретению, применяемый для идентификации растения вида *Beta vulgaris*, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функциональный ген реморина, которое способно проявлять устойчивость к BNYVV, опосредованную геном Rz2, если он присутствует в геноме растения, может дополнительно включать обнаружение присутствия и/или экспрессии гена Rz2 или присутствия полипептида, кодируемого геном Rz2, в растении, его части или его семени; и/или обнаружение по меньшей мере одного маркерного локуса в гене Rz2 или в одной или нескольких областях, косегрегационных с геном Rz2, предпочтительно косегрегированных с хромосомным интервалом, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функциональный ген реморина, и ген Rz2. Соответственно, идентифицированное и, необязательно, выбранное растение, его часть или его семя содержит указанную молекулу нуклеиновой кислоты и ген Rz2.

В предпочтительном варианте осуществления указанного способа по меньшей мере один маркерный локус в нуклеотидной последовательности гена Rz2 обнаруживается с помощью маркера *s3e5853s01* (SEQ ID № 26) и при этом одна или несколько областей, косегрегированных с геном Rz2, представляют собой геномные интервалы в *Beta vulgaris* на хромосоме 3, которые включают и фланкированы маркерными локусами, обнаруживаемыми с помощью

(i) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e5853s01* (SEQ ID № 26), и/или

(ii) маркеров *s3e5853s01* (SEQ ID № 26) и *s3e2247xxx* (SEQ ID № 40),

предпочтительно, с помощью

(i) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e5853s01* (SEQ ID № 26), и/или

(ii) маркеров *s3e5853s01* (SEQ ID № 26) и *sxn1017s02* (SEQ ID № 39),

более предпочтительно, с помощью

- (i) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e5853s01* (SEQ ID № 26), и/или
- (ii) маркеров *s3e5853s01* (SEQ ID № 33) и *sxe7357s01* (SEQ ID № 38), и/или
- (iii) маркеров *s3e5853s01* (SEQ ID № 26) и *sxh8485s01* (SEQ ID № 37).

В альтернативном предпочтительном варианте осуществления указанного способа в одной или нескольких областях, косегрегированных с хромосомным интервалом, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функциональный ген реморина, и ген Rz2, являются геномными интервалами в *Beta vulgaris* на хромосоме 3, которые содержат и фланкированы маркерными локусами, обнаруживаемыми с помощью

- (i) маркеров *s3e5985s01* (SEQ ID № 33) и *s3p4348s01* (SEQ ID № 27), и/или
 - (ii) маркеров *s3e5853s01* (SEQ ID № 26) и *s3e2247xxx* (SEQ ID № 40),
- предпочтительно, с помощью

- (i) маркеров *sxh1002s02* (SEQ ID № 34) и *s3p4348s01* (SEQ ID № 27), и/или
 - (ii) маркеров *s3e5853s01* (SEQ ID № 26) и *sxn1017s02* (SEQ ID № 39),
- более предпочтительно, с помощью

- (i) маркеров *sxh2499s01* (SEQ ID № 35) и *s3p4348s01* (SEQ ID № 27), и/или
- (ii) маркеров *sxi0698s01* (SEQ ID № 36) и *s3p4348s01* (SEQ ID № 27), и/или
- (iii) маркеров *s3e5853s01* (SEQ ID № 26) и *sxe7357s01* (SEQ ID № 38), и/или
- (iv) маркеров *s3e5853s01* (SEQ ID № 26) и *sxh8485s01* (SEQ ID № 37).

Олигонуклеотиды или пары олигонуклеотидов по настоящему изобретению применяются для идентификации и/или выбора растения вида *Beta vulgaris*, способного проявлять устойчивость к BNYVV, опосредованную Rz2, если он присутствует в геноме растения, или нарушении устойчивости к BNYVV, опосредованной Rz2, если он присутствует в геноме растения.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к маркерному чипу («ДНК-чипу», или микроматрице), который содержит по меньшей мере один олигонуклеотид по настоящему изобретению, приемлемый для обнаружения. Маркерный чип приемлем для применения в одном или нескольких способах обнаружения по настоящему изобретению.

Изобретение также включает способ получения белка по настоящему изобретению. Способ включает получение или культивирование культуры клеток, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функциональный и нефункциональный ген реморина соответственно, и последующую экспрессию соответствующего белка.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к устойчивому к BNYVV растению или его части, которые были идентифицированы и, если применимо, отобраны с

помощью описанного выше способа. В частности, настоящее изобретение относится к популяции растений, включающей растения, доступные в соответствии с одним из способов изобретения, как описано выше, и которые предпочтительно устойчивы к ризомании, т. е. к заражению BNYVV, и характеризуются наличием молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая участвует в придании Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV, т. е. функционального гена реморина. Популяция предпочтительно имеет по меньшей мере 10, предпочтительно по меньшей мере 50, более предпочтительно по меньшей мере 100, особенно предпочтительно по меньшей мере 500 и, в частности, в сельском хозяйстве предпочтительно по меньшей мере 1000 растений. Доля растений в популяции, которые не несут указанную молекулу нуклеиновой кислоты, действительно несут молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая препятствует устойчивости к BNYVV, т. е. нефункциональный реморин, и/или чувствительны к BNYVV, предпочтительно составляет менее 25%, предпочтительно менее 20%, более предпочтительно менее 15%, еще более предпочтительно 10% и, в частности, предпочтительно менее 5%, если они вообще присутствуют.

Следующие преимущества для селекции и развития новых устойчивых линий растений рода *Beta* также могут быть достигнуты с помощью настоящего изобретения. Информация о последовательности, а также идентифицированные полиморфизмы, позволяющие различать функциональные и нефункциональные варианты раскрытого гена, т. е. между аллелями, участвующими в Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV, и аллелями, препятствующими указанной устойчивости, позволяют непосредственно разрабатывать маркер в гене, как это описано выше, а также в областях перед и после, что представляет собой важное улучшение для селекционера растений, в частности в отношении развития оптимизированных элитных линий без «торможения связи». Кроме того, сведения о последовательной структуре можно применять, например, для идентификации дополнительных реморинов или реморин-подобных генов, которые являются гомологичными или ортологичными.

Следовательно, настоящее изобретение также включает способ идентификации дополнительных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды или дополнительные белки, участвующие в Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV в растении, в котором экспрессируется полипептид. Таким образом, специалист в данной области техники может применять базы данных, применяя подходящие профили поиска и компьютерные программы для скрининга гомологичных последовательностей или для сравнения последовательностей. Кроме того, с помощью обычных методов молекулярной биологии специалист в данной области техники может сам получить дополнительные

последовательности ДНК, кодирующие белки реморина, и применять их в рамках настоящего изобретения. Например, приемлемые гибридизационные зонды могут быть получены из последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и применяться для скрининга геномных банков и/или банков кДНК желаемого организма. Здесь специалист в данной области техники может прибегнуть к обычным способам гибридизации, клонирования и секвенирования, которые перечислены, например, Сембрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001). Применяя известные последовательности, специалист в данной области техники также может синтезировать и применять олигонуклеотидные праймеры для амплификации последовательностей молекул нуклеиновых кислот, участвующих в устойчивости Rz2, молекул нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды, или дополнительных белков, которые участвуют в устойчивости к BNYVV в растении, или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей другие или новые аллели реморина.

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ идентификации молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, который участвует в придании устойчивости к BNYVV у растения вида *Beta vulgaris*, в котором экспрессируется полипептид. Таким образом, способ включает сравнение аминокислотной последовательности полипептида по настоящему изобретению с аминокислотными последовательностями из базы данных последовательностей или с последовательностями аллельных вариантов полипептида по настоящему изобретению в генотипах вида *Beta vulgaris*. Кроме того, способ по настоящему изобретению включает идентификацию аминокислотной последовательности или аллельного варианта, который по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности полипептида по настоящему изобретению, а также введение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей идентифицированную аминокислотную последовательность или аллельный вариант в растении вида *Beta vulgaris*, содержащий ген устойчивости Rz2; экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в указанном растении; и, необязательно, последующую проверку устойчивости к BNYVV.

Как описано выше, дополнительные белки, участвующие в Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV, или их кодирующие гены, т. е. гомологи, аналоги и ортологи, которые составляют по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, особенно предпочтительно по меньшей мере 90%, особенно предпочтительно по меньшей мере 95% или даже 98%, идентичны аминокислотной последовательности полипептида, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, могут быть

идентифицированы с помощью классических биоинформатических подходов (поиск в базе данных и компьютерные программы для скрининга гомологичных последовательностей).

Термин «гомолог(и)», таким образом, означает, что рассматриваемые гены (из двух разных видов растений) имеют, по существу, одинаковую функцию и общего предка и, следовательно, как правило, проявляют значительную идентичность в своих последовательностях нуклеиновых кислот или кодируемых аминокислот. Тем не менее также существует много генов, гомологичных друг другу, без белковых последовательностей, приводящих к значимому парному выравниванию. В отличие от этого, термин «аналог(и)» описывает гены или белки, которые (аналогично) имеют идентичную или аналогичную функцию, но не созданы из одной и той же структуры, т. е. не имеют общего предка. В этом случае часто не представляется возможным установить значительную идентичность их нуклеиновой кислоты или кодируемой аминокислотной последовательности или в лучшем случае конкретных функциональных доменов.

В контексте секвенирования генома гомологи для аннотации классифицируются более точно. Для этого были введены термины «ортология» и «паралогия». Ортологи — это гены, связанные через событие видообразования. Паралоги — это гены, которые восходят к событию дублирования.

Ген в основном является гомологом, или аналогом, или ортологом в смысле настоящего изобретения, если он участвует в придании растениям устойчивости к BNYVV, опосредованной Rz2. Для проверки этого применяются способы, которые уже были описаны выше и известны специалисту в данной области техники, например, амплификация идентифицированного гомолога, аналога или ортолога с помощью ПЦР, клонирование в векторах экспрессии, введение в растение-мишень или растительную клетку и проверка устойчивости.

Настоящее изобретение также относится к применению молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функционального аллеля реморина, в генетическом или молекулярном пакете с другими генетическими элементами, которые могут придавать растениям агрономически выгодные свойства. Таким образом, экономическая ценность культурных растений может быть заметно увеличена, например, производительность повышается по сравнению с растениями, которые обладают такой же генетикой, но не имеют указанной молекулы нуклеиновой кислоты или содержат нефункциональный вариант молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В частности, настоящее изобретение относится к применению идентифицированного гена реморина в способах борьбы с заражением патогеном BNYVV в сельскохозяйственном или садовом выращивании растений рода *Beta*, например, включая идентификацию и отбор

растений этого рода *Beta* с помощью одного из способов, описанных выше, и/или культивирования выбранных таким образом растений или их потомков. Таким образом, настоящее изобретение включает способ культивирования растений вида *Beta vulgaris*, включая, на первом этапе, получение устойчивых к BNYVV растений вида *Beta vulgaris* по настоящему изобретению или получение растений вида *Beta vulgaris* с помощью способа производства по настоящему изобретению, или идентификация и отбор растений вида *Beta vulgaris* с помощью способа идентификации по настоящему изобретению, который был описан выше, при этом получение может включать посадку соответствующих саженцев или посев соответствующих семян по настоящему изобретению; и включая, на втором этапе, выращивание растений с первого этапа, или размещение семенного фонда растений с первого этапа, или выращивание растений с первого этапа. Таким образом, способ культивирования противодействует заражению BNYVV культурных растений. Способ выращивания может быть частью способа производства сахара. Способ производства сахара включает этапы способа выращивания и, кроме того, в качестве предпоследнего этапа сбор культурных растений и в качестве последнего этапа экстракцию сахара из вышеупомянутых растений.

Способ выращивания также может быть частью способа получения семенного материала. Способ производства семенного материала включает этапы способа выращивания и, кроме того, в качестве предпоследнего этапа яровизацию культурных растений и в качестве последнего этапа экстракцию семян из вышеупомянутых растений.

Экстрагированные семена можно, необязательно, гранулировать для получения гранулированного посевного материала вида *Beta vulgaris*. В данном случае это способ производства гранулированного семенного материала. Кроме того, способ производства семенного материала может быть разработан как способ производства устойчивого к BNYVV семенного материала. Способ производства устойчивого к BNYVV посевного материала включает этапы описанного выше способа получения посевного материала и, кроме того, в качестве последнего этапа проверку нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, т. е. функционального гена реморина в соответствии со способом, описанным здесь, по меньшей мере в одном из экстрагированных семян, предпочтительно по меньшей мере в 0,1% или по меньшей мере в 1% экстрагированных семян. Особенно предпочтительно проверку осуществлять так, чтобы семена оставались всхожими. Это означает, что выделение ДНК, необходимой для проверки из семян, не нейтрализует всхожесть семян. В таком случае проверка нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могла иметь место в особенно большой части всех экстрагированных семян. Например, проверка может происходить по меньшей мере в 2% — предпочтительно по

меньшей мере 3%, особенно предпочтительно по меньшей мере 4% всех экстрагированных семян.

Растения по настоящему изобретению, их клетки или семена либо посевной материал по настоящему изобретению могут обладать дополнительными агрономически выгодными свойствами или иметь таковые. Одним из примеров является толерантность или устойчивость к гербицидам, таким как глифосат, глюфосинат или ингибиторы ALS. Предпочтительна толерантность к глифосату или гербициду-ингибитору ALS. Конкретный вариант устойчивости к глифосату раскрыт в US 7,335,816 B2. Такая устойчивость к глифосату, например, доступна из семян, хранящихся в NCIMB, Абердин (Шотландия, Великобритания) под номером доступа NCIMB 41158 или NCIMB 41159. Такие семена можно применять для получения устойчивых к глифосату растений сахарной свеклы. Устойчивость к глифосату также может быть введена другим видам рода *Beta* путем скрещивания.

Конкретный вариант осуществления устойчивости к гербициду к ингибитору ALS раскрыт в документе WO2012/049268 A1. Например, такая устойчивость к гербициду, ингибирующему ALS, доступна на депозите NCIMB, Абердин, Великобритания, под номером NCIMB 41705. Кроме того, такая устойчивость к ингибитору ALS может быть получена посредством метода TILLING или сайт-направленного мутагенеза, напр. посредством редактирования генов, напр. посредством применения CRISPR/Cas, CRISPR/Cpf1, TALENS или цинк-пальцевых нуклеаз. Многочисленные дополнительные гербициды и их применимость известны специалисту из уровня техники. Он может обратиться к известному уровню техники для получения информации о том, какие генетические элементы и каким образом следует применять для реализации соответствующей толерантности у растений.

Другими примерами агрономически выгодных свойств являются дополнительная устойчивость к патогенам, при этом патогены могут быть среди других насекомых, вирусов, нематод, бактерий или грибов, морозостойкость или холодостойкость, а также эффективность применения воды, эффективность применения азота и урожайность. Здесь специалист в данной области техники может также обратиться к известному уровню техники для обнаружения подходящих генетических элементов.

Помимо отношения к растению по настоящему изобретению, настоящее изобретение также относится к семенам или потомкам, или к органу, части растения, ткани или его клетке при производстве продуктов, которые, как правило, производятся из экологически чистого сырья, напр. продуктов питания и корма для животных, предпочтительно сахара или сиропа (мелассы), при этом меласса также применяется для

промышленного применения, напр. в производстве алкоголя или в качестве среды для производства биотехнологических продуктов, при производстве материалов или веществ для химической промышленности, напр. очищенных химических веществ, фармацевтических препаратов или их прекурсоров, средств диагностики, косметических средств, биоэтанола или биогаза. Пример применения сахарной свеклы в качестве биогенного сырья на биогазовых установках описан в заявке DE 10 2012 022 178 A1; см., например, параграф 10.

Указанные ниже примеры объясняют изобретение, но не ограничивают предмет изобретения. Если не указано иное, применялись стандартные методы молекулярной биологии; см., например, Сембрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001, Фритш *и соавт.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989; Майер *и др.*, Иммунохимические методы в клеточной и молекулярной биологии, ред., Academic Press, London, 1987, и Вейр *и соавт.*, Справочник по экспериментальной иммунологии, тома I-IV, Blackwell, eds., 1986.

Некоторые из наиболее важных последовательностей по настоящему изобретению подробно объясняются ниже:

SEQ ID № 2 — геномная последовательность нефункционального гена реморина (гаплотип 1)

SEQ ID № 3 — открытая рамка считывания нефункционального гена реморина (гаплотип 1)

SEQ ID № 4 — аминокислотная последовательность нефункционального полипептида реморина (гаплотип 1)

SEQ ID № 6 — геномная последовательность функционального гена реморина (гаплотип 2)

SEQ ID № 7 — открытая рамка считывания функционального гена реморина (гаплотип 2)

SEQ ID № 8 — аминокислотная последовательность функционального полипептида реморина (гаплотип 2)

SEQ ID № 10 — геномная последовательность функционального гена реморина (гаплотип 3)

SEQ ID № 11 — открытая рамка считывания функционального гена реморина (гаплотип 3)

SEQ ID № 12 — аминокислотная последовательность функционального полипептида реморина (гаплотип 3)

SEQ ID № 14 — геномная последовательность функционального гена реморина (гаплотип 4)

SEQ ID № 15 — открытая рамка считывания функционального гена реморина (гаплотип 4)

SEQ ID № 16 — аминокислотная последовательность функционального полипептида реморина (гаплотип 4)

SEQ ID № 18 — геномная последовательность функционального гена реморина (гаплотип 5)

SEQ ID № 19 — открытая рамка считывания функционального гена реморина (гаплотип 5)

SEQ ID № 20 — аминокислотная последовательность функционального полипептида реморина (гаплотип 5)

SEQ ID № 51 — нуклеотидная последовательность, кодирующая Rz2

SEQ ID № 52 — аминокислотная последовательность Rz2, вариант А

SEQ ID № 53 — аминокислотная последовательность Rz2, вариант В

SEQ ID № 54 — нуклеотидная последовательность, включая функциональный ген реморина (гаплотип 5), фланкирующие области и Rz2

SEQ ID № 55 — нуклеотидная последовательность, включая нефункциональный ген реморина (гаплотип 1), фланкирующие области и Rz2

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Идентификация и генетическое картирование гена, участвующего в Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV, т. е. функционального гена реморина, а также варианта, препятствующего указанной устойчивости, т. е. нефункционального гена реморина.

Для локализации нефункционального гена реморина, который ведет, после экспрессии соответствующего полипептида, к подавлению Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV у растений вида *Beta vulgaris*, было выполнено генетическое картирование. Для этой цели были скрещены две линии *Beta vulgaris*, содержащие аллель устойчивости Rz2, при этом одна родительская линия содержала нефункциональный ген реморина, а вторая родительская линия была устойчивой к ризомании. Затем интересующий ген мог быть генетически локализован в популяции потомства возле локуса Rz2. Тем не менее в этой области все еще было слишком много генов для точного указания конкретного кандидата.

Параллельно с генетическим картированием были проанализированы профили молекулярных маркеров в мультигенном селекционном материале. Были самоопылены пять генотипов с рекомбинацией между геном Rz2 и предсказанным локусом, содержащим нефункциональный ген реморина. Данные по фенотипической устойчивости были собраны с 20 растений потомства. Был проведен дисперсионный анализ и определены маркеры. Маркер *s3e5798s01* (аллель X: A, аллель Y: G; праймерный аллель X (SEQ ID №: 24), праймерный аллель Y (SEQ ID №: 25)) продемонстрировали наиболее достоверные доказательства позиционирования гена реморина. Генетическое положение маркера равно 40,99598509 сМ на хромосоме 3-й генетической карты. Физическое положение подлежащего SNP на эталонной последовательности (SBKv7) равно 8 887 000 п.о. на хромосоме 3.

Таким образом, этот маркер генетически расположен всего на 0,75 сМ и физически на расстоянии около 381 т.п.о. от гена устойчивости RZ-2, обнаруживаемого, например, маркером *s3e5853s01* (SEQ ID №: 26) в генетической позиции 41,7471132 сМ на хромосоме 3 (физическое положение: 9,268,704 п.о.).

Анализ эталонной последовательности для этой области показал, что маркер *s3e5798s01* (SEQ ID № 24 и 25) расположен в модели аннотированного гена (g23238.t1), где ген содержит домен реморина (С-концевую область).

Кроме того, было выполнено тонкое генетическое картирование для лучшего определения интересующей области. В частности, был проведен поиск рекомбинантов, демонстрирующих различные комбинации аллелей Rz2 (устойчивость к BNYPV) и реморина (наличие нефункционального аллеля — да (A) / нет (B); фигура 8). Для этого 2730 растений делящейся популяции анализировали маркерами. Между геном Rz2 и идентифицированным геном реморина есть достаточно генетических маркеров для надежной идентификации таких рекомбинантов; см. фигуру 8. Затем эти рекомбинанты снова проверяли в испытании на устойчивость: В испытании потомства генотипы в положениях Н (= гетерозиготные по нефункциональному аллелю) делятся 1:2:1 (A:H:B). Потомки А и В проверяются в качестве контрастов в испытании устойчивости.

Пример 2: Функциональная валидация гена реморина

Выполняются несколько вариантов анализов транзientной экспрессии для функционального анализа, предпочтительно на ткани листа. Они основаны на анализе транзientной экспрессии генов испытательных конструкций (например, плазмид, в которых проверяемые гены находятся под контролем экспрессии промотора, активного в растениях) и последующем измерении гиперчувствительного ответа (реакции гибели

клеток) в качестве представителя для запуска резистентных реакций. Для переноса испытательных конструкций в ткань растения применяют, например, бомбардировку частицами или локальную трансформацию посредством инфильтрации *Agrobacterium*. Реакции гибели клеток можно измерить визуально (разрушение клеток, пожелтение, флуоресценция в УФ-свете) или путем измерения активности репортерного гена котрансформированного репортерного гена (например, люциферазы). Снижение активности репортерного гена коррелирует с повышенной активностью гибели клеток.

Аналитическая система 1: Сравнение реакции гибели клеток после экспрессии гена TGB1 в двух генотипах, содержащих аллель устойчивости Rz2 (фигура 4)

Оба испытанных генотипа содержат аллель устойчивости Rz2. Генотип 1 содержит функциональный аллель реморина, генотип 2 содержит нефункциональный аллель реморина. После переноса гена TGB1 *вируса некротической желтой прожилки свеклы* (BNYVV) (SEQ ID №: 41, 42) или гомологичных генов TGB1, например из *вируса мозаики свеклы, передающегося через почву* (SEQ ID №: 43; Ветцель и Варрельманн (2018)) на два генотипа, реакцию гибели клеток можно измерить в генотипе 1. В генотипе 2 не происходит соответствующей реакции гибели клеток или ее экспрессия значительно снижена по сравнению с генотипом 1.

Это испытание также можно применять для скрининга новых генотипов на функциональные аллели или комбинации аллелей Rz2 и реморина. Оно также потенциально подходит для скрининга генотипов, имеющих другие гены, препятствующие Rz2-опосредованной устойчивости к BNYVV.

Аналитическая система 2: Сравнение реакции гибели клеток после экспрессии гена TGB1 и генов реморина в генотипах, содержащих аллель устойчивости Rz2 (фигура 5)

Для анализа применяют генотип, содержащий аллель устойчивости Rz2 и функциональный аллель реморина. В этом генотипе TGB1 временно экспрессируется в сочетании с нефункциональным аллелем реморина. Для сравнения, выполняется временная экспрессия TGB1 в сочетании с контролем пустого вектора или временная экспрессия TGB1 в сочетании с функциональным аллелем реморина. В последних двух комбинациях можно измерить запуск клеточной смерти. Для сравнения, степень запуска гибели клеток для комбинации TGB1 и нефункционального аллеля реморина снижена или отсутствует вовсе.

Эти результаты демонстрируют, что нефункциональный аллель реморина доминирует над функциональным аллелем реморина. Доминантный означает, что даже в

гетерозиготном состоянии (нефункциональный аллель на одном наборе хромосом / функциональный аллель реморина на другом наборе хромосом) он проявляет свой полный эффект, т. е. нефункциональный аллель в любом случае подавляет или предотвращает развитие устойчивости. Наоборот, это означает, что Rz2 может проявлять свой эффект устойчивости только в том случае, если функциональный ген реморина является гомозиготным.

Аналитическая система 3: Сравнение реакции гибели клеток после экспрессии гена TGB1 с комбинациями аллелей реморина и Rz2 (фигура 6)

Временная экспрессия TGB1, Rz2 и функционального или нефункционального аллеля реморина может иметь место в генотипе без Rz2 или в альтернативных тест-системах, таких как виды *Nicotiana*. При применении функционального реморина можно измерить более высокий уровень гибели клеток по сравнению с применением нефункционального реморина.

Испытание также можно проводить в модифицированной форме для сравнения генотипов с аллельными вариациями реморина или Rz2. Испытательная конструкция с соответствующим исследуемым геном не подвергается временной экспрессии, только другие компоненты экспрессируются временно. Выражение реакции гибели клеток можно применять в качестве критерия функциональности переменных аллелей.

Пример 3: Доказательство взаимодействия между полипептидом, кодируемым Rz2, и полипептидом, кодируемым TGB1 у *Nicotiana benthamiana*

Для доказательства взаимодействия между полипептидом Rz2 и вирусным полипептидом TGB1 были выбраны подходы к инфильтрации. Была выполнена инфильтрация в два листа на растение.

Материал

1) Конструкции

Были предоставлены следующие конструкции:

<u>Конструкция</u>	<u>Описание</u>
<u>pZFN-nptII-70S-Rz-2_C48</u>	<u>содержит ген устойчивости</u> <u>Rz2</u>
<u>FDC173 — pZFN-nptII-70S-TGB1_BNYVV</u>	<u>содержит ген TGB1 из</u> <u>BNYVV</u>
<u>pZFN-nptII-70S-Rz-2_C48_D491V</u>	<u>позитивная регуляция</u>

pZFN-nptII-GG4 90-70S 4	пустой вектор
-------------------------	---------------

2) Растительный материал

В качестве растительного материала представлены растения *Nicotiana benthamiana* в возрасте от четырех до пяти недель после прорастания.

3) Среда инфильтрации

Предоставлено 100 мл среды инфильтрации в результате выполнения следующих этапов: 100 mM раствора $MgCl_2$ было смешано с 0,5 M MES/KOH pH 5,6, а также с 0,05 M ацетосирингона, а затем конечный объем был доведен до 100 мл путем добавления стерильной H_2O .

Этапы способа

— Было предоставлено несколько культур *Agrobacterium tumefaciens*, содержащих перечисленные выше конструкции. Каждая культура в среде Лурия — Бертани имела объем 3 мл. Антибиотики были добавлены в зависимости от устойчивости, кодируемой указанными выше конструкциями, выбранными из группы, состоящей из рифампицина, спектиномицина, гентамицина и канамицина. Инкубацию проводили в течение ночи при 28 °C в шейкере с частотой вращения 180 об./мин.

— Через 18 часов для каждой культуры определяли значение OD_{600} . Каждую жидкую культуру центрифугировали в течение 15 минут при 2500 g и комнатной температуре. Осадок ресуспендировали в среде Лурия — Бертани без антибиотиков. Объем был отрегулирован до значения OD, необходимого для инфильтрации: 1.

— После ресуспендирования культуру снова инкубировали при 28 °C в шейкере при 180 об./мин в течение 1 часа. После этого культуру центрифугировали, как это описано выше, и осадок ресуспендировали в среде инфильтрации (состав этой среды указан выше). Объем был отрегулирован до значения OD, необходимого для инфильтрации: 1:1 для каждой из следующих комбинаций: Rz-2_C48 + пустой вектор; Rz-2_C48 + BNYVV_TGB1; пустой вектор + BNYVV_TGB1.

— Бактериальная суспензия выдерживалась 2 часа при комнатной температуре. Впоследствии различные бактериальные суспензии были смешаны в приемлемом для инфильтрации соотношении: 1:1. Инфильтрация была произведена с помощью инсулинового шприца объемом 1 мл на нижней стороне листа. Место инфильтрации, а также инфильтрованный лист были помечены.

— После инфильтрации растения поместили на ночь при комнатной температуре в темноте. После этого зараженные растения инкубировали в климатическом шкафу. В течение каждого дня применяли 16 часов света при 22 °С и 8 часов темноты при 19 °С.

Результаты

Результаты показаны на фиг. 9. В то время как комбинация пустых векторов Rz2_C48 + и комбинация пустых векторов BNYVV_TGB1 + не приводят к изменению цвета инфильтрированного пятна, комбинация Rz2_C48 + BNYVV_TGB1 приводит к изменению цвета инфильтрированного пятна из-за некроза. Некроз демонстрирует, что защитный механизм растений был активирован из-за запуска реакции устойчивости.

Пример 4: Доказательство взаимодействия между полипептидом, кодируемым Rz2, и полипептидом, кодируемым TGB1, в сахарной свекле

Листовые диски сорта сахарной свеклы *Danicia* были временно трансформированы с помощью бомбардировки частицами с различными комбинациями конструкций. После этого в белковом экстракте определяли активность репортерной протеин-люциферазы. Можно было увидеть, что комбинация Rz2_C48 с BNYVV_TGB1 запускает иммунный ответ, сопровождающийся гибелью клеток и снижением активности репортерного белка люциферазы. Трансформация только Rz2_C48 или трансформация только BNYVV-TGB1 не вызвала такой реакции, что следует интерпретировать как свидетельство того, что такого единственного компонента недостаточно для запуска иммунного ответа. Тем не менее сочетание обоих факторов допускает взаимодействие и инициирует реакцию устойчивости. Результаты показаны на фиг. 10.

Пример 5: Доказательство белкового взаимодействия между BNYVV_TGB1 и g23238_Remorin

Были предоставлены плазмиды для комплементации бимолекулярной флуоресценции (BiFC). Эти плазмиды кодировали слитые белки с расщепленными частями флуоресцентного белка Venus. Можно было наблюдать сигналы флуоресценции после коэкспрессии конструкций BNYVV-TGB1 в сочетании с конструкциями, содержащими аллель, кодирующий функциональный вариант реморина *Nicotiana benthamiana*. Этот сигнал флуоресценции не наблюдался после экспрессии какой-либо из двух индивидуальных конструкций. Полученные данные подтверждают химическое взаимодействие между функциональным вариантом реморина и вирусным белком TGB1.

Этот эксперимент указывает на белок-белковое взаимодействие между g23238_Remorin и BNYVV_TGB1, вирусным белком, который активирует устойчивость Rz2_C48. Этот результат подтверждает данные об участии g23238_Remorin в обнаружении BNYVV_TGB1 с помощью Rz2_C48.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, участвующий в устойчивости к *вирусу некротической желтой прожилки свеклы* (BNYVV), опосредованной геном устойчивости Rz2 в растении, в котором экспрессируется полипептид, при этом молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

(a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID № 45;

(b) нуклеотидной последовательности, которая содержит кодирующую последовательность ДНК согласно SEQ ID № 44;

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

(d) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, который, посредством замены, делеции и/или добавления одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности, отличается от полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью согласно (a) или (b);

(e) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 70% идентична аминокислотной последовательности согласно SEQ ID № 45; и

(f) нуклеотидной последовательности, содержащей кодирующую последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности ДНК согласно SEQ ID № 44,

при этом аминокислотная последовательность кодируемого полипептида содержит пролин (P) в положении 25 в отношении SEQ ID № 45, пролин (P) в положении 72 в отношении SEQ ID № 45 или валин (V) в положении 186 в отношении SEQ ID № 45, или

нуклеиновая кислота кодирующей последовательности ДНК имеет цитозин (c) в положении 73 в отношении SEQ ID № 44, цитозин (c) в положении 214 в отношении SEQ ID № 44 или гуанин (g) в положении 556 в отношении SEQ ID № 44, предпочтительно при этом полипептид имеет аминокислотную последовательность SEQ ID № 8, 12, 16 или 20 или нуклеотидная последовательность, кодирующая указанный полипептид, представляет собой SEQ ID № 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18 или 19, или кодирующая последовательность ДНК представляет собой нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID № 7, 11, 15 или 19.

2. Молекула нуклеиновой кислоты, которая специфически гибридизуется с молекулой нуклеиновой кислоты по пункту 1 и кодирует нефункциональный аллель полипептида, препятствующий устойчивости к BNYVV, опосредованной геном устойчивости Rz2, в растении, в котором экспрессируется полипептид, при этом молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из

(а) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID № 4, или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична SEQ ID № 4, при этом полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну аминокислотную замену из-за одной или нескольких мутаций в нуклеотидной последовательности, предпочтительно при этом пролин (P) в положении 25 в отношении SEQ ID № 45, пролин (P) в положении 72 в отношении SEQ ID № 45, и/или валин (V) в положении 186 в отношении SEQ ID № 45 заменен другой аминокислотой, предпочтительно при этом пролин (P) в положении 25 заменен аланином (A), пролин (P) в положении 72 заменен треонином (T) и/или валин (V) в положении 186 заменен изолейцином (I); и/или

(b) нуклеотидной последовательности, содержащей кодирующую последовательность ДНК согласно SEQ ID № 3, которая содержит кодирующую последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности ДНК согласно SEQ ID № 3 или которая гибридизуется с комплементарной последовательностью SEQ ID № 3 в жестких условиях, при этом нуклеотидная последовательность содержит по меньшей мере одну замену нуклеиновой кислоты из-за по меньшей мере одной мутации, приводящей к замене аминокислоты, предпочтительно при этом один или несколько нуклеотидов заменены в положениях 73–75 в отношении SEQ ID № 44, в положениях 214–216 в отношении SEQ ID № 44 и/или в положениях 556–558 в отношении SEQ ID № 44, предпочтительно при этом цитозин (с) в положении 73 заменен гуанином (g), цитозин (с) в положении 214 заменен аденином (a) и/или гуанин (g) в положении 556 заменен аденином (a).

3. Полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по п. 1 или п. 2.

4. Вектор или кассета экспрессии, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1 или п. 2, предпочтительно при этом молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с гетерологичным регуляторным элементом.

5. Клетка, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1 или п. 2, полипептид по п. 3 или вектор или кассету экспрессии по п. 4.

6. Растение или его часть, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1 эндогенно или трансгенно либо вектор или кассету экспрессии, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1, как это определено в п. 4 в качестве трансгена, предпочтительно при этом растение дополнительно содержит ген устойчивости Rz2, опосредующий устойчивость к BNYVV эндогенно или трансгенно.

7. Семя или потомок растения по п. 6, при этом семя или потомок содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1 эндогенно или трансгенно, предпочтительно семя технически обработано, при этом техническая обработка выбрана из группы, состоящей из:

- (a) шлифовки,
- (b) протравливания, предпочтительно гранулирования,
- (c) инкрустации и
- (d) окрашивания.

8. Олигонуклеотид или пара олигонуклеотидов из по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20, предпочтительно по меньшей мере 21, 22, 23, 24 или 25, особенно предпочтительно по меньшей мере 30, 35, 40, 45 или 50 и особенно предпочтительно по меньшей мере 100, 200, 300 или 500 нуклеотидов в длину, при этом олигонуклеотид или пара олигонуклеотидов

(i) специфически гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, как определено в любом п. 2;

(ii) специфически гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, как определено в п. 1;

(iii) специфически гибридизуется с участком генома *Beta vulgaris*, который в *Beta vulgaris* косегрегируется с молекулой нуклеиновой кислоты по п. 2 и/или с молекулой нуклеиновой кислоты по п. 2 вместе с геном Rz2; и/или

(iv) специфически гибридизуется с участком генома *Beta vulgaris*, который в *Beta vulgaris* косегрегируется с молекулой нуклеиновой кислоты по п. 1 и/или с молекулой нуклеиновой кислоты по п. 1 вместе с геном Rz2,

предпочтительно при этом олигонуклеотид или пара олигонуклеотидов выбрана из группы, состоящей из SEQ ID №: 24–40.

9. Способ придания, восстановления или повышения устойчивости к BNYVV у растения вида *Beta vulgaris*, содержащего ген устойчивости Rz2, опосредующий устойчивость к BNYVV эндогенно или трансгенно, включающий

(i) интеграцию или интрогрессию молекулы нуклеиновой кислоты по п. 1 посредством гомологически-направленной репарации или гомологичной рекомбинации, предпочтительно с помощью сайт-направленной нуклеазы, в геном по меньшей мере одной клетки растения вида *Beta vulgaris* и, необязательно, регенерации растения из растительной клетки; или

(ii) повышение экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по п. 1 в растении предпочтительно посредством модификации нативного промотора или посредством слияния молекулы нуклеиновой кислоты с гетерологическим промотором, который проявляет более высокую активность по сравнению с нативным промотором — в частности после инфицирования BNYVV; или

(iii) повышение активности и/или стабильности функционального аллеля полипептида, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты по п. 1, как определено в п. 3, посредством модификации нуклеотидной последовательности по п. 1;

(iv) трансформацию растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты по п. 1, или вектором, или кассетой экспрессии, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1, как это определено в п. 4 и, необязательно, регенерацию трансгенного растения из трансформированной растительной клетки; или

(v) мутагенез растения или растительных клеток, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты по п. 2, и скрининг/отбор растений или растительных клеток, соответственно, в которых функциональный аллель полипептида, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты по п. 1, восстановлен и/или в которых отменена экспрессия нефункционального полипептида.

10. Способ получения BNYVV-устойчивого растения, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1, включающий

(I) получение растения рода *Beta* или растительной клетки рода *Beta*, содержащей ген устойчивости Rz2, опосредующий устойчивость к BNYVV эндогенно или трансгенно; и

(IIa) трансформацию растительной клетки (I) молекулой нуклеиновой кислоты по п. 1, или вектором, или кассетой экспрессии, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1, как это определено в п. 4; и

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

(IIIa) введение сайт-направленной нуклеазы или нуклеазы и, необязательно, репарационной матрицы или сайт-направленного редактора оснований в клетку растения, при этом сайт-направленная нуклеаза способна генерировать по меньшей мере один одноцепочечный разрыв ДНК или по меньшей мере один двухцепочечный разрыв ДНК в заданном месте в геноме клетки, а матрица репарации содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1, или при этом сайт-направленный редактор оснований способен генерировать по меньшей мере один одноцепочечный разрыв ДНК в заданном месте генома клетки и преобразовывать по меньшей мере одно азотистое основание; и,

(IIIb) необязательно, культивирование клетки из (IIIa) в условиях, которые позволяют модифицировать геном в заданном месте, выбранном из

- a) замены по меньшей мере одного нуклеотида;
- b) делеции по меньшей мере одного нуклеотида;
- c) вставки по меньшей мере одного нуклеотида;
- d) любой комбинации a) — c),

необязательно, путем гомологически направленной репарации или гомологичной рекомбинации,

при этом молекула нуклеиновой кислоты интегрирована в геном растения; и

(IIIc) регенерацию растения из клетки, модифицированной в (IIIb);

предпочтительно при этом заданное местоположение находится в молекуле нуклеиновой кислоты по п. 2 или в положении, которое находится не более чем на 10.000 пар оснований перед или после молекулы нуклеиновой кислоты по п. 2; или

(IVa) скрещивание растения (I) с растением по п. 6; и

(IVb) идентификацию и отбор растения, содержащего ген устойчивости Rz2, опосредующий BNYVV эндогенно или трансгенно, и молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1, эндогенно или трансгенно, при этом ген устойчивости Rz2 и/или молекула нуклеиновой кислоты по п. 1 гомозиготно присутствует в геноме растения.

11. Способ идентификации растения вида *Beta vulgaris*, его части или его семени, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1, при этом растение способно проявлять устойчивость к BNYVV, опосредованную Rz2, если он присутствует в геноме растения, содержащий

(i) обнаружение присутствия и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по п. 1, или присутствия полипептида, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты по п. 1, как это определено в п. 3, в растении, его части или его семени; и/или

(ii) обнаружение по меньшей мере одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по п. 1 или в одной или нескольких ее косегрегационных областях, предпочтительно при этом обнаружение по меньшей мере одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по п. 1 включает применение олигонуклеотида или пары олигонуклеотидов по п. 8 и при этом одна или несколько косегрегационных областей представляют собой геномные интервалы в *Beta vulgaris* на хромосоме 3, которые содержат и фланкированы маркерными локусами, обнаруживаемыми с помощью

(a) маркеров *s3e5985s01* (SEQ ID № 33) и *s3p4348s01* (SEQ ID № 27), и/или

(b) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e2247xxx* (SEQ ID № 40); и

(iii) идентификацию и, необязательно, отбор растения вида *Beta vulgaris*, его части или его семени, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1, которое способно проявлять устойчивость к BNYVV, опосредованную Rz2, если он присутствует в геноме растения, на основании обнаружения (i) и/или (ii).

12. Способ идентификации растения вида *Beta vulgaris*, его части или его семени, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по п. 2, включающий

(i) обнаружение присутствия и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по п. 2, или присутствия полипептида, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты по п. 2, как это определено в п. 3, в растении, его части или его семени; и/или

(ii) обнаружение по меньшей мере одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по п. 2 или в одной или нескольких ее косегрегационных областях, предпочтительно при этом обнаружение по меньшей мере одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по п. 2 содержит применение олигонуклеотида или пары олигонуклеотидов по п. 8 и при этом одна или несколько косегрегационных областей представляют собой геномные интервалы в *Beta vulgaris* на хромосоме 3, которые содержат и фланкированы маркерными локусами, обнаруживаемыми с помощью

(a) маркеров *s3e5985s01* (SEQ ID № 33) и *s3p4348s01* (SEQ ID № 27), и/или
(b) маркеров *s3p4351s01* (SEQ ID № 29) и *s3e2247xxx* (SEQ ID № 40); и
(iii) идентификацию и, необязательно, отбор растения вида *Beta vulgaris*, его части или его семени, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по п. 2, на основании обнаружения (i) и/или (ii).

13. Способ по п. 11, дополнительно включающий

(A) обнаружение присутствия и/или экспрессии гена Rz2 или присутствия полипептида, кодируемого геном Rz2, в растении, его части или его семени; и/или

(B) обнаружение по меньшей мере одного маркерного локуса в гене Rz2 или в одной или нескольких областях, косегрегированных с геном Rz2, предпочтительно косегрегированных с хромосомным интервалом, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1 и ген Rz2;

при этом в (iii) по п. 11 идентифицированное и, необязательно, выбранное растение, его часть или его семя содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1, и ген Rz2, на основании обнаружения (i) и/или (ii) по п. 11 и обнаружения (B).

14. Способ культивации растений вида *Beta vulgaris*, в том числе

(i) посадка саженцев растения по п. 6 или посев семян по п. 7, и

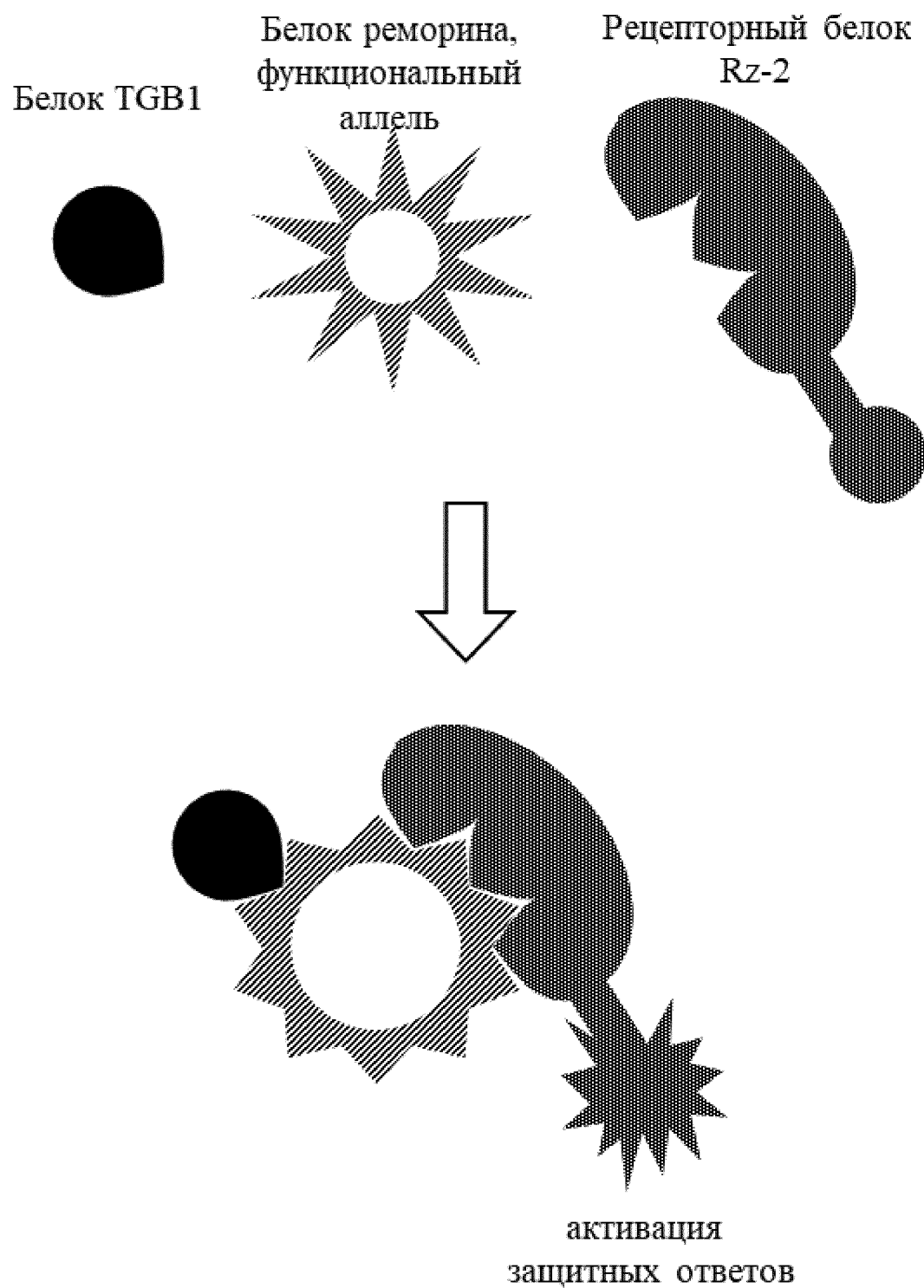
(ii) выращивание растений из саженцев или семян, и,

(iii) необязательно, сбор корнеплодов свеклы выращенных растений;

при этом способ противодействует заражению культивируемых растений BNYVV.

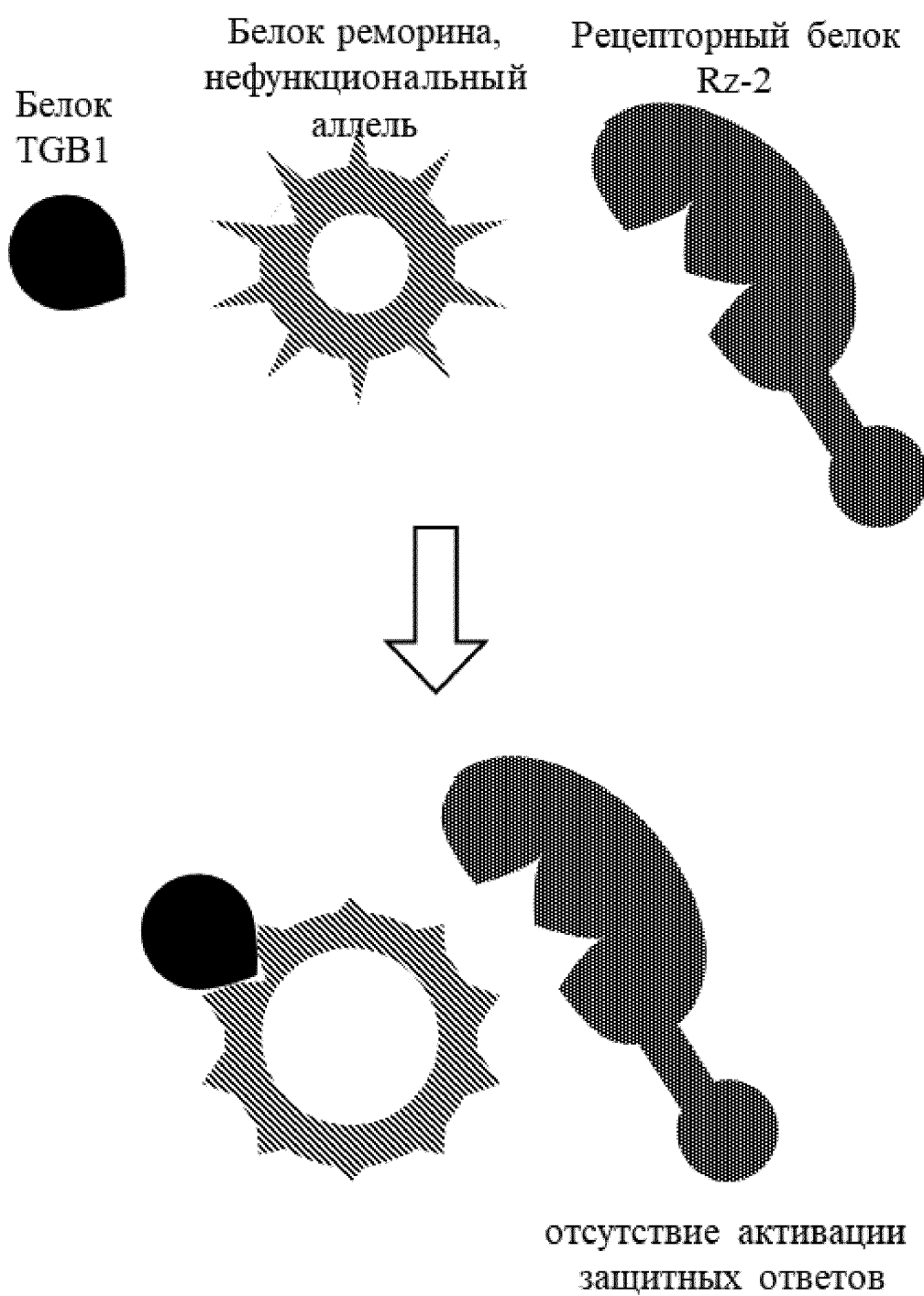
15. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п. 1 или п. 2, полипептида по п. 3 и/или вектора или кассеты экспрессии по п. 4 для получения устойчивых к BNYVV растений, предпочтительно растений вида *Beta vulgaris*, более предпочтительно растений *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *vulgaris*, *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *conditiva*, или *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *crassa/alba*.

A



Фиг. 1

В



Фиг. 1 (продолжение)

g23238.t1-HAP1-ORF	ATGGCAACAGAGGAAGCAAATAAAGTGGTGACTGAAACACCGGCACCACCGGTAACCTCCG	60
g23238.t1-HAP2-ORF	ATGGCAACAGAGGAAGCAAATAAAGTGGTGACTGAAACACCGGCACCACCGGTAACCTCCG	60
g23238.t1-HAP3-ORF	ATGGCAACAGAGGAAGCAAATAAAGTGGTGACTGAAACACCGGCACCACCGGTAACCTCCG	60
g23238.t1-HAP4-ORF	ATGGCAACAGAGGAAGCAAATAAAGTGGTGATTGAAACACCGGCACCACCGGTAACCTCCG	60
g23238.t1-HAP5-ORF	ATGGCAACAGAGGAAGCAAATAAAGTGGTGACTGAAACACCGGCACCACCGGTAACCTCCG	60

g23238.t1-HAP1-ORF	CCACAAGAACCAGCAGCAACAGTTTCGGAACCCGGGAATCACCGGTTGCAGTGGAAGAG	120
g23238.t1-HAP2-ORF	CCGCAAGAACCGCCAGCAACAGTTTCAGAAACCCGGGAATCACCGGTTGCGGTGGAAGAG	120
g23238.t1-HAP3-ORF	CCACAAGAACCGCCAGCAACAGTTTCAGAAACCCGGGAATCACCGGTTGCGGTGGAAGAG	120
g23238.t1-HAP4-ORF	CCGCAAGAACCGCCGGCAACAGTTTCGGAACCCGGGAATCACCGGTTGCGGTGGAAGAG	120
g23238.t1-HAP5-ORF	CCGCAAGAACCGCCAGCAACAGTTTCAGAAACCCGGGAATCACCGGTTGCGGTGGAAGAG	120
	** ***** *	
g23238.t1-HAP1-ORF	AAAAGTTTAGTCCCTGTATCAACCCCTCTTCCTTCCACCACTGAAAAAATCCTGCTTCG	180
g23238.t1-HAP2-ORF	AAAAGTTTAGTCCCTGTATCAACCCCTCTTCCTTCCACCACTGAAAAAATCCTGCTTCG	180
g23238.t1-HAP3-ORF	AAAAGTTTAGTCCCTGTATCAACCCCTCTTCCTTCCACCACTGAAAAAATCCTGCTTCG	180
g23238.t1-HAP4-ORF	AAAAGTTTAGTCCCTGTATCAACCCCTCTTCCTTCCACCACTGAAAAAATCCTGCTTCG	180
g23238.t1-HAP5-ORF	AAAAGTTTAGTCCCTGTATCAACCCCTCTTCCTTCCACCACTGAAAAAATCCTGCTTCG	180

g23238.t1-HAP1-ORF	GTTGAAAAGGTTACAGAATTATCTGAAGAAAAGCACTCTAGAGGAAAAGCCCATAGAGGAG	240
g23238.t1-HAP2-ORF	GTTGAAAAGGTTACAGAATTATCTGAAGAAAAGCCTCTAGAGGAAAAGCCTATAGAGGAG	240
g23238.t1-HAP3-ORF	GTTGAAAAGGTTACAGAATTATCTGAAGAAAAGCCTCTAGAGGAAAAGCCCATAGAGGAG	240
g23238.t1-HAP4-ORF	GTTGAAAAGGTTACAGAATTATCTGAAGAAAAGCCTCTAGAGGAAAAGCCTATAGAGGAG	240
g23238.t1-HAP5-ORF	GTTGAAAAGGTTACAGAATTATCTGAAGAAAAGCCTCTAGAGGAAAAGCCTATAGAGGAG	240

Фиг. 2

g23238.t1-HAP1-ORF	AAGCCTTTAGAGGGCTCAGTTGGTAGAGATGCTCAGCTAGCACGAGTTCAAACCTGAGAAG	300
g23238.t1-HAP2-ORF	AAGCCTTTAGAGGGCTCAGTTGGTAGAGATGCTCAGCTAGCACGAGTTCAAACCTGAGAAG	300
g23238.t1-HAP3-ORF	AAGCCTTTAGAGGGCTCAGTTGGTAGAGATGCTCAGCTAGCACGAGTTCAAACCTGAGAAG	300
g23238.t1-HAP4-ORF	AAGCCTTTAGAGGGCTCAGTTGGTAGAGATGCTCAGCTAGCACGAGTTCAAACCTGAGAAG	300
g23238.t1-HAP5-ORF	AAGCCTTTAGAGGGCTCAGTTGGTAGAGATGCTCAGCTAGCACGAGTTCAAACCTGAGAAG	300

g23238.t1-HAP1-ORF	AGGATTTCACTGATCAAAGCATGGGAAGAAAGTGAAAAATGCAAGGCCGAAAACAAGGCA	360
g23238.t1-HAP2-ORF	AGAATTTCACTGATCAAAGCATGGGAAGAAAGTGAAAAATGCAAGGCCGAAAACAAGGCA	360
g23238.t1-HAP3-ORF	AGGATTTCACTGATCAAAGCATGGGAAGAAAGTGAAAAATGCAAGGCCGAAAACAAGGCA	360
g23238.t1-HAP4-ORF	AGAATTTCACTGATCAAAGCATGGGAAGAAAGTGAAAAATGCAAGGCCGAAAACAAGGCA	360
g23238.t1-HAP5-ORF	AGAATTTCACTGATCAAAGCATGGGAAGAAAGTGAAAAATGCAAGGCCGAAAACAAGGCA	360
	** *****	
g23238.t1-HAP1-ORF	CACAAGAAAATTGCTGCTATCGAGGCATGGGAGAACAGCAAGAAAGCATCTCTTGAGGCA	420
g23238.t1-HAP2-ORF	CACAAGAAAATTGCTGCTATCGAGGCATGGGAGAACAGCAAGAAAGCATCTCTTGAGGCA	420
g23238.t1-HAP3-ORF	CACAAGAAAATTGCTGCTATCGAGGCATGGGAGAACAGCAAGAAAGCATCTCTTGAGGCA	420
g23238.t1-HAP4-ORF	CACAAGAAAATTGCTGCTATCGAGGCATGGGAGAACAGCAAGAAAGCATCTCTTGAGGCA	420
g23238.t1-HAP5-ORF	CACAAGAAAATTGCTGCTATCGAGGCATGGGAGAACAGCAAGAAAGCATCTCTTGAGGCA	420

g23238.t1-HAP1-ORF	GAGCTGAAAAAGATCGAGGAAAGCTTGGAAAAAAGAAGGCAGAATATGCAGAAAAAATG	480
g23238.t1-HAP2-ORF	GAGCTGAAAAAGATCGAGGAAAGCTTGGAAAAAAGAAGGCAGAATATGCAGAAAAAATG	480
g23238.t1-HAP3-ORF	GAGCTGAAAAAGATCGAGGAAAGCTTGGAAAAAAGAAGGCAGAATATGCAGAAAAAATG	480
g23238.t1-HAP4-ORF	GAGCTGAAAAAGATCGAGGAAAGCTTGGAAAAAAGAAGGCAGAATATGCAGAAAAAATG	480
g23238.t1-HAP5-ORF	GAGCTGAAGAAGATCGAGGAAAGCTTGGAAAAAAGAAGGCAGAATATGCAGAAAAAATG	480
	***** *****	

Фиг. 2 (продолжение)

g23238.t1-HAP1-ORF	AAGAACAAAGTGGCTATGACTCACAAAGGAAGCAGAGGAGAAGAAGGCTACGGTTGAAGCC	540
g23238.t1-HAP2-ORF	AAGAACAAAGTGGCTATGACTCACAAAGGAAGCAGAGGAGAAGAAGGCTACGGTTGAAGCC	540
g23238.t1-HAP3-ORF	AAGAACAAAGTGGCTATGACTCACAAAGGAAGCAGAGGAGAAGAAGGCTACGGTTGAAGCC	540
g23238.t1-HAP4-ORF	AAGAACAAAGTGGCTATGACTCACAAAGGAAGCAGAGGAGAAGAAGGCTACGGTTGAAGCC	540
g23238.t1-HAP5-ORF	AAGAACAAAGTGGCTATGACTCACAAAGGAAGCAGAGGAGAAGAAGGCTACGGTTGAAGCC	540

g23238.t1-HAP1-ORF	AAACGTGCTGAAGATATTCTGAAAGCGGAAGAGATGGCTGCTAAGTATCGCGCCACTGGA	600
g23238.t1-HAP2-ORF	AAACGTGCTGAAGATGTTCTGAAAGCGGAAGAGATGGCTGCTAAGTATCGCGCCACTGGA	600
g23238.t1-HAP3-ORF	AAACGTGCTGAAGATGTTCTGAAAGCGGAAGAGATGGCTGCTAAGTATCGCGCCACTGGA	600
g23238.t1-HAP4-ORF	AAACGTGCTGAAGATGTTCTGAAAGCGGAAGAGATGGCTGCTAAGTATCGCGCCACTGGA	600
g23238.t1-HAP5-ORF	AAACGTGCTGAAGATGTTCTGAAAGCGGAAGAGATGGCTGCTAAGTATCGCGCCACTGGA	600

g23238.t1-HAP1-ORF	AAGCCCCCAAGAACTTCTTGGTTTGTTC TAATAA	636
g23238.t1-HAP2-ORF	AAGCCCCCAAGAACTTCTTGGTTTGTTC TAATAA	636
g23238.t1-HAP3-ORF	AAGCCCCCAAGAACTTCTTGGTTTGTTC TAATAA	636
g23238.t1-HAP4-ORF	AAGCCCCCAAGAACTTCTTGGTTTGTTC TAATAA	636
g23238.t1-HAP5-ORF	AAGCCCCCAAGAACTTCTTGGTTTGTTC TAATAA	636

Фиг. 2 (продолжение)

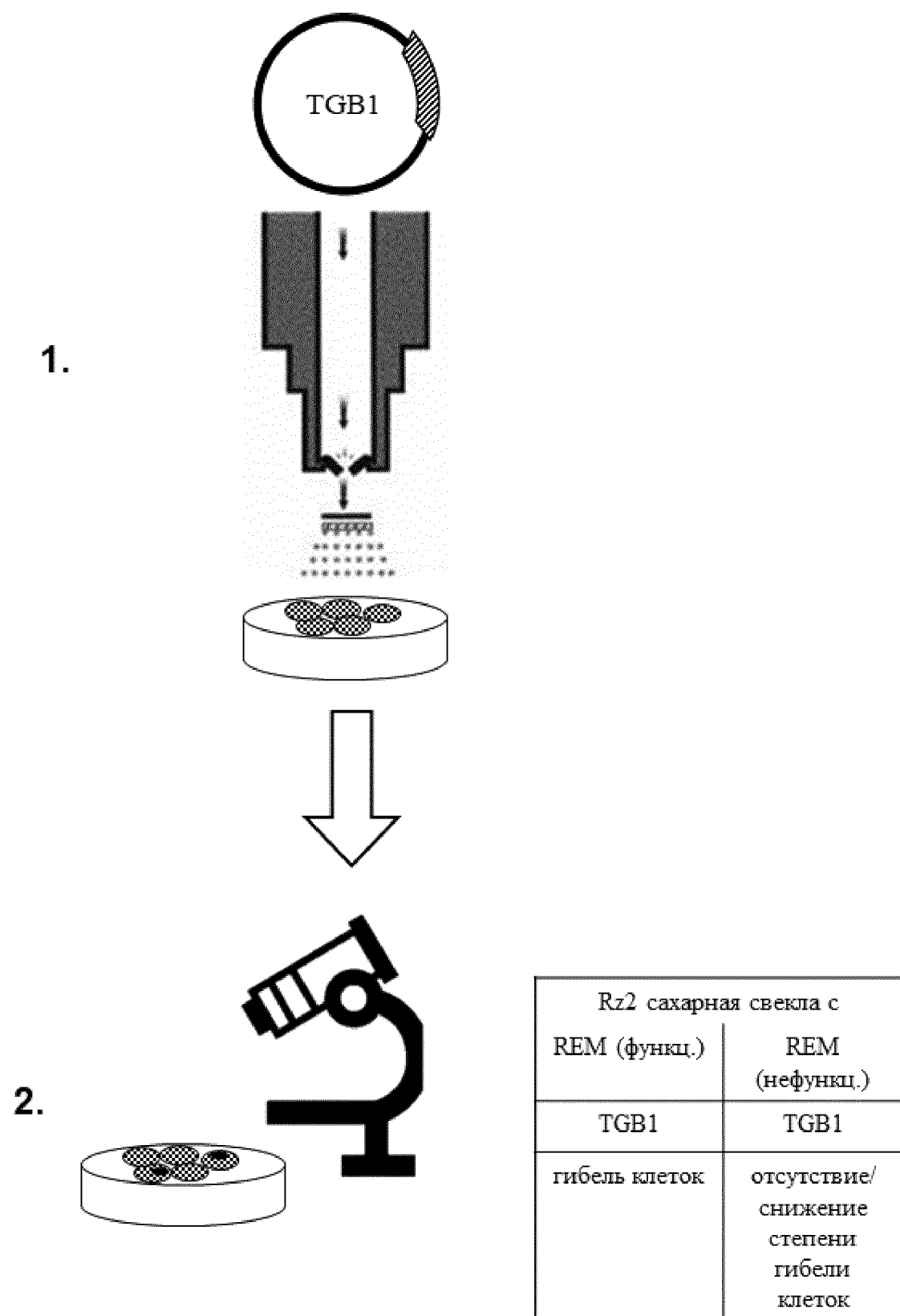
g23238.t1-HAP1	MATEEANKVVTETPAPPVTPPQEP ² ATVSETRESPVAVEEKS ¹ LPVSTPLPSTTEKTPAS	60
g23238.t1-HAP2	MATEEANKVVTETPAPPVTPPQEPATVSETRESPVAVEEKS ¹ LPVSTPLPSTTEKTPAS	60
g23238.t1-HAP3	MATEEANKVVTETPAPPVTPPQEPATVSETRESPVAVEEKS ¹ LPVSTPLPSTTEKTPAS	60
g23238.t1-HAP4	MATEEANKVVIETPAPPVTPPQEPATVSETRESPVAVEEKS ¹ LPVSTPLPSTTEKTPAS	60
g23238.t1-HAP5	MATEEANKVVTETPAPPVTPPQEPATVSETRESPVAVEEKS ¹ LPVSTPLPSTTEKTPAS	60

g23238.t1-HAP1	VEKVTELSEEK ¹ PLEEKPIEEKPLEGSVGRDAQLARVQTEKRISLIKAWEESEKCKAENKA	120
g23238.t1-HAP2	VEKVTELSEEKPLEEKPIEEKPLEGSVGRDAQLARVQTEKRISLIKAWEESEKCKAENKA	120
g23238.t1-HAP3	VEKVTELSEEKPLEEKPIEEKPLEGSVGRDAQLARVQTEKRISLIKAWEESEKCKAENKA	120
g23238.t1-HAP4	VEKVTELSEEKPLEEKPIEEKPLEGSVGRDAQLARVQTEKRISLIKAWEESEKCKAENKA	120
g23238.t1-HAP5	VEKVTELSEEKPLEEKPIEEKPLEGSVGRDAQLARVQTEKRISLIKAWEESEKCKAENKA	120

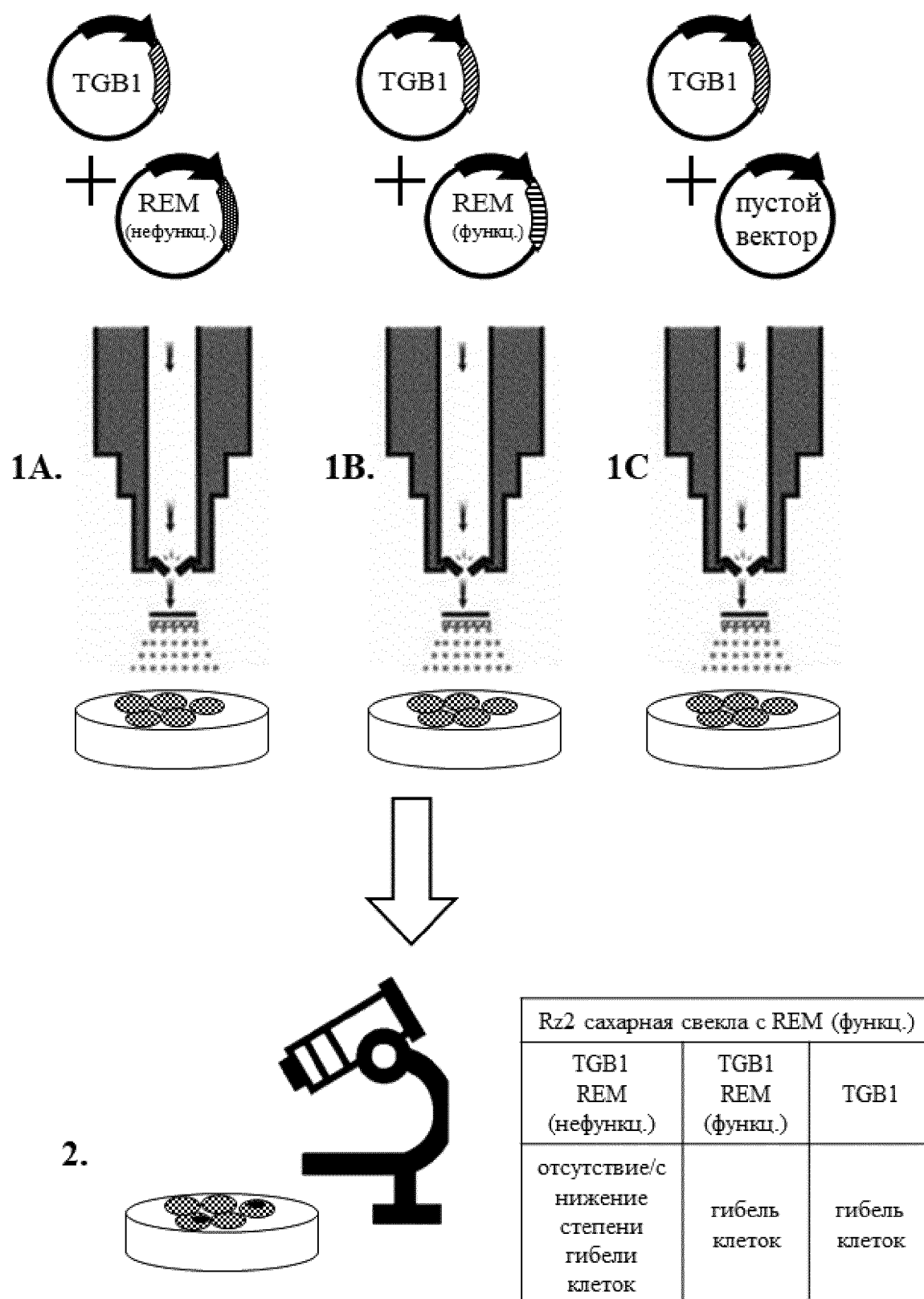
g23238.t1-HAP1	HKKIAAIEAWENSKKASLEAELKKIEESLEKKKA ¹ EYAEKMK ¹ NKVAMTHKEAE ¹ EKKATVEA	180
g23238.t1-HAP2	HKKIAAIEAWENSKKASLEAELKKIEESLEKKKA ¹ EYAEKMK ¹ NKVAMTHKEAE ¹ EKKATVEA	180
g23238.t1-HAP3	HKKIAAIEAWENSKKASLEAELKKIEESLEKKKA ¹ EYAEKMK ¹ NKVAMTHKEAE ¹ EKKATVEA	180
g23238.t1-HAP4	HKKIAAIEAWENSKKASLEAELKKIEESLEKKKA ¹ EYAEKMK ¹ NKVAMTHKEAE ¹ EKKATVEA	180
g23238.t1-HAP5	HKKIAAIEAWENSKKASLEAELKKIEESLEKKKA ¹ EYAEKMK ¹ NKVAMTHKEAE ¹ EKKATVEA	180

g23238.t1-HAP1	KRAED ¹ ILKA ¹ EEMA ¹ AKYRATGKPPK ¹ KLGLF	210
g23238.t1-HAP2	KRAEDVLKA ¹ EEMA ¹ AKYRATGKPPK ¹ KLGLF	210
g23238.t1-HAP3	KRAEDVLKA ¹ EEMA ¹ AKYRATGKPPK ¹ KLGLF	210
g23238.t1-HAP4	KRAEDVLKA ¹ EEMA ¹ AKYRATGKPPK ¹ KLGLF	210
g23238.t1-HAP5	KRAEDVLKA ¹ EEMA ¹ AKYRATGKPPK ¹ KLGLF	210

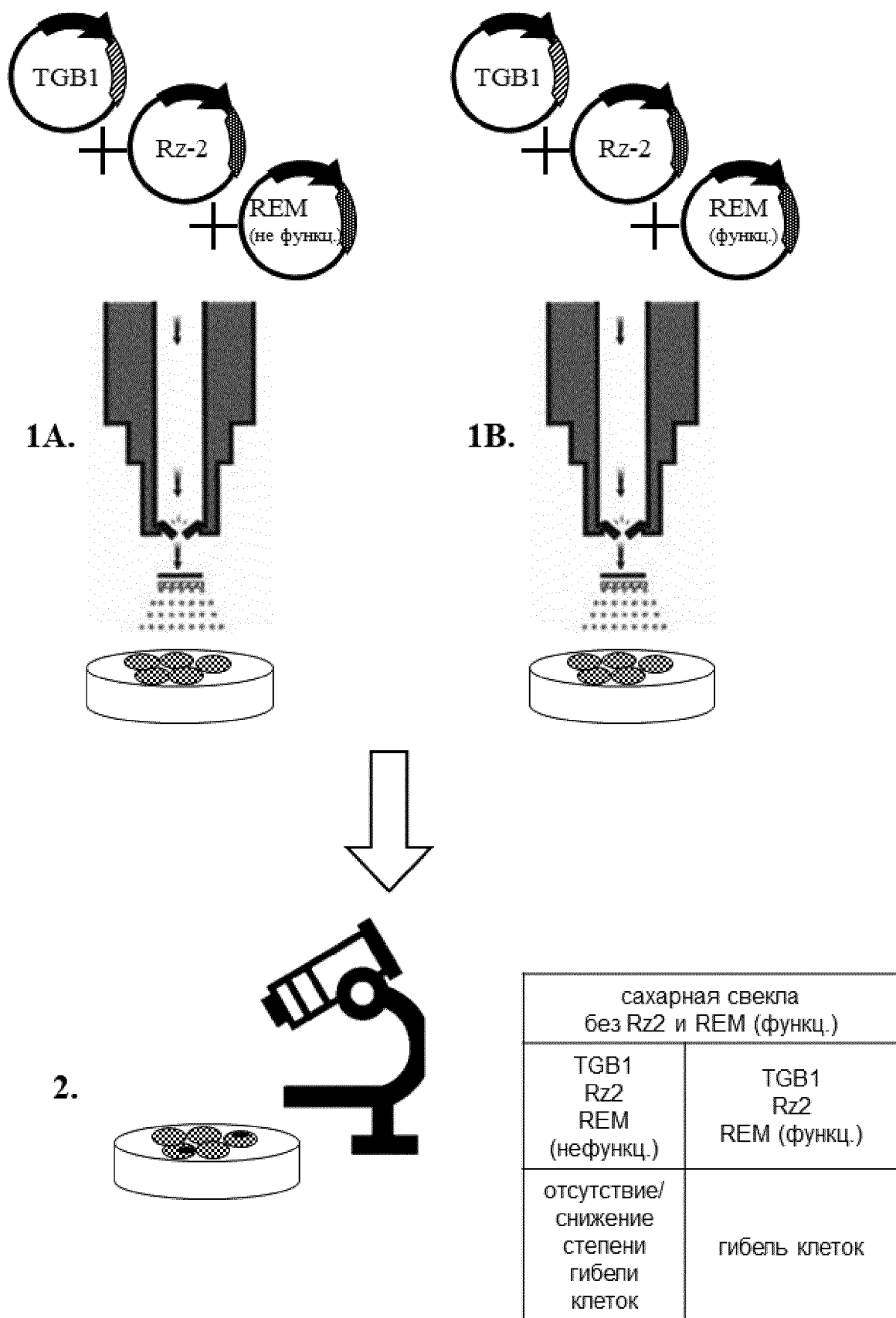
Фиг. 3



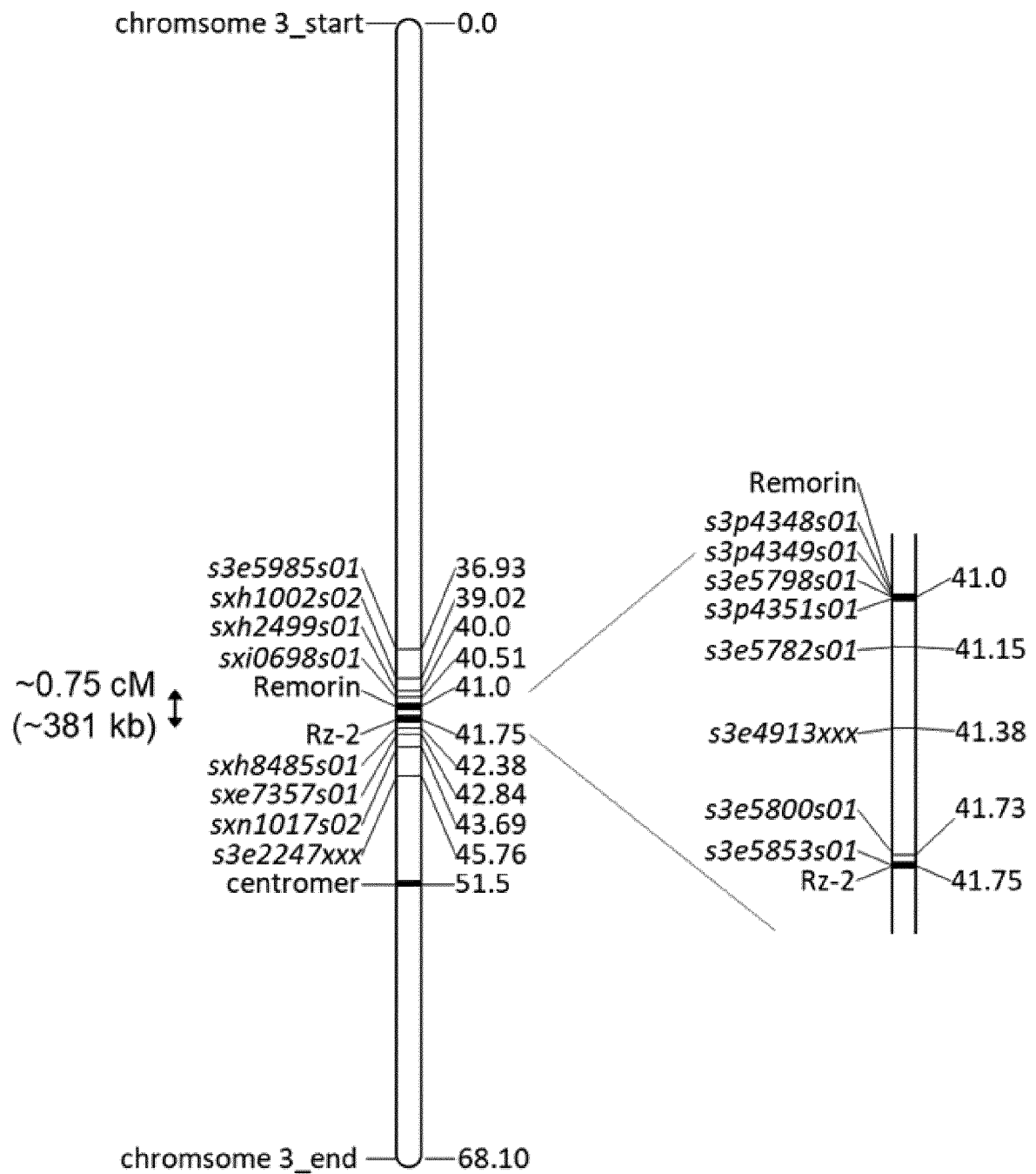
Фиг. 4



Фиг. 5



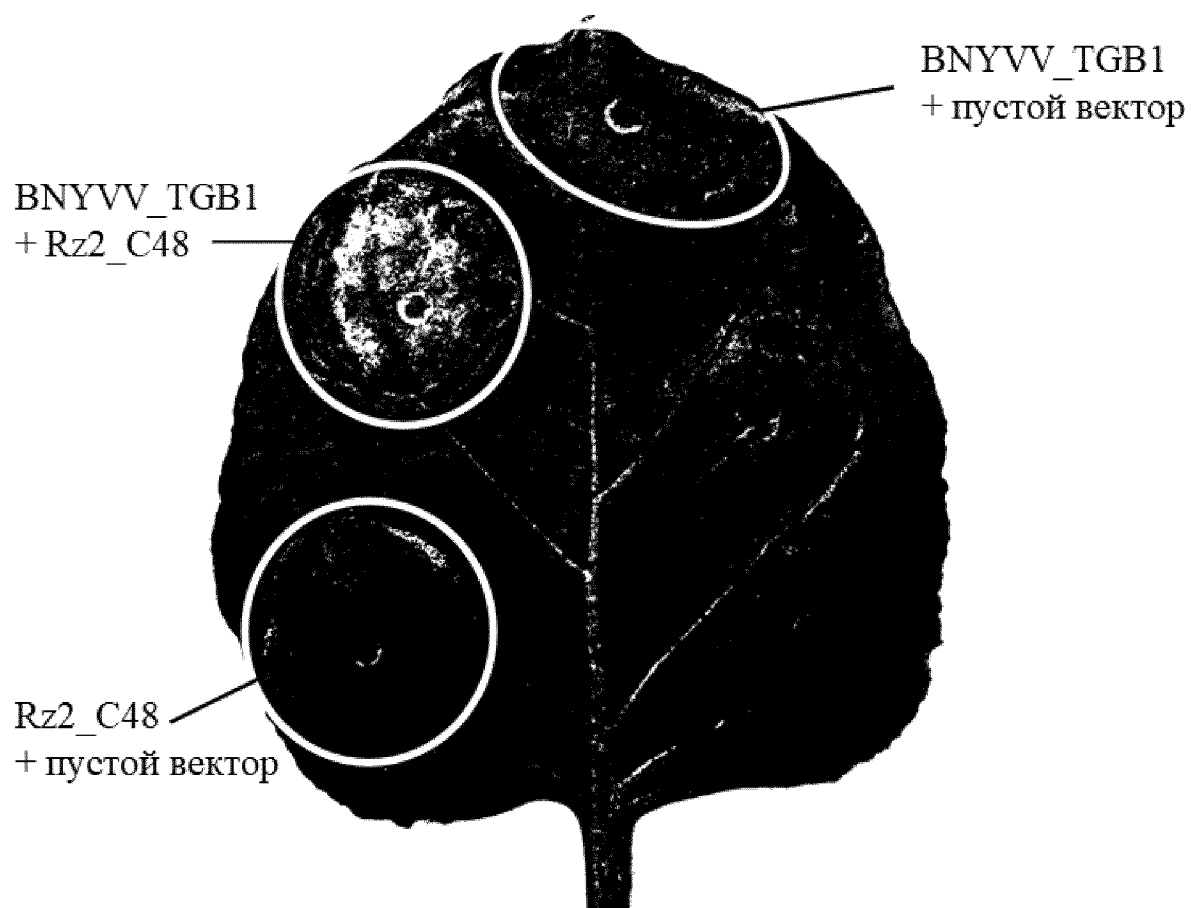
Фиг. 6



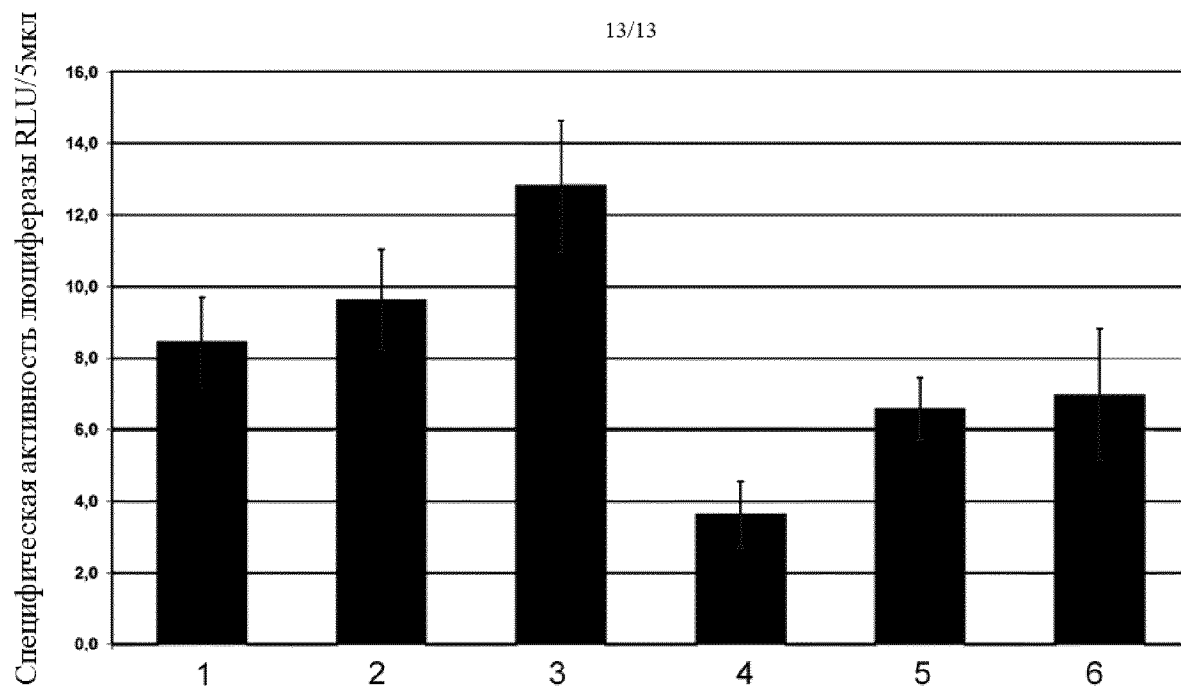
Фиг. 7

Целевая зона	Идентификатор	Ген реморина										Ген RZ-2																		
		8673269	8694489	8711404	8721066	8730773	8739103	8742296	8749582	8785701	8790230	8794861	8796265	8796484	8796579	8796642	8797296	8812715	8822476	8859854	8899423	8903904	8932385	9267783	9267907	9268704	9268981	9269257	9269506	9269739
		sx12896s01	sxm1276s01	s3p4338s01	s3p4339s01	s3e3119xxx	s3p4340s01	s3p4341s01	s3p4342s01	s3e5796s01	s3p4353s01	s3p4350s01	s3e5798s01	s3p4349s01	s3p4348s01	s3p4347s01	s3p4346s01	s3p4344s01	s3p2421s01	s3p2419s01	s3p2416s01	s3p2415s01	s3p2414s01	s3e5830s01	s3e5880s01	s3e5853s01	s3e5880s02	s3e5880s03	s3e5880s04	s3e5880s06
17ZXBМ_84039	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17ZXBМ_84742	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17ZXBМ_85478	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17ZXBМ_84820	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17ZXBМ_86635	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17ZXBМ_85198	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17ZXBМ_84012	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
17ZXBМ_84227	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
17ZXBМ_84167	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
17ZXBМ_84765	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
17ZXBМ_84340	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
17ZXBМ_85076	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
17ZXBМ_84563	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17ZXBМ_84317	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17ZXBМ_85962	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17ZXBМ_86674	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17ZXBМ_84206	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17ZXBМ_85589	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17ZXBМ_84925	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17ZXBМ_85536	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17ZXBМ_84755	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A
17ZXBМ_85253	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
17ZXBМ_86682	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
17ZXBМ_85084	H	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
17ZXBМ_84959	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
17ZXBМ_84216	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
17ZXBМ_85436	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
17ZXBМ_84189	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B

Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10