

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291428** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.09.01

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

(22) Дата подачи заявки
2019.11.12

(54) ГЕН УСТОЙЧИВОСТИ К ПАТОГЕНУ РОДА HETERODERA

(86) **PCT/EP2019/081081**

(72) Изобретатель:

(87) **WO 2021/093943 2021.05.20**

Торьек Отто, Борхардт Дитрих,

(71) Заявитель:

Мехелке Вольфганг, Бейер Вернер,

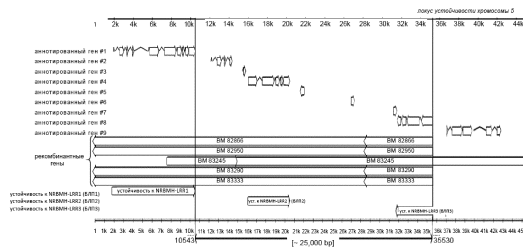
КВС ЗААТ СЕ & КО. КГАА (DE)

**Шульц Бритта, Лайн Йенс Кристоф
(DE)**

(74) Представитель:

Зуйков С.А. (RU)

(57) Более эффективная селекция против заражения свекловичной цистообразующей нематодой или выведение новых устойчивых линий возможна за счет обеспечения наличия молекулы нуклеиновой кислоты, опосредующей устойчивость к Heterodera по настоящему изобретению; в частности, доминирующий эффект устойчивости в целевом растении обеспечен свойством идентифицированной молекулы нуклеиновой кислоты. Молекула нуклеиновой кислоты, опосредующая устойчивость к Heterodera, и варианты осуществления настоящего изобретения, которые описаны выше, предлагают дополнительные области применения, например использование аллеля гена устойчивости в цис-генетических или транс-генетических подходах в целях получения новых устойчивых сортов.



**202291428
A1**

**A1
202291428**

Ген устойчивости к патогену рода *Heterodera*

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая, если присутствует в растении, способна придавать устойчивость к патогену рода *Heterodera*, в частности, к свекловичной цистообразующей нематоде *Heterodera schachtii*, и, в частности, в растении вида *Beta vulgaris*, а также к полипептиду, кодируемому молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В частности, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению характеризуется тем, что эффект устойчивости к патогенам рода *Heterodera*, который обеспечивается присутствием молекулы нуклеиновой кислоты, является доминирующим. Кроме того, изобретение относится к устойчивым к *Heterodera* растению, растительной клетке, органу растения, растительной ткани, части растения, или семени или потомку растения, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты или ее части в виде эндогенного гена, в виде отредактированного гена или в виде трансгена. Кроме того, настоящее изобретение также включает в себя способы повышения устойчивости к патогену рода *Heterodera* у растения, в частности у растения вида *Beta vulgaris*, а также способы получения или идентификации и, возможно, селекции растения, устойчивого к *Heterodera*. Настоящее изобретение также включает в себя способы мониторинга заражения патогеном *Heterodera schachtii*, а также олигонуклеотидные зонды и праймеры для гибридизации с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно сообщениям, более двух десятков различных видов нематод наносят экономический ущерб коммерческому производству сахарной свеклы (Hafez, Sugar Beet nematodes in Idaho and Eastern Oregon (1997 г.), Университет Айдахо, Сельскохозяйственный колледж). Наиболее серьезным нематодным вредителем свеклы является свекловичная цистообразующая нематода (*Heterodera schachtii*). (Cooke, Agricultural Zoology Reviews, 2, (1987 г.), стр. 132-183), которая имеет наибольшее экономическое значение в большинстве свекловичных районов в Германии и Европе. Впервые она была обнаружена в 1859 г. в Германии, и, согласно оценкам, в настоящее время 10-25 % площадей, занятых в производстве сахарной свеклы, во всем мире могут быть заражены этим вредителем, что приводит к потере урожая до 80 % (Hafez, 1997 г.), при этом потеря урожая зависит от количества нематод в почве, времени посева и заражения сахарной свеклы, а также от погодных условий.

Свекловичная цистообразующая нематода является растительной патогенной нематодой и способна вызывать значительную потерю урожая не только сахарной свеклы, но и других видов свеклы, таких как красная свекла, кормовая свекла и листовая свекла, а также других растений семейства *Amaranthaceae*, таких как шпинат, и *Brassicaceae*, таких как рапс, капуста, пекинская капуста, цветная капуста, брюссельская капуста, брокколи, репа, редис и брюква, за счет серьезного повреждения корневых систем, особенно в летнее время. Эта нематода также поражает многие широко распространенные сорные растения, такие как сурепка, пастушья сумка, марь белая и портулак.

На полях сахарной свеклы заражение свекловичной цистообразующей нематодой первоначально проявляется в виде округлых или овальных участков низкорослых растений. Нематоды питаются корнями растений, что снижает способность растения поглощать питательные вещества и воду. Таким образом, наземные симптомы выглядят как дефицит питательных веществ или засуха, снижение стеблестоя, скудный рост, низкорослость, пожелтение и увядание, при этом симптомы варьируются в зависимости от стадии роста на момент заражения. Если заражены всходы, то симптомы включают в себя низкорослость и снижение роста листьев, и в жаркий период дня старые наружные листья желтеют и увядают. Зараженная культура содержит более мелкие растения с пониженной ценностью и качеством, и будет слабо конкурировать с сорными растениями.

Болезнь распространяется непрерывно, и производителям становится все труднее бороться с этим вредителем. Тем не менее, борьба с вредителем крайне важна, поскольку высокая популяция нематод в почве может привести к нерентабельности производства сахарной свеклы. Существуют различные методы борьбы с этой болезнью, но ни один из применяемых в настоящее время методов не дает удовлетворительные результаты. Химическая борьба с *Heterodera schachtii* с использованием нематицидов не только влечет за собой издержки для фермера и загрязняет окружающую среду, но и более недопустима во многих странах, при этом обеззараживание почвы на больших полях неприменимо. Кроме того, севооборот, при котором сахарную свеклу выращивают только раз в четыре года или даже реже в целях уменьшения популяции нематод, не всегда целесообразен и недостаточно эффективен. Еще одна распространенная практика борьбы с вредителем включает в себя выращивание устойчивых к нематодам промежуточных культур, таких как масличная редька или горчица. Эти растения привлекают вредителя, но препятствуют его развитию и размножению, что сокращает популяцию вредителя. Также возможно выращивать устойчивые или нечувствительные сорта сахарной свеклы. До настоящего времени наиболее эффективным методом уменьшения популяции нематод в почве являлось выращивание устойчивых сортов сахарной свеклы.

При этом в продаже имеются устойчивые и нечувствительные к нематодам сорта сахарной свеклы, например, с основным геном устойчивости к *Heterodera schachtii* из *Beta procumbens* (Heijbroek *и соавт.*, Euphytica 38 (1988 г.), стр. 121-131; Lange *и соавт.*, Материалы 53-го конгресса IIRB, Брюссель (1990 г.), стр. 89-102). В перемещенном сегменте *Beta procumbens m. e.*, сегменте хромосомы 1 *B. procumbens*, интегрированном в конец хромосомы 9 *B. vulgaris*, ген Hs1pro-1 был идентифицирован путем позиционного клонирования в качестве причинного фактора (Cai *и соавт.*, Science 275 (1997 г.), стр. 832-834). Однако при интеграции сегмента хромосомы 1 *Beta procumbens* в геном *Beta vulgaris* в растение привносится не только требуемая устойчивость к *Heterodera schachtii*, но и, скорее, зачастую нежелательные признаки, такие как, например, снижение урожайности вследствие наследования дополнительных генов, которые связаны с положительным признаком устойчивости к *Heterodera*. Это явление также известно под названием «сцепленный груз». Таким образом, использование этого гена в селекции имеет ограничения, обусловленные значительным снижением урожайности вследствие «сцепленного груза» и, кроме того, обусловленные нестабильностью транслокации.

Еще один источник устойчивости к нематодам был обнаружен у дикой морской свеклы *B. vulgaris* subsp. *maritima* в материалах, собранных во Франции (Hijner, Meded. Inst. rat. Suikerprod. 21 (1951 г.), стр. 1-13). Однако генетические и функциональные предпосылки устойчивости к *Heterodera*, и идентичность генов устойчивости до сих пор остаются совершенно неясными.

При этом, как упоминалось выше, недостаток сортов, обладающих описанной устойчивостью, заключается в том, что развитие сорта является очень трудоемким и сложным вследствие осложненной наследственности, и при отсутствии заражения у таких сортов заметно более низкие показатели урожайности по сравнению с обычными сортами. Помимо прочего, это может быть связано с эпигенетическим взаимодействием некоторых генов устойчивости с генами, отвечающими за выработку сахара, что приводит к снижению приспособленности растений в отсутствие патогена.

Практическое применение новых методов селекции, основанных на редактировании генов, *например*, посредством нуклеаз TALE или систем CRISPR, а также трансгенных подходов невозможно, поскольку гены, участвующие в развитии устойчивости, не идентифицированы и не охарактеризованы.

Для устойчивой селекции против свекловичной цистообразующей нематоды, то есть, для противодействия опасности вариантов *Heterodera*, преодолевающих устойчивость, необходимо постоянно выявлять новые гены устойчивости и интегрировать их в генные пулы культурных растений, таких как сахарная свекла. В частности, цель

заклучалась в обеспечении наличия подходящих генов устойчивости, которые, если присутствуют в растении, сами по себе уже производят очень большой доминирующий эффект устойчивости к *Heterodera schachtii*. Согласно изобретению, эта цель достигается с посредством вариантов осуществления, описанных в формуле изобретения и в описании.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая способна придавать устойчивость к патогену рода *Heterodera*, в частности, к свекловичной цистообразующей нематоды *Heterodera schachtii*, в растении, и, в частности, в *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*. Молекула нуклеиновой кислоты, присутствующая в растении, производит доминирующий эффект устойчивости к *Heterodera schachtii*.

Кроме того, изобретение относится к устойчивым к *Heterodera* растению, растительной клетке, органу растения, растительной ткани, части растения, семени, семенному материалу или потомку растения, которые эндогенно или трансгенно содержат молекулу нуклеиновой кислоты или ее части. Согласно конкретному необязательному варианту осуществления, исключаются те растения и их компоненты, которые были получены исключительно посредством существенно биологического процесса.

Способы повышения устойчивости к *Heterodera* у растения, в частности у растения вида *Beta vulgaris*, а также способы получения или идентификации и, возможно, селекции растения, устойчивого к *Heterodera*, также включены в настоящее изобретение. Настоящее изобретение также включает в себя способы мониторинга заражения патогеном *Heterodera schachtii*, а также олигонуклеотиды в качестве зондов и праймеров для гибридизации с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

Таким образом, настоящее изобретение относится к вариантам осуществления, которые перечислены в следующих пунктах и проиллюстрированы примерами и фигурами.

[1] Молекула нуклеиновой кислоты для повышения устойчивости к патогену рода *Heterodera* у растения, в котором экспрессируется молекула нуклеиновой кислоты, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из:

(a) нуклеотидной последовательности, которая содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №№ 1, 4 и 7, или ее функционального фрагмента;

(b) нуклеотидной последовательности, которая содержит кодирующую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №№ 2, 5 и 8, или ее функционального фрагмента;

(с) нуклеотидной последовательности, которая в строгих условиях гибридизуется с комплементарной последовательностью нуклеотидной последовательности по п. (а), (b), (f) или (g), и предпочтительно, которая, если присутствует в растении, способна придавать устойчивость к патогену рода *Heterodera*;

(d) нуклеотидной последовательности, которая содержит последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 75 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 92 %, по меньшей мере на 94 %, по меньшей мере на 96 %, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98 %, или по меньшей мере на 99 % идентична последовательности ДНК нуклеотидной последовательности по любому из пп. (а), (b), (f) или (g), и, предпочтительно, которая, если присутствует в растении, способна придавать устойчивость к патогену рода *Heterodera*;

(е) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК, которая является аллелем или производным (а), (b), (f) или (g), путем делеции, замещения, вставки, транзиции и/или присоединения одного или нескольких нуклеотидов, и предпочтительно, которая, если присутствует в растении, способна придавать устойчивость к патогену рода *Heterodera*;

(f) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№ 3, 6 и 9, или ее функционального фрагмента;

(g) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 75 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 92 %, по меньшей мере на 94 %, по меньшей мере на 96 %, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№ 3, 6 и 9;

(h) нуклеотидной последовательности, которая является вариантом последовательности ДНК по любому из пп. (а) – (g) вследствие вырожденности генетического кода, и предпочтительно, которая, если присутствует в растении, способна придавать устойчивость к патогену рода *Heterodera*.

[2] Молекула нуклеиновой кислоты по п. [1], отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты придает устойчивость к патогену рода *Heterodera*, который преобладает в растении.

[3] Молекула нуклеиновой кислоты по п. [1] или п. [2], отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты происходит из *Beta vulgaris* subsp. *maritima*.

[4] Полипептид, который кодируется молекулой нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3].

[5] Вектор или экспрессионная кассета, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3], в которой молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно гетерологична вектору или экспрессионной кассете, или в которой молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно связана с гетерологичным регуляторным элементом, предпочтительно промотором или терминатором.

[6] Клетка, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] - [3], вектор или экспрессионную кассету по п. [5], или полипептид по п. [4], в которой молекула нуклеиновой кислоты или экспрессионная кассета предпочтительно присутствует в виде эндогена или в виде трансгена.

[7] Растение или его часть, отличающиеся тем, что растение или его часть содержат молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3] эндогенно или трансгенно, или вектор или экспрессионную кассету по п. [5], причем растение, эндогенно содержащее молекулу нуклеиновой кислоты, предпочтительно является растением рода *Beta*, в частности вида *Beta vulgaris*, но не *Beta vulgaris* subsp. *maritima*. Указанное растение предпочтительно представляет собой растение, обладающее устойчивостью к патогену рода *Heterodera*.

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

[9] Растение по п. [7] или п. [8], отличающееся тем, что молекула нуклеиновой кислоты гетерозиготна или гомозиготна присутствует в геноме растения.

[10] Семена или потомки растения по одному из пп. [7] – [9], причем семя или потомок трансгенно или эндогенно содержит молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3], или вектор или экспрессионную кассету по п. [5].

[11] Семена по п. [10], которые были технически обработаны, при этом техническая обработка выбирается из группы, состоящей из:

- (a) шлифования;
- (b) протравливания, предпочтительно дражирования;
- (c) инкрустации;
- (d) окрашивания.

[12] Способ повышения устойчивости к патогену рода *Heterodera* у растения, предпочтительно у растения вида *Beta vulgaris*, включающий следующие этапы:

(i) интеграция молекулы нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3], или вектора или экспрессионной кассеты по п. [5] посредством репарации, направляемой гомологией, или гомологичной рекомбинации, предпочтительно поддерживаемой сайт-направленной нуклеазой, в геном по меньшей мере одной клетки растения, предпочтительно растения вида *Beta vulgaris*, и необязательная регенерация растения из растительной клетки; или

(ii) увеличение экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3] по меньшей мере в одной клетке растения, предпочтительно путем модификации нативного промотора или слияния, предпочтительно оперативного связывания молекулы нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3] с гетерологичным промотором, который имеет более высокий уровень активности, чем нативный промотор, в частности, во время или после заражения *Heterodera*, и необязательная регенерация растения по меньшей мере из одной растительной клетки; или

(iii) повышение активности и/или стабильности полипептида по п. [4] путем модификации нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3] по меньшей мере в одной клетке растения и необязательная регенерация растения по меньшей мере из одной растительной клетки; или

(iv) трансформация растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3], или вектором или экспрессионной кассетой по п. [5], и необязательная регенерация растения из трансформированной растительной клетки;

причем устойчивость к *Heterodera* предпочтительно является устойчивостью к *Heterodera schachtii*, или растение предпочтительно является растением вида *Beta vulgaris*, предпочтительно *Beta vulgaris* subsp. *Vulgaris*, и, в частности, является сахарной свеклой.

[13] Способ получения растения, обладающего устойчивостью к патогену рода *Heterodera* по одному из пп. [7] – [9], включающий следующие этапы:

(a) трансформация растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3], или вектором или экспрессионной кассетой по п. [5]; и

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

(i) введение сайт-направленной нуклеазы и матрицы репарации в клетку растения, предпочтительно растения рода *Beta*, более предпочтительно растения вида *Beta vulgaris*, причем сайт-направленная нуклеаза способна генерировать по меньшей мере один одноцепочечный разрыв или по меньшей мере один двухцепочечный разрыв ДНК в геноме клетки, предпочтительно против хода транскрипции, по ходу транскрипции или в пределах целевой области, которая гомологична молекуле нуклеиновой кислоты по

одному из пп. [1] – [3], и матрица репарации содержит молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3];

(ii) культивирование клетки из п. (i) в условиях, которые допускают репарацию, направляемую гомологией, или гомологичную рекомбинацию, при этом молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты интегрируются из матрицы репарации в геном растения; и

(iii) регенерация растения из клетки, модифицированной по п. (ii); или

(I) введение сайт-направленной нуклеазы или редактора оснований в клетку растения, предпочтительно растения рода *Beta*, более предпочтительно растения вида *Beta vulgaris*, в котором сайт-направленная нуклеаза генерирует по меньшей мере один одноцепочечный разрыв или по меньшей мере один двухцепочечный разрыв ДНК в геноме клетки, предпочтительно, против хода транскрипции, по ходу транскрипции или в пределах целевой области, которая гомологична молекуле нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3]

(II) культивирование клетки из п. (I) в условиях, которые допускают модификацию целевой области, выбирается из:

(1) замены по меньшей мере одного нуклеотида;

(2) делеции по меньшей мере одного нуклеотида;

(3) вставки по меньшей мере одного нуклеотида; или

(4) любой комбинации пп. (1) – (3), в которой предпочтительно модификация увеличивает активность и/или стабильность полипептида по п. [4]; и

(III) регенерация растения из клетки, модифицированной в п. (II).

[14] Способ по п. [13], отличающийся тем, что целевая область:

a) находится между маркером s5e3001s02 и маркером s5e4668xxx, или

b) фланкирована маркером s5e3001s02 и маркером s5e4668xxx, или

c) содержит хромосомный интервал между маркером s5e3001s02 и маркером s5e4668xxx, и необязательно содержит аллельный вариант молекулы нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3], причем аллельный вариант не придает устойчивости к патогену рода *Heterodera* или придает лишь незначительную устойчивость к *Heterodera*, если он присутствует в растении.

[15] Способ по пп. [13] или [14], отличающийся тем, что по меньшей мере один одноцепочечный разрыв или по меньшей мере один двухцепочечный разрыв происходит в позиции, которая находится максимум на 10 000 пар оснований против хода транскрипции и/или по ходу транскрипции относительно целевой области, или которая

отстоит максимум на 10 000 пар оснований от аллельного варианта, определенного в п. [14].

[16] Растение или его часть, которые получены или могут быть получены способом по одному из пп. [13] – [15].

[17] Способ идентификации и, необязательно, получения или селекции растения, предпочтительно растения вида *Beta vulgaris*, которое устойчиво к патогену рода *Heterodera*, отличающийся тем, что данный способ включает в себя по меньшей мере этап (i) или (ii):

(i) обнаружение присутствия и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3] или присутствия полипептида по п. [4] в растении или части растения; и/или

(ii) обнаружение по меньшей мере одной области, косегрегированной с нуклеотидной последовательностью молекулы (молекул) нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3]; и

(iii) необязательно селекция растения, обладающего устойчивостью к патогену рода *Heterodera*, предпочтительно к *Heterodera schachtii*.

[18] Способ идентификации молекулы нуклеиновой кислоты, которая, если присутствует в растении, способна придавать устойчивость к патогену рода *Heterodera* в растении, предпочтительно в растении вида *Beta vulgaris*, отличающийся тем, что данный способ включает в себя следующие этапы:

(i) сравнение аминокислотной последовательности полипептида по п. [4] с аминокислотными последовательностями из базы данных последовательностей или идентификация аллельных вариантов, которые кодируют полипептид по п. [4] в генотипах растения;

(ii) идентификация аминокислотной последовательности или аллельного варианта, кодирующего аминокислотную последовательность, в которой аминокислотная последовательность по меньшей мере на 70 %, по меньшей мере на 75 %, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 92 %, по меньшей мере на 94 %, по меньшей мере на 96 %, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентична аминокислотной последовательности полипептида по п. [4];

(iii) введение молекулы нуклеиновой кислоты или аллельного варианта, кодирующего идентифицированную аминокислотную последовательность, в растение,

предпочтительно в растение вида *Beta vulgaris*, и экспрессия молекулы нуклеиновой кислоты в растении; и

(iv) обнаружение устойчивости к патогену рода *Heterodera*.

[19] Способ культивирования растений, предпочтительно растений вида *Beta vulgaris*, включающий в себя:

(i) получение растений по одному из пп. [7] – [9], получение растений с помощью способа по одному из пп. [13] – [16], или идентификацию и селекцию растений с помощью способа по п. [17], и

(ii) культивирование растений из п. (i) или их потомков,

при этом данный способ противодействует заражению культурных растений патогеном рода *Heterodera*.

[20] Олигонуклеотид длиной по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, или 20, предпочтительно по меньшей мере 21, 22, 23, 24 или 25, очень предпочтительно по меньшей мере 30, 35, 40, 45 или 50, и особенно предпочтительно по меньшей мере 100, 200, 300 или 500 нуклеотидов, который специфически гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, как определено в одном из пп. [1] – [3].

[21] Пара олигонуклеотидов, предпочтительно олигонуклеотиды по п. [20] или набор, содержащий эти олигонуклеотиды, в которой олигонуклеотиды пригодны для гибридизации в качестве прямого праймера и обратного праймера для области в геноме *Beta vulgaris*, которая косегрегируется в *Beta vulgaris* с устойчивостью к патогену рода *Heterodera*, придаваемой молекулой нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3], при этом предпочтительно область в геноме *Beta vulgaris* находится между маркером s5e3001s02 и маркером s5e4668xxx, фланкирована маркером s5e3001s02 и маркером s5e4668xxx, или содержит хромосомный интервал между маркером s5e3001s02 и маркером s5e4668xxx.

[22] Использование молекулы нуклеиновой кислоты по одному из пп. [1] – [3] в производстве устойчивых к *Heterodera* растений подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*.

[23] Способ, растение или часть растения, или пара олигонуклеотидов по любому из предыдущих пунктов, в котором

s5e3001s02 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP), предпочтительно в позиции 56940072 п.о. хромосомы 5, относящийся к генотипу EL10 *Beta vulgaris*, при этом указанный нуклеотид является нуклеотидом G или T, предпочтительно однонуклеотидный полиморфизм (SNP), как указано в SEQ ID № 10 или 11, более предпочтительно указанный нуклеотид является нуклеотидом T; и/или

s5e4668xxx представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP), предпочтительно в позиции 57809807 п.о. хромосомы 5, относящийся к генотипу EL10

Beta vulgaris, при этом указанный нуклеотид является нуклеотидом G или T, предпочтительно однонуклеотидный полиморфизм (SNP), как указано в SEQ ID № 12 или 13, более предпочтительно указанный нуклеотид является нуклеотидом T.

[24] Растение по п. [7], в котором растение или дражированное семя такого растения имеет геном, обеспечивающий развитие тела свеклы с минимальной свежей массой 200 г, 250 г, 300 г, 350 г, 400 г, 450 г или 500 г, и максимальной массой 100 г, 1100 г, 1200 г, 1300 г, 1400 г, 1500 г, 1600 г, 1700 г, 1800 г, 1900 г или 2000 г.

[25] Растение по п. [7] или [24], растение сахарной свеклы или дражированное семя такого растения, в котором геном растения сахарной свеклы обеспечивает развитие тела свеклы с концентрацией сахарозы в свежей массе тела свеклы по меньшей мере 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % или даже 20 % (процентов по массе).

[26] Молекулярный маркер, олигонуклеотид или праймер, содержащий один из следующих SEQ ID №№, указанных в таблице 4, или SEQ ID №, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID №№ 10 – 13.

[27] Молекулярный маркер, олигонуклеотид или праймер, полученный из молекулярного маркера, олигонуклеотида или праймера по п. [26], причем молекулярный маркер, олигонуклеотид или праймер пригодны для селекции растения, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по п. [1].

[28] Молекулярный маркер, олигонуклеотид или праймер по п. [26] или [27], содержащие одну или несколько химических модификаций или добавок, выбранных из группы, состоящей из: нуклеотидов с удаленным азотистым основанием; нуклеотидов 8'охо dA и/или 8'охо dG; обратного основания на их 3'-конце; 2'О-метильных нуклеотидов; 5'-концевого кэпа; модификации остова, выбранной из группы, состоящей из модификации фосфотиоата, модификации метилфосфоната, модификации закрытой нуклеиновой кислоты (LNA), модификации O-(2-метоксиэтил) (MOE), модификации di PS и модификации пептидной нуклеиновой кислоты (PNA); внутритяжевых мостиков; флуоресцентных красителей, конъюгированных с ними; флуоресцентных красителей, конъюгированных с ними на 5' или 3' конце GRON; и одного или нескольких оснований, которые увеличивают энергию гибридизации; 2'О-метильных нуклеотидов на их 5' конце; 2'О-метильных нуклеотидов на их 3' конце, флуоресцентного красителя, конъюгированного с их 5'-концом, флуоресцентного красителя, конъюгированного с их 3'-концом, остатков фосфотиоата на их 5'-конце, остатков фосфотиоата на их 3'-конце, 3'-блокирующих заместителей, 5'-блокирующих заместителей, как 3'-, так и 5'-блокирующих заместителей.

Во-первых, некоторые термины, используемые в данной заявке, подробно объяснены ниже:

Род *Heterodera* включает в себя различные виды, например, виды *Heterodera amygdali*, *Heterodera arenaria*, *Heterodera aucklandica*, *Heterodera avenae*, *Heterodera bergeniae*, *Heterodera bifenestra*, *Heterodera cacti*, *Heterodera cajani*, *Heterodera canadensis*, *Heterodera cardiolata*, *Heterodera carotae*, *Heterodera cicero*, *Heterodera cruciferae*, *Heterodera delvii*, *Heterodera elachista*, *Heterodera filipjevi*, *Heterodera gambiensis*, *Heterodera glycines*, *Heterodera goettingiana*, *Heterodera hordecalis*, *Heterodera humuli*, *Heterodera latipons*, *Heterodera longicaudata*, *Heterodera medicaginis*, *Heterodera oryzae*, *Heterodera oryzicola*, *Heterodera rosii*, *Heterodera rostochiensis*, *Heterodera sacchari*, *Heterodera schachtii*, *Heterodera tabacum*, *Heterodera trifolii*, *Heterodera ustinovii* и *Heterodera zeae*.

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

«Растение рода *Beta*» относится к семейству амарантовых (*Amaranthaceae*). В число этих растений входят 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, к нему относятся *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *altissima* (сахарная свекла в более узком смысле), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *vulgaris* (листовая свекла), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *conditiva* (подсвекольник/красная свекла), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *crassa/alba* (кормовая свекла). Следует отметить, что нуклеиновая кислота по настоящему изобретению не встречается в природе в сахарной свекле, листовой свекле, подсвекольнике или кормовой свекле, но может быть введена в них человеком.

«Функциональный фрагмент» нуклеотидной последовательности означает сегмент нуклеотидной последовательности, который обладает функциональностью, идентичной или сопоставимой с функциональностью полной нуклеотидной последовательности, из которой происходит функциональный фрагмент. Функциональный фрагмент как таковой может обладать нуклеотидной последовательностью, которая идентична или гомологична общей нуклеотидной последовательности по длине по меньшей мере 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 %. Сюда также явным образом входит диапазон от 90 % до 100 %. Кроме того, «функциональный фрагмент» нуклеотидной последовательности может также означать сегмент нуклеотидной последовательности, который изменяет функциональность всей

нуклеотидной последовательности, *например*, в ходе посттранскрипционного или транскрипционного сайленсинга генов. Функциональный фрагмент нуклеотидной последовательности как таковой может содержать 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 особенно предпочтительно по меньшей мере 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, или 1000 последовательных нуклеотидов общей нуклеотидной последовательности. Сюда также явным образом входит диапазон от 21 до 50 нуклеотидов.

«Функциональная часть» белка означает сегмент белка или участок аминокислотной последовательности, который кодирует белок, при этом сегмент может проявлять функциональность, идентичную или сопоставимую с функциональностью всего белка в растительной клетке. По длине по меньшей мере 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 97 %, 98 %, или 99 % функциональная часть белка содержит аминокислотную последовательность, которая идентична или, с учетом консервативных и полуконсервативных аминокислотных обменов, аналогична белку, из которого происходит функциональная часть.

Термин «гетерологичный» означает, что введенный полинуклеотид происходит из клетки или организма с другим фоновым генотипом, того же вида или другого вида, или гомологичен прокариотической или эукариотической клетке-хозяину, но затем находится в другой генетической среде и, таким образом, отличается от соответствующего полинуклеотида, который, возможно, присутствует естественным образом. Гетерологичный полинуклеотид может присутствовать в дополнение к соответствующему эндогенному гену.

По смыслу изобретения под «гомологом» понимается белок одинакового филогенетического происхождения; под «аналогом» понимается белок, который выполняет одинаковую функцию, но имеет другое филогенетическое происхождение; под «ортологом» понимается белок из другого вида, который выполняет ту же функцию; и под «паралогом» понимается белок, который появился внутри вида вследствие дублирования, при этом данная копия сохраняет одинаковую функцию белка, изменяет шаблон его экспрессии, но не функцию, изменяет его функцию белка или разделяет исходную функцию гена между обеими копиями.

Под «гибридизацией» следует понимать процесс, в котором одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты связывается с цепью нуклеиновой кислоты, которая комплементарна в максимально возможной степени, т. е. образует с ней пары оснований. Стандартные методы гибридизации описаны, например, в Sambrook *и соавт.*, Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001 г. Под этим предпочтительно понимают, что по меньшей мере 60 %, более предпочтительно по меньшей мере 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, или 85 %, и особенно предпочтительно 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % оснований молекулы нуклеиновой кислоты образуют пары оснований с цепью нуклеиновой кислоты, которая комплементарна в максимально возможной степени. Возможность такого отжига зависит от строгости условий гибридизации. Термин «строгость» относится к условиям гибридизации. Высокая строгость присутствует в том случае, когда спаривание оснований усложнено; низкая строгость присутствует в том случае, когда спаривание оснований упрощено. Например, строгость условий гибридизации зависит от концентрации соли или ионной силы и температуры. В целом, строгость может быть увеличена путем повышения температуры и/или уменьшения содержания соли. Под «строгими условиями гибридизации» следует понимать те условия, при которых гибридизация происходит преимущественно только между гомологичными молекулами нуклеиновых кислот. Таким образом, термин «условия гибридизации» относится не только к условиям, преобладающим при фактическом добавлении нуклеиновых кислот, но также и к условиям, преобладающим на следующих стадиях промывки. Например, строгие условия гибридизации представляют собой условия, при которых гибридизуются преимущественно 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 % идентичности последовательностей. Строгими условиями гибридизации являются, например: гибридизация в 4 x SSC (раствор цитрата и хлорида натрия) при 65 °C и последующая повторная промывка в 0,1 x SSC при 65 °C в течение в общей сложности примерно 1 часа. Гибридизация происходит преимущественно в строгих 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 правилами спаривания оснований. Комплементарная последовательность предпочтительно полностью комплементарна контрпоследовательности и, таким образом, предпочтительно имеет ту же длину.

Под «изолированной молекулой нуклеиновой кислоты» понимается молекула нуклеиновой кислоты, экстрагированная из ее естественной или исходной среды. Этот термин также включает в себя молекулу нуклеиновой кислоты, полученную синтетическим способом. Под «изолированным полипептидом» понимается полипептид,

экстрагированный из его естественной или исходной среды. Этот термин также включает в себя полипептид, полученный синтетическим способом.

«Молекулярный маркер» представляет собой нуклеиновую кислоту, которая является полиморфной в популяции растений и используется в качестве эталона или ориентира. Маркер для обнаружения явления рекомбинации должен быть пригоден для мониторинга различий или полиморфизмов в популяции растений. Таким образом, подобный маркер способен обнаруживать и различать различные аллельные состояния (аллели). Термин «молекулярный маркер» также относится к нуклеотидным последовательностям, которые являются комплементарными или по меньшей мере в значительной степени комплементарными или гомологичными относительно геномных последовательностей, например, нуклеиновых кислот, используемых в качестве зондов или праймеров. Эти различия на уровне ДНК должны быть обнаружены в качестве маркеров и представляют собой, например, различия в полинуклеотидных последовательностях, например, SSR (*простые повторяющиеся последовательности*), RFLP (*полиморфизмы длин рестрикционных фрагментов*), FLP (*полиморфизмы длин фрагментов*) или SNP (*однонуклеотидные полиморфизмы*). Маркеры могут быть получены из геномных или экспрессируемых нуклеиновых кислот, например, сплайсированных РНК, кДНК или EST (*маркерные экспрессируемые последовательности*), и могут также относиться к нуклеиновым кислотам, которые используются в качестве пар зондов или праймеров, и как таковые пригодны для амплификации фрагмента последовательности с использованием способов, основанных на ПЦР. Маркеры, которые описывают генетические полиморфизмы (между частями популяции), могут быть обнаружены с использованием хорошо обоснованных способов из предшествующего уровня техники (*An Introduction to Genetic Analysis, 7-е издание, Griffiths, Miller, Suzuki и соавт., 2000 г.*). В их число входят, например, секвенирование ДНК, основанная на ПЦР и специфичная для последовательности амплификация, проверка RFLP, проверка полинуклеотидных полиморфизмов посредством аллель-специфической гибридизации (ASH), обнаружение амплифицированных переменных последовательностей генома растения, обнаружение 3SR (*самоподдерживающаяся репликация последовательностей*), обнаружение SSR, SNP, RFLP или AFLP (*полиморфизмов длин амплифицированных фрагментов*). Кроме того, также известны способы обнаружения EST (*маркерных экспрессируемых последовательностей*) и SSR-маркеров, полученных из последовательностей EST и RAPD (*случайно амплифицированной полиморфной ДНК*). В зависимости от контекста термин «маркер» в

описании также может означать конкретное положение хромосомы в геноме вида, где может быть обнаружен конкретный маркер (например, SNP).

Маркеры также включают в себя синтетические олигонуклеотиды, которые могут быть связаны с одной или несколькими молекулами обнаружения, причем молекулы обнаружения могут быть использованы для реакции обнаружения или генерации сигнала в рамках способа верификации. Синтетические олигонуклеотиды также включают в себя меченые праймеры. Меченые праймеры являются искусственными соединениями, не встречаются в природе и не могут быть выделены из природы. Получение таких соединений подробно описано далее.

«Промотор» представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность ДНК, обычно расположенную против хода транскрипции от кодирующей области, которая содержит точку связывания для РНК-полимеразы и инициирует транскрипцию ДНК. Кроме того, промотор содержит другие элементы, которые действуют в качестве гена-регулятора экспрессии генов (например, цис-регуляторные элементы). «Основной или минимальный промотор» представляет собой промотор, который содержит основные элементы, необходимые для инициации транскрипции (например, ТАТА-бокс и/или инициатор).

«Патоген» означает организм, который при взаимодействии с растением приводит к появлению симптомов заболевания в одном или нескольких органах растения. Используемый здесь термин «патоген» означает нематоду, в частности нематоду рода *Heterodera*.

Под «патогенной инфекцией» следует понимать самый ранний момент времени, в который патоген взаимодействует с тканью растения-хозяина. В этом смысле «заражение» означает возникновение контакта между патогеном и хозяином. В случае *Heterodera schachtii* цисты активируются в почве, молодые особи вылупляются по завершении развития до молодых особей второй стадии, и заражают корни растений-хозяев. Нематоды проникают в зону растяжения за верхушкой корня и инициируют трансформацию корневых клеток в синцитии (специализированные питательные структуры). Синцитии увеличиваются одновременно с развитием нематод до взрослых особей и могут привести к нарушению функционирования корней, что ограничивает урожайность и приводит к потере урожая. В отсутствие растений-хозяев *Heterodera schachtii* способен выживать в цистах в почве в течение многих лет.

«Органы» растения означают, например, листья, побег, стебель, корни, гипокотиль, вегетативные почки, меристемы, зародыши, пыльники, яйцеклетку, семена или плоды. «Части растения» включают в себя без ограничения побег или стебель, листья, цветы,

соцветия, корни, плоды и семена, а также пыльцу. Термин «части растения» также означает объединение нескольких органов, *например*, цветок или семя, или часть органа, *например*, поперечный разрез побега растения. «Тканями» растения являются, например, каллусная ткань, запасающая ткань, меристематическая ткань, ткань листа, ткань побега, ткань корня, ткань опухоли растения или репродуктивная ткань, а также камбий, паренхима, сосудистая ткань, склеренхима и эпидермис. При этом ткани не ограничиваются этим перечнем. Например, под растительными «клетками» следует понимать, например, изолированные клетки с клеточной стенкой или их скопления, или протопласты.

В отношении настоящего изобретения термин «регуляторная последовательность» относится к нуклеотидной последовательности, которая влияет на специфичность и/или силу экспрессии, *например*, в том смысле, что регуляторная последовательность придает определенную тканевую специфичность. Такая регуляторная последовательность может быть расположена против хода транскрипции от точки инициации транскрипции минимального промотора, но также и по ходу транскрипции от нее, *например*, в транскрибируемой, но не транслируемой лидерной последовательности или внутри интрона. Термин «регуляторная последовательность» может также охватывать весь промотор или цис-элемент, который пригоден для использования внутри промотора.

Термин «устойчивость» следует понимать широко, и он охватывает диапазон защиты от замедления до полного блокирования развития болезни. Одним из примеров важного патогена является *Heterodera schachtii*. Устойчивая растительная клетка по изобретению или устойчивое растение по изобретению предпочтительно достигает устойчивости к *Heterodera schachtii*, которая определяется как способность растения ограничивать размножение нематод. Например, увеличение устойчивости может быть измерено путем взятия образцов почвы и определения количества нематод и/или путем определения количества цист, образующихся на корнях растений.

«Трансгенное растение» относится к растению, в геном которого интегрирован по меньшей мере один полинуклеотид. Таким образом, он может быть гетерологичным полинуклеотидом или экзогенным полинуклеотидом. Полинуклеотид предпочтительно является стабильно интегрированным, что означает стабильную сохранность интегрированного полинуклеотида в растении, его экспрессию, а также возможность стабильной передачи потомкам. Стабильное введение полинуклеотида в геном растения также включает в себя интеграцию в геном растения предыдущего родительского поколения, при этом полинуклеотид может стабильно передаваться дальше. Термин «гетерологичный» означает, что введенный полинуклеотид происходит из клетки или

организма с другим фоновым генотипом, при этом клетка или организм могут принадлежать к тому же виду или другому виду, или являются гомологичными прокариотической или эукариотической клетке-хозяину, например, но затем располагаются в другой генетической среде и, таким образом, отличаются от соответствующего полинуклеотида, который, возможно, присутствует естественным образом. Гетерологичный полинуклеотид может присутствовать в дополнение к соответствующему эндогенному гену.

Используемый здесь термин «растение» означает любое двудольное или однодольное растение, в частности растение семейства *Amaranthaceae*, такое как *Beta vulgaris* и *Spinacia oleracea*, и *Brassicaceae*, такое как *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Eruca vesicaria subsp. sativa*.

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

Фиг. 1 Иллюстрация картирования и сборки последовательности в целевой области на хромосоме 5 (ось x: физическое расстояние в тысячах пар оснований (1 тыс. = 1 000 п.о.)):

Верхняя часть = сборка из девяти аннотированных генов (#1 – #9); направление стрелок обозначает 5'-3'-направление каждого предполагаемого гена.

Средняя часть = иллюстрации различных генетических интрогрессий образцов из явлений рекомбинации *B. vulgaris* subsp. *maritima* (BM) указаны в соответствии с их локализацией.

Нижняя часть = физическое картирование генов-кандидатов LRR1, LRR2 и LRR3 в соответствии с SEQ ID №№ 1, 4 и 7.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая способна придавать устойчивость к патогену рода *Heterodera*, если присутствует в растении, в частности, в растении вида *Beta vulgaris*, более предпочтительно в *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*. В частности, молекула нуклеиновой кислоты придает устойчивость к патогену рода *Heterodera* в растении, в котором экспрессируется полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения патогеном является *Heterodera schachtii*, который является одной из наиболее важных патогенных нематод сахарной

свеклы и может вызывать потерю урожая до 80 %. *Heterodera schachtii* может привести к значительной потере урожая не только сахарной свеклы, но и других видов свеклы, таких как красная и листовая свекла, ревень и шпинат, а также овощных культур Brassica, таких как капуста, пекинская капуста, цветная капуста, брюссельская капуста, брокколи, репа, редис и брюква, путем серьезного повреждения корневой системы.

Настоящее изобретение основано на генетическом точном картировании, идентификации, выделении и характеристике гена и локуса гена, соответственно, который происходит от донора *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, присутствие которого в растении, в частности, в *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, коррелирует с устойчивостью соответствующего растения к заражению *Heterodera* или является причиной такой устойчивости. Исходным материалом являлась популяция *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, собранная во Франции (Hijner, 1951 г.).

С помощью интенсивного точного картирования и клонирования на основе карт был идентифицирован и секвенирован локус устойчивости, позволяющий провести сравнение последовательностей между устойчивым и чувствительным эталонным генотипом (Фиг. 1). Было показано, что целевая область обладает высокой степенью сложности, поскольку локус устойчивости содержит большие дубликации последовательностей, и, в частности, в чувствительных генотипах несколько ретротранспозонов встроены в целевую область. Было установлено, что локус устойчивости содержит семь аннотированных генов, включая три тандемно повторяющихся гена LRR, которые были определены как гены-кандидаты, придающие устойчивость к *Heterodera* (LRR1, LRR2 и LRR3), причем эти три гена LRR демонстрируют сходство последовательностей.

Таким образом, настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты и к полипептиду, кодируемому указанной молекулой нуклеиновой кислоты, соответственно, предпочтительно придающим устойчивость к патогену рода *Heterodera*, в частности к *Heterodera schachtii*. Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению придает, в частности, растению рода *Beta*, устойчивость к этому патогену. Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может являться изолированной молекулой нуклеиновой кислоты. Предпочтительно это ДНК и особенно предпочтительно кДНК (кодирующая ДНК). Растение предпочтительно является растением вида *Beta vulgaris*, особенно предпочтительно растением подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*; к ним относятся, например, сорта сахарной свеклы, подсвекольника, кормовой свеклы, листовой свеклы и мангольда.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением содержит нуклеотидную последовательность, которая содержит последовательность ДНК, указанную в любом из SEQ ID №№ 1, 4 и 7, и/или кодирующую последовательность в соответствии с любым из SEQ ID №№ 2, 5 и 8. Кроме того, в настоящем изобретении предложена нуклеотидная последовательность, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью в соответствии с одним из SEQ ID №№ 3, 6 и 9.

Как упоминалось выше, ген, идентифицированный по настоящему изобретению, представляет собой ген/белок устойчивости типа NBS-LRR, который характеризуется специфическими структурными мотивами. Общая структура таких белков устойчивости в растениях уже хорошо изучена (Martin *и соавт.*, Annual Review Plant Biology, 54 (2003 г.), стр. 23-61). Однако принцип структурного варианта осуществления – в частности, того, что известно как домен LRR, который применяется в качестве потенциального домена обнаружения для большинства неизвестных патогенных эффекторов – непредсказуем, и функциональный фон генов устойчивости, *т. е.*, генетическая структура, обычно в значительной степени неизвестен. Следовательно, идентификация гена или белка, придающего устойчивость к *Heterodera*, исключительно на основе известного структурного мотива невозможна. Кроме того, область последовательности, как оказалось, имеет высокую степень сложности, поскольку локус устойчивости содержит большую дубликацию последовательности, и в чувствительных генотипах несколько ретротранспозонов встроены в целевую область, что особенно затрудняет разработку диагностических маркеров, а также сборку данных последовательности.

Кроме того, в последовательность ДНК нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению могут быть введены замещения, делеции, вставки, присоединения и/или любые другие изменения, которые по отдельности или в комбинациях фактически изменяют нуклеотидную последовательность, при этом модифицированная нуклеотидная последовательность, тем не менее, может выполнять ту же функцию, что и начальная последовательность. Рассматриваемый случай охватывает последовательность нуклеиновых кислот, содержащую последовательность ДНК, которая является аллелем или производным немодифицированной последовательности нуклеиновых кислот по настоящему изобретению и которая, если присутствует в растении, придает устойчивость к патогену рода *Heterodera*, в частности к *Heterodera schachtii*. Кроме того, в рассматриваемом случае речь идет о кодировании аминокислотной последовательности, которая придает устойчивость к патогену рода *Heterodera*, в частности к *Heterodera schachtii*. Таким образом, в дополнительном варианте

осуществления изобретение включает в себя нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, представляющий собой производное полипептида, который кодируется нуклеотидной последовательностью по настоящему изобретению, или который включает в себя аминокислотную последовательность по настоящему изобретению. Производная аминокислотная последовательность, которая имеет по меньшей мере одно замещение, делецию, вставку или присоединение одной или нескольких аминокислот, при которых функциональность кодируемого полипептида/белка сохраняется, представляет собой производное полипептида. Замещения, делеции, вставки, присоединения и/или любые другие изменения по отдельности или в комбинациях, которые фактически изменяют нуклеотидную последовательность, но выполняют ту же функцию, что и исходная последовательность, таким образом могут быть введены в нуклеотидную последовательность с использованием обычных способов, которые известны из предшествующего уровня техники, *например*, посредством сайт-направленного мутагенеза, методики TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes – целенаправленный поиск индуцированных локальных повреждений в геномах), ПЦР-опосредованного мутагенеза, химически индуцированного мутагенеза, редактирования генома и т. д.

Замещение одной аминокислоты другой аминокислотой с одинаковыми или эквивалентными или сходными химическими/физическими свойствами, называется «консервативным замещением» или «полуконсервативным замещением». Примерами физических/химических свойств аминокислоты являются, например, гидрофобия или заряд. Специалисту в данной области техники известно, какая аминокислотная замена представляет собой консервативное или полуконсервативное замещение. Более того, общие знания позволяют специалисту в данной области техники распознавать, идентифицировать и обнаруживать, какие аминокислотные делеции и присоединения безвредны для функциональности белка устойчивости, и в каких позициях они возможны. Специалисту в данной области техники известно, что в случае настоящего белка NBS-LRR для модификаций аминокислотной последовательности (замещения, делеции, вставки или присоединения одной или нескольких аминокислот) функциональность, в частности, консервативных доменов должна быть сохранена, и что таким образом в этих доменах возможны только ограниченные предыдущие модификации.

Таким образом, изобретение включает в себя функциональный фрагмент нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению. Таким образом, термин «фрагмент» включает в себя гены с нуклеотидной последовательностью, достаточно сходной с вышеупомянутой нуклеотидной последовательностью. Термин «достаточно

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

Что касается аминокислотной последовательности, то после модификации, например, с помощью вышеупомянутого способа, она также имеет общий структурный домен и/или обладает общей функциональной активностью. Нуклеотидные последовательности или аминокислотные последовательности, которые имеют по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 % или по меньшей мере 100 % идентичность с нуклеотидной последовательностью или аминокислотной последовательностью по настоящему изобретению, определены здесь как достаточно сходные. Сюда также явным образом входит диапазон от 90 % до 100 %. Для функциональных фрагментов достаточное сходство устанавливается в том случае, если нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность в целом обладает таким же свойством, что и ранее названная нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность по настоящему изобретению. Те нуклеотидные последовательности, которые кодируют производное или код для производной аминокислотной последовательности, генерируются прямо или косвенно (например, посредством стадий амплификации или репликации) из исходной нуклеотидной последовательности, которая соответствует нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению по всей длине или по меньшей мере частично.

Соответственно, настоящее изобретение включает в себя нуклеотидную последовательность, которая способна гибридизоваться в строгих условиях с нуклеотидной последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению или нуклеотидной последовательности, которая кодирует аминокислотную последовательность по настоящему изобретению, и при этом указанная нуклеотидная последовательность, предпочтительно присутствующая и/или экспрессирующая в растении, способна придавать устойчивость к патогену рода *Heterodera*.

Кроме того, общеизвестно, что генетический код является избыточным, тем самым демонстрируя множество комбинаций кодонов из трех пар оснований, которые определяют аминокислоту. Таким образом, настоящее изобретение включает в себя

вариантную последовательность ДНК вследствие вырожденности генетического кода, которая, тем не менее, по-прежнему предпочтительно, если присутствует и/или экспрессируется в растении, способна придавать устойчивость к патогену рода *Heterodera*.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению по отдельности или в комбинации придает (придают) устойчивость к патогену рода *Heterodera*, предпочтительно если присутствуют и/или экспрессируются в растении, более предпочтительно, если устойчивость к патогену рода *Heterodera* является устойчивостью к *Heterodera schachtii* и/или растение представляет собой растение подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*.

Описанные комбинации молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению или локуса устойчивости по настоящему изобретению отличаются тем, что, предпочтительно когда они присутствуют в растении и/или при экспрессии в растении, они придают доминирующий эффект устойчивости к патогену рода *Heterodera*, предпочтительно к *Heterodera schachtii*, или что они кодируют полипептиды, которые способны придавать доминирующий эффект устойчивости к патогену рода *Heterodera*, предпочтительно к *Heterodera schachtii*.

Соответственно, в одном варианте осуществления настоящего изобретения комбинация по меньшей мере двух или трех молекул нуклеиновых кислот придает устойчивость к патогену рода *Heterodera*, в частности к *Heterodera schachtii*, предпочтительно когда она присутствует и/или экспрессируется в растении, предпочтительно в растении подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, при этом по меньшей мере две или три молекулы нуклеиновой кислоты выбраны из группы, состоящей из:

(а) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению, которая включает последовательность ДНК, указанную в SEQ ID № 1, последовательность кДНК, указанную в SEQ ID № 2, которая гибридизуется с комплементарной последовательностью нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID № 1 или 2, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID № 3, и/или которая является одним из вышеупомянутых аллелей, производных или вариантов нуклеиновой и аминокислотной последовательности;

(b) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению, которая включает последовательность ДНК, указанную в SEQ ID № 4, последовательность кДНК, указанную в SEQ ID № 5, которая гибридизуется с комплементарной последовательностью нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID № 4 или 5, которая кодирует полипептид,

имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID № 6, и/или которая является одним из вышеупомянутых аллелей, производных или вариантов нуклеиновой и аминокислотной последовательности;

(с) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению, которая включает последовательность ДНК, указанную в SEQ ID № 7, последовательность кДНК, указанную в SEQ ID № 8, которая гибридизуется с комплементарной последовательностью нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID № 7 или 8, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID № 9, и/или которая является одним из вышеупомянутых аллелей, производных или вариантов нуклеиновой и аминокислотной последовательности.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения комбинация двух молекул нуклеиновых кислот, описанных в пп. (а) и (b), придает устойчивость к *Heterodera*, в частности к *Heterodera schachtii*, если присутствует в растении, предпочтительно в растении вида *Beta vulgaris*.

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения комбинация двух молекул нуклеиновых кислот, описанных в пп. (а) и (с), придает устойчивость к *Heterodera*, в частности к *Heterodera schachtii*, если присутствует в растении, предпочтительно в растении вида *Beta vulgaris*.

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения комбинация двух молекул нуклеиновых кислот, описанных в пп. (b) и (с), придает устойчивость к *Heterodera*, в частности к *Heterodera schachtii*, если присутствует в растении, предпочтительно в растении вида *Beta vulgaris*.

Комбинация может представлять собой одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты. При этом данная комбинация также может быть включена в набор. Если комбинация включена в набор, нуклеиновые кислоты (а) (b) и/или (с) комбинации, описанной выше, могут быть частью одной молекулы нуклеиновой кислоты или могут быть частью отдельных молекул нуклеиновой кислоты.

В данном контексте полипептиды/белки, кодируемые комбинацией, определенной выше, также являются частью изобретения. Комбинация белков может быть включена в набор, который также является частью изобретения.

Кроме того, частью изобретения является растение, которое содержит комбинацию молекул нуклеиновых кислот, описанных выше. Комбинация может стать частью растения трансгенным или эндогенным способом. Кроме того, одна или две из последовательностей могут стать частью растения в качестве трансгенов, в то время как

другие одна или две последовательности становятся частью растений в качестве эндогенов.

В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению отличается тем, что, предпочтительно если она присутствует в растении или экспрессируется в растении, она уже сама по себе придает доминирующий эффект устойчивости к патогену рода *Heterodera*, предпочтительно к *Heterodera schachtii*, или что она кодирует полипептид, который способен придавать доминирующий эффект устойчивости к патогену рода *Heterodera*.

Таким образом, в одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, описанная в п. (b) в контексте комбинации молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, придает устойчивость к патогену рода *Heterodera*, в частности к *Heterodera schachtii*, предпочтительно если присутствует и/или экспрессируется в растении, в частности в растении подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*.

В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, описанная в п. (c) в контексте комбинации молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, придает устойчивость к патогену рода *Heterodera*, в частности к *Heterodera schachtii*, предпочтительно если присутствует и/или экспрессируется в растении, в частности в растении вида *Beta vulgaris*.

В предпочтительном варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, описанные в п. (a) в контексте комбинации молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, придают устойчивость к патогену рода *Heterodera*, в частности к *Heterodera schachtii*, если присутствуют и/или экспрессируются в растении, в частности в растении подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*.

Как уже описано выше, до настоящего времени растения *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, устойчивые к *Heterodera*, не могли быть получены без введения часто нежелательных признаков, таких как, например, снижение урожайности из-за наследования дополнительных генов, связанных с положительным признаком устойчивости к *Heterodera*. Таким образом, недостаток сортов, обладающих описанной устойчивостью, заключается в большой трудоемкости и сложности разработки сорта вследствие сложной наследственности, и у таких сортов заметно более низкие показатели урожайности по сравнению с обычными сортами при отсутствии заражения. Помимо прочего, это может быть связано с эпигенетическим взаимодействием некоторых генов устойчивости с генами, отвечающими за выработку сахара, что приводит к снижению приспособленности растений в отсутствие патогена.

Кроме того, для устойчивой селекции против свекловичной цистообразующей нематоды, то есть, для противодействия опасности вариантов *Heterodera schachtii*, преодолевающих устойчивость, необходимо постоянно выявлять новые гены устойчивости и интегрировать их в генные пулы культурных растений, таких как сахарная свекла.

В этом контексте авторы изобретения впервые выделили и идентифицировали новый ген устойчивости к *Heterodera*, который может быть использован для значительно упрощенной селекции. Благодаря целенаправленному и упрощенному включению этого гена в элитные линии, сейчас стало возможным очень быстрое выведение очень высокоурожайных сортов с высокой устойчивостью к *Heterodera* и обеспечение наличия дополнительного гена устойчивости, который может быть использован для борьбы с вариантами *Heterodera*, преодолевшими традиционную устойчивость. Возможные образцы для интрогрессии одной или нескольких из последовательностей, придающих устойчивость по настоящему изобретению, могут быть получены, например, путем скрининга популяций *B. vulgaris subsp. maritima*. Скрининг может основываться на идентификации растения, содержащего одну или несколько последовательностей, придающих устойчивость по настоящему изобретению. Идентификация может происходить так, как описано в других разделах настоящего документа. Предпочтительно скрининг или идентификация включают в себя использование молекулярных маркеров для диагностики локуса устойчивости. Кроме того, растения, содержащие последовательности, придающие устойчивость, могут быть приобретены у компании СРО Wageningen, Postbus 18, 6700 AA Wageningen/Нидерланды, например, из образца ВМН.

Соответственно, в рамках настоящего изобретения впервые представлено растение *Beta vulgaris subsp. vulgaris* как растение сахарной свеклы, растение листовой свеклы, растение красной свеклы или подсвекольника, растение кормовой свеклы, обладающее устойчивостью по настоящему изобретению к патогену рода *Heterodera*, в частности к *Heterodera schachtii*, и, таким образом, охватываемое настоящим изобретением. Поскольку все перечисленные растения являются культивируемыми растениями, культурами или растениями, пригодными для сельскохозяйственного выращивания, и обладающими устойчивостью по настоящему изобретению, они являются частью изобретения. В частности, частью изобретения являются такие культуры, которые содержат подземный запасующий орган, пригодный для использования в качестве пищи, сырья или промышленного источника сахаров или другого химического соединения, и которые содержат устойчивость по настоящему изобретению, и являются дополнительным аспектом настоящего изобретения. Запасующим органом может

являться, например, свекловичное тело сахарной свеклы, содержащее сахарозу, потребляемое свекловичное тело красной свеклы или кормовое свекловичное тело кормовой свеклы. Подземный запасующий орган может образовывать более 50 %, а для сахарной свеклы – даже более 70 % от общей биомассы взрослого растения. Кроме того, семена или посевной материал этих растений также являются частью изобретения. Семена или посевной материал могут быть технически обработаны, как подробно описано ниже.

В данном контексте изобретение также включает в себя нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок в соответствии с любым из SEQ ID №№ 3, 6 и 9, при этом в конкретном варианте осуществления исключается встречающаяся в природе нуклеиновая кислота в соответствии с любым из SEQ ID №№ 1, 4 и 7.

Кроме того, настоящее изобретение относится к рекомбинантной и/или гетерологичной молекуле ДНК, которая содержит последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Кроме того, данная молекула ДНК предпочтительно имеет регуляторную последовательность. Таким образом, она может быть оперативно связана с этой регуляторной последовательностью или находиться под влиянием этой регуляторной последовательности. Данная регуляторная последовательность предпочтительно является промоторной последовательностью и/или другими последовательностями элементов, контролирующими транскрипцию или трансляцию, например, цис-элементов. Регуляторная последовательность, которая контролирует экспрессию гена, включающего в себя молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой последовательность, способную обеспечивать или модулировать экспрессию в результате патогенной инфекции. Этот промотор предпочтительно способен контролировать экспрессию последовательности ДНК конкретно в корнях растения. Регуляторная последовательность может быть гетерологична экспрессирующей последовательности. Преимущество такого подхода заключается в том, что специалист в данной области техники может лучше регулировать скорость экспрессии последовательности, подлежащей экспрессии, ткань, в которой происходит экспрессия, и момент времени, в который происходит экспрессия, поскольку он выбирает ту регуляторную последовательность, которая наилучшим образом подходит для соответствующего варианта использования. Гетерологичная последовательность ДНК предпочтительно включает нуклеотидную последовательность, которая кодирует 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 (которые называются генами авирулентности (*Avr-генами*))). Гетерологичная

последовательность ДНК может быть одной из последовательностей ДНК по настоящему изобретению. Гетерологичная последовательность ДНК может также дополнительно кодировать дополнительные компоненты защиты растений от патогенов. Следовательно, гетерологичная последовательность ДНК может быть сконструирована таким образом, чтобы после ее транскрипции была образована полицистронная мРНК.

Кроме того, настоящее изобретение относится к полипептиду, который может быть кодирован молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и ее функционально и/или иммунологически активным фрагментом, а также к антителу, которое специфически связывается с полипептидом или с его фрагментом. Полипептид особенно предпочтительно имеет аминокислотную последовательность в соответствии с любым из SEQ ID №№ 3, 6 или 9. Рекомбинантное получение белков, полипептидов и фрагментов знакомо специалисту в данной области техники (Sambrook *и соавт.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001 г., или Wingfield P. T., 2008 г., Production of Recombinant Proteins, Current Protocols in Protein Science, 52:5.0:5.0.1–5.0.4). Поликлональные или моноклональные антитела к белку по настоящему изобретению могут быть получены специалистом в данной области техники в соответствии с известными способами (E. Harlow *и соавт.*, редактор, Antibodies: A Laboratory Manual (1988 г.)). Получение моноклональных антител, а также фрагментов Fab и F(ab')₂, которые также полезны для способов обнаружения белка, может быть выполнено с помощью различных традиционных способов (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, стр. 98-118, Нью-Йорк, Academic Press (1983 г.)). Затем антитела могут быть использованы для скрининга библиотек экспрессирующих кДНК в целях идентификации идентичных, гомологичных или гетерологичных генов посредством иммунологического скрининга (Sambrook *и соавт.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 1989 г., или Ausubel *и соавт.*, 1994 г., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons), или могут быть использованы для вестерн-блоттинга. В частности, настоящее изобретение относится к антителам, которые избирательно обнаруживают полипептид, кодируемый аллелем, придающим устойчивость к *Heterodera* по настоящему изобретению, и, по существу, не обнаруживают полипептид, кодируемый соответствующим чувствительным аллелем, *т. е.* они обнаруживают в 2 раза, предпочтительно в 5 раз и более предпочтительно в 10 или более раз меньше полипептидов, кодируемых соответствующим чувствительным аллелем, чем полипептидов, кодируемых аллелем, придающим устойчивость к *Heterodera* по настоящему изобретению.

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

Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут быть связаны с флуоресцентным красителем, чтобы их можно было использовать, например, в иммуногистохимическом методе и вызывать окраску антител. В качестве флуоресцентного красителя может использоваться флуорохром. Антитела по настоящему изобретению могут также присутствовать в связи с другими сигнальными молекулами. В их число входят, например, биотин, радиоизотопы, репортерные ферменты, такие как щелочная фосфатаза, или олигонуклеотиды.

Дополнительным предметом изобретения являются векторы или экспрессионные кассеты, которые включают в себя молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу рекомбинантной ДНК по настоящему изобретению, возможно, под контролем регуляторных элементов и, в частности, под контролем функциональных регуляторных элементов в растениях, а также маркеров отрицательного и/или положительного отбора. Таким образом, остов вектора является гетерологичным молекуле нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, что означает, что такой вектор не встречается в природе и не может быть выделен из природы. Вектор представляет собой плазмиду, космиду, фаг или вектор экспрессии, вектор трансформации, челночный вектор или вектор клонирования; он может быть двухцепочечным или одноцепочечным, линейным или кольцевым; или он может трансформировать прокариотический или эукариотический организм путем интеграции в его геном или внехромосомно. Молекула нуклеиновой кислоты или молекула ДНК по настоящему изобретению в экспрессионном векторе или экспрессионной кассете предпочтительно функционально связана с одной или несколькими регуляторными последовательностями, которые обеспечивают транскрипцию и необязательно экспрессию в прокариотической или эукариотической клетке; (Sambrook *и соавт.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001 г.). Эти регуляторные последовательности предпочтительно являются промоторами или терминаторами, в частности, начальной точкой инициации транскрипции, местоположением связывания с рибосомой, сигналом обработки РНК, местоположением завершения транскрипции и/или сигналом полиаденилирования. Например, молекула нуклеиновой кислоты находится здесь под контролем подходящего промотора и/или терминатора. Подходящими промоторами могут быть конститутивные промоторы (пример: промотор 35S из “Cauliflower mosaic virus” (Odell *и соавт.*, *Nature*, 313 (1985 г.), стр. 810 - 812); особенно

подходящими являются те промоторы, которые являются патогенно индуцируемыми (пример: промотор PR1 из петрушки (Rushton *и соавт.*, EMBO J., 15 (1996 г.), 5,690–5,700)). Особенно подходящими патогенно-индуцируемыми промоторами являются синтетические или химерные промоторы, которые не встречаются в природе, состоят из множества элементов и содержат минимальный промотор, и имеют по меньшей мере один *цис*-регуляторный элемент против хода транскрипции от минимального промотора, при этом по меньшей мере один *цис*-регуляторный элемент служит местом связывания для специальных факторов транскрипции. Химерные промоторы разрабатываются 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 (*Depicker и соавт.*, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982 г.), стр. 561-573). Подходящими промоторами и терминаторами также могут быть нативный промотор и нативный терминатор. Векторы или экспрессионные кассеты дополнительно содержат обычные индикаторные/репортерные гены или гены устойчивости для обнаружения переноса желаемого вектора или молекулы ДНК/молекулы нуклеиновой кислоты и для отбора особей, которые их содержат, поскольку прямое обнаружение посредством экспрессии гена по большей части довольно затруднено. Поскольку молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению сама кодирует полипептид, который придает устойчивость к свекловичной цистообразующей нематоде, то обеспечение наличия дополнительного гена устойчивости для экспрессии в растительных клетках не обязательно, но рекомендуется в целях быстрой селекции.

Примерами индикаторных/репортерных генов являются, например, ген люциферазы и ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP). Кроме того, они также позволяют проводить тесты на активность и/или регуляцию промотора гена. Примерами генов устойчивости, особенно для трансформаций растений, являются ген неомицинофосфотрансферазы, ген гигромицинофосфотрансферазы или ген, кодирующий фосфинотрицинацетилтрансферазу. Дополнительными маркерами положительного отбора могут быть ферменты, которые обеспечивают трансформированному растению селекционное преимущество перед нетрансформированным растением, в частности, преимущество в питании, *например*, манноза-6-фосфатизомераза или ксилоизомераза. Однако это не исключает дополнительные индикаторные/репортерные гены или гены устойчивости, известные специалисту в данной области техники. В предпочтительном варианте осуществления вектор представляет собой растительный вектор. Кроме того, экспрессионная

кассета может присутствовать в виде экспрессионной кассеты, интегрированной в геном растения.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к клеткам, которые включают векторы, молекулы рекомбинантной ДНК и/или молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Клетка в смысле изобретения может быть прокариотической (например, бактериальной) или эукариотической клеткой (например, растительной клеткой 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 также может присутствовать в виде культуры. Следовательно, изобретение также охватывает культуру клеток, которая содержит такие клетки. Культура клеток предпочтительно представляет собой чистую культуру или изолят, который не содержит клетки другого типа.

Специалисту в данной области техники известны не только многочисленные способы, например, конъюгация или электропорация, посредством которых он может вводить молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, молекулу рекомбинантной ДНК и/или вектор или экспрессионную кассету по настоящему изобретению в агробактерию, так и разнообразные способы трансформации (биологическая трансформация, трансформация, опосредованная агробактериями), посредством которых он может вводить молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, молекулу ДНК и/или вектор настоящего изобретения в растительную клетку (Sambrook *и соавт.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001 г.)

Кроме того, настоящее изобретение предпочтительно относится к растению, устойчивому к Heterodera, предпочтительно к растению вида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* или его части, которое содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, придающую устойчивость к Heterodera. Растение, устойчивое к Heterodera, может содержать молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в качестве трансгена или в качестве эндогена. В рамках изобретения впервые были получены растения подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Данное изобретение также включает растения подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в качестве эндогена.

Таким образом, часть может представлять собой клетку, ткань, орган или комбинацию нескольких клеток, тканей или органов. Примером комбинации нескольких органов является цветок или семя. Растение, устойчивое к *Heterodera*, по настоящему изобретению предпочтительно демонстрирует более сильную устойчивость к *Heterodera*, в частности, к *Heterodera schachtii*, чем соответствующее растение, которое не содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению (контрольное растение). В идеале контрольное растение имеет генотип, идентичный генотипу растения по настоящему изобретению, и выращено в идентичных условиях, но не содержит молекулу нуклеиновой кислоты, придающую устойчивость. Уровень устойчивости, *например*, к патогену рода *Heterodera*, в частности *Heterodera schachtii*, может быть качественно определен у растений рода *Beta* путем определения оценочных баллов (см., например, Пример 1). Более высокая устойчивость проявляется в улучшении устойчивости по меньшей мере на один оценочный балл, по меньшей мере на два оценочных балла и предпочтительно по меньшей мере на три или более оценочных балла.

Растительная клетка или растение, или его часть по настоящему изобретению, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, в частности, растение рода *Beta*, предпочтительно проявляет более высокую устойчивость к патогену рода *Heterodera*, в частности, к *Heterodera schachtii*, чем соответствующая растительная клетка или растение, или его часть, которые не содержат молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, или могут содержать чувствительный аллельный вариант молекулы нуклеиновой кислоты. Уровень устойчивости к патогену рода *Heterodera*, *например*, к *Heterodera schachtii*, может быть качественно определен у растений рода *Beta* путем определения оценочных баллов. Более высокая устойчивость проявляется в улучшении устойчивости по меньшей мере на один оценочный балл, по меньшей мере на два оценочных балла и предпочтительно по меньшей мере на три или более оценочных балла.

В случае трансгенной растительной клетки, или растения, или его части, они содержат молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу ДНК по настоящему изобретению в виде трансгена или вектора, или экспрессионной кассеты по настоящему изобретению. Такой трансгенной растительной клеткой или растением, или его частью являются, например, растительная клетка, растение или его часть, трансформированные – предпочтительно стабильно – молекулой нуклеиновой кислоты, молекулой ДНК по настоящему изобретению или вектором, или экспрессионной кассетой по настоящему изобретению. В предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с одной или несколькими регуляторными

последовательностями, которые обеспечивают транскрипцию и, необязательно, экспрессию в растительной клетке. Общая структура, состоящая из молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и регуляторной (регуляторных) последовательности (последовательностей), затем представляет собой трансген. Такими регуляторными последовательностями являются, например, промотор или терминатор. Специалисту в данной области техники известны многочисленные функциональные промоторы и терминаторы, которые применимы в растениях.

Изобретение также включает в себя вакуоль клетки по настоящему изобретению и запасаемые в ней вещества содержания (такие как сахароза).

Кроме того, изобретение также относится к клеточному экстракту из клетки, предпочтительно, из растительной клетки, очень предпочтительно из клетки *Beta vulgaris* и, особенно предпочтительно, из клетки одной из следующих культур: сахарной свеклы, листовой свеклы или подснекольника. Ни одно растение не может быть регенерировано из клеточного экстракта. Аналогичным образом, изобретение охватывает геном растения, содержащий нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению. Ни одно растение не может быть регенерировано из генома растения как такового.

Таким образом, концентрация сахара или сахарозы в клеточном экстракте может быть увеличена по сравнению с клеткой, которая не является клеткой по настоящему изобретению, но которая принадлежит к тому же виду или культуре. Это относится, в частности, к условиям заражения патогеном рода *Heterodera*.

Изобретение также охватывает использование клеточного экстракта для производства сахара (сахарозы) или для производства (сырого) сока, предпочтительно свекольного (сырого) сока.

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

Дополнительным аспектом изобретения является семенной материал, содержащий семена, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может присутствовать трансгенно или эндогенно. Семенной материал и семена могут быть технически обработаны. Таким образом, изобретение также включает в себя 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 семенной материал может присутствовать в шлифованном виде. Таким образом, удаляется самый внешний слой семени, чтобы семя приобретало

более округлую форму. Это полезно при посеве: оптимально равномерная форма приводит к равномерному распределению зерен семенного материала. Кроме того, технически обработанный семенной материал включает в себя дражированный семенной материал. Таким образом, семенной материал помещают в массу для дражирования, которая защищает содержащийся в ней семенной материал и приводит к увеличению массы таким образом, чтобы дражированный семенной материал демонстрировал большую сопротивляемость ветровому сносу и, таким образом, был менее подвержен сдуванию ветром, и, в то же время, было обеспечено более точное позиционирование во время посева. В предпочтительном варианте осуществления изобретения все зерна дражированного семенного материала из партии или единицы, предназначенной для продажи, имеют существенно одинаковую форму и одинаковую массу. Возможны отклонения в диаметре и массе на 5%. Однако отклонения предпочтительно не превышают 1%. Масса для дражирования в качестве одного из основных компонентов может содержать, например, минеральное соединение, такое как, например, глина и/или торф. Дополнительные возможные компоненты указаны в US 4,067,141. Кроме того, масса для дражирования может содержать дополнительные химические вещества, которые положительно влияют на культивацию на практике. В данном случае это могут быть вещества, которые относятся к числу удобрений. Кроме того, это могут быть фунгициды, инсектициды и/или антифидантные вещества. Фунгициды могут быть представлены тиразолом и/или гимексазолом, и/или другими фунгицидами. Инсектицид может представлять собой вещество из группы неоникотиноидов. Вещество из группы неоникотиноидов предпочтительно представляет собой имидаклоприд (код АТС: QP53AX17) и/или клотианидин (номер CAS 210880-92-5). Кроме того, инсектицид также может представлять собой цифлутрин (номер CAS 68359-37-5) или бета-цифлутрин.

Дражированный семенной материал представляет собой конкретный вариант протравленного семенного материала. В этом контексте технически обработанный семенной материал также включает в себя протравленный семенной материал. Однако изобретение не ограничивается дражированным семенным материалом, а, скорее, может относиться к любой форме протравленного семенного материала. Таким образом, изобретение также относится к протравленному семенному материалу, который включает в себя дражированный семенной материал, но не ограничивается им. Таким образом, также включаются сухое протравливание, влажное протравливание и суспензионное протравливание. Таким образом, протравливание также может содержать по меньшей мере один краситель, чтобы протравленный семенной материал можно было быстро отличить от непротравленного семенного материала, и, кроме того, была обеспечена

хорошая видимость в окружающей среде после посева. Протравливание также может содержать те агрохимикаты, которые описаны в контексте массы для дражирования. Таким образом, изобретение включает в себя такой протравленный семенной материал, при котором протравливание содержит по меньшей мере одно антифидантное средство, такое как инсектицид и/или по меньшей мере один фунгицид. Необязательно может быть применено так называемое электронное протравливание (протравливание с использованием электрической энергии). Однако электронное протравливание не является протравливанием в строгом смысле этого слова.

Дополнительной формой технически обработанного семенного материала является инкрустированный семенной материал. В данном контексте также говорится о том, что называется покрытием, а также о семенном материале, обработанном покрытием. Отличие от дражированного семенного 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. Дополнительной формой технически обработанного семенного материала является пророщенный или примированный семенной материал. Пророщенный семенной материал предварительно обрабатывают посредством предварительного проращивания, а примированный семенной материал предварительно обрабатывают посредством прайминга («проращивания»). Преимущество предварительно пророщенного и примированного семенного материала заключается в более коротком времени появления всходов. В то же время, момент времени появления всходов после посева более сильно синхронизирован. Это позволяет улучшить агротехническую обработку во время выращивания и особенно во время сбора урожая, и, кроме того, увеличивает количество урожая. При предварительном проращивании семенной материал проращивают до тех пор, пока корешок не выйдет из оболочки семенного материала, и впоследствии процесс останавливают. При прайминге процесс останавливается до выхода корешка из оболочки семенного материала. По сравнению с предварительно пророщенным семенным материалом семенной материал, подвергнутый праймингу, нечувствителен к нагрузкам, связанным с повторной сушкой, и после такой повторной сушки имеет более длительный срок хранения по сравнению с предварительно пророщенным семенным материалом, для которого повторная сушка обычно не рекомендуется. В данном контексте технически предварительно обработанный семенной материал также включает в себя примированный и повторно высушенный семенной материал. Процесс предварительного проращивания описан в US 4 905 411 A. Различные варианты осуществления прайминга описаны в EP 0 686 340 A1. В дополнение к этому, также возможно дражирование семенного материала одновременно с праймингом в одном процессе. Этот способ описан в

EP 2 002 702 B1. Настоящее изобретение охватывает примированный семенной материал, который, кроме того, дражирован.

Технически обработанный семенной материал может быть дополнительно снабжен одним или несколькими из описанных выше средств защиты от гербицидов. Это позволяет дополнительно улучшить агротехническую культивацию, поскольку технически обработанный семенной материал может быть размещен на поле, которое ранее было обработано гербицидом и, следовательно, не содержит сорные растения.

В дополнение к этому, изобретение также охватывает смесь, содержащую семенной материал по настоящему изобретению или семена по настоящему изобретению, и массу для протравливания, как определено выше. Таким образом, масса для протравливания предпочтительно осуществлена в виде массы для дражирования, как определено выше.

При хранении семенного материала по настоящему изобретению предпочтительно выбирать условия хранения, которые не оказывают отрицательного влияния на стабильность или срок хранения семенного материала. В данном случае колебания влажности, в частности, могут оказать неблагоприятное воздействие. Частью изобретения является способ хранения семенного материала в контейнере, который является одновременно водоотталкивающим и воздухопроницаемым. Такой контейнер может быть выполнен в виде коробки. Такая коробка необязательно может иметь внутреннюю пароизоляцию. Если коробка выполнена в виде двухслойной коробки, ее стабильность повышается. Семенной материал по настоящему изобретению, который включает в себя такой контейнер и такую коробку, или технически обработанный семенной материал по настоящему изобретению также является частью изобретения. Аналогичным образом, частью изобретения является хранение семенного материала по настоящему изобретению или технически обработанного семенного материала по настоящему изобретению в такой коробке.

В одном варианте осуществления растение по настоящему изобретению представляет собой гибридное растение или двойное гаплоидное растение. Гибридные растения и двойные гаплоидные растения не встречаются в природе и не могут быть выделены из природы. В дополнительном варианте осуществления растения по настоящему изобретению молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению присутствует в гетерозиготной или гомозиготной форме. В случае гибридного растения молекула нуклеиновой кислоты также может присутствовать в гемизиготной форме. Изобретение также охватывает гибридные семена и двойные гаплоидные семена, которые

содержат нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению или полипептид по настоящему изобретению.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения включает в себя растение, предпочтительно вида *Beta vulgaris*, которое отличается тем, что устойчивость к патогену рода *Heterodera* у этого растения дополнительно повышена. Например, это может быть реализовано посредством «пирамидирования генов», т. е. устойчивость повышается с использованием этого эффекта дозы. Для этой цели растения по настоящему изобретению, содержащие аллель, придающий устойчивость к *Heterodera*, подвергаются сверхтрансформации с помощью этого аллеля устойчивости, чтобы увеличить количество транскрипции гена в растении. Альтернативный подход включает в себя редактирование гена/сайт-направленный мутагенез или опосредованную методикой TILLING модификацию нативного промотора аллеля, придающего устойчивость, в целях увеличения скорости его экспрессии, или модификацию самого аллеля гена LRR, придающего устойчивость, в целях повышения его активности или стабильности. Такой способ повышения активности посредством модификации гена устойчивости описан, например, в WO 2006/128444 A2 и может быть осуществлен посредством методик, известных специалисту в данной области техники. Дополнительный подход может включать в себя слияние молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению с гетерологичным промотором, который проявляет более высокую активность по сравнению с нативным промотором, в частности, при инфицировании *Heterodera*.

В другом варианте осуществления растение по настоящему изобретению дополнительно, трансгенно или эндогенно, содержит вторую молекулу нуклеиновой кислоты в другой позиции в геноме, которая кодирует полипептид, способный придавать устойчивость к *Heterodera* в растении, в котором экспрессируется полипептид. Например, один или несколько генов устойчивости или локусов устойчивости, которые описаны в предшествующем уровне техники, могут, в той мере, в какой они еще не присутствуют в исходном генотипе, быть введены в настоящее растение посредством скрещивания, трансформации, репарации, направляемой гомологией или гомологичной рекомбинации в растении. К ним относится, например, ген Hs1pro-1 *B. procumbens* (Cai и соавт., Science, 275 (1997 г.), стр. 832-834).

Повышение устойчивости может происходить посредством интеграции молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в геном по меньшей мере одной клетки растения вида *Beta vulgaris*, а также возможной регенерации растения из растительной клетки. Интеграция может происходить как путем полового скрещивания, например, с одним из вышеупомянутых подвидов *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, и

последующей селекции, или посредством репарации, направляемой гомологией, или гомологичной рекомбинации. Два последних упомянутых способа предпочтительно поддерживаются сайт-направленными нуклеазами, которые могут быть выбраны из следующих нуклеаз без ограничения ими: нуклеаза CRISPR, включая нуклеазу Cas9, CasX, CasY или Cpf1, нуклеаза TALE, цинк-пальцевая нуклеаза, мегануклеаза, нуклеаза Аргонавта, эндонуклеаза рестрикции, включая FokI или ее вариант, рекомбиназа, или две сайт-специфичные никующие эндонуклеазы.

Альтернативный подход включает в себя увеличение экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в растении. Это может происходить посредством модификации нативного промотора, причем модификация предпочтительно происходит посредством редактирования гена или сайт-направленного мутагена, который опосредуется сайт-направленными нуклеазами, и, необязательно, моделями репарации. Примеры таких нуклеаз уже приводились выше. Увеличение экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может также происходить посредством слияния молекулы нуклеиновой кислоты с гетерологичным промотором, который проявляет более высокую активность по сравнению с нативным промотором, в частности, после инфицирования *Heterodera*. Слияние также может происходить посредством сайт-направленной нуклеазы и моделей репарации, а также посредством прямой вставки после двухцепочечного разрыва.

Как уже упоминалось выше, способ усиления устойчивости к *Heterodera* также может привести к увеличению активности и/или стабильности полипептида по настоящему изобретению посредством модификации нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Такой способ повышения активности посредством модификации гена устойчивости описан, например, в WO 2006/128444 A2 и может быть осуществлен посредством методик, известных специалисту в данной области техники. Этот подход подробно объясняется ниже.

Используемый здесь термин «сайт-направленная нуклеаза» (SDN) обозначает фермент, способный индуцировать разрыв двухцепочечной ДНК в конкретной нуклеотидной последовательности, называемой «сайтом распознавания». Например, SDN может быть выбрана из группы, состоящей из мегануклеазы, эффекторной нуклеазы TAL, цинк-пальцевой нуклеазы, систем CRISPR, таких как CRISPR/Cas9, CRISPR/Cpf1, CRISPR/CasX или CRISPR/CasY. Эндонуклеазы по методу RARE-расщепления представляют собой SDN, которые имеют сайт распознавания предпочтительно примерно из 14 – 70 последовательных нуклеотидов и, следовательно, имеют очень низкую частоту расщепления даже в более крупных геномах, таких как большинство геномов растений.

Хоминг-эндонуклеазы, также называемые мегануклеазами, представляют собой семейство таких эндонуклеаз по методу RARE-расщепления. Они могут кодироваться интронами, независимыми генами или промежуточными последовательностями и обладать замечательными структурными и функциональными свойствами, которые отличают их от более классических ферментов рестрикции, обычно из бактериальных систем рестрикции-модификации типа II. Их сайты распознавания имеют общую асимметрию, которая контрастирует с характерной диадной симметрией большинства сайтов распознавания ферментов рестрикции. Было показано, что несколько хоминг-эндонуклеаз, кодируемых интронами или интеинами, способствуют хомингу их соответствующих генетических элементов в аллельные безинтронные или безинтеиновые сайты. Образуя сайт-специфичный двухцепочечный разрыв в безинтронных или безинтеиновых аллелях, эти нуклеазы создают рекомбиногенные концы, которые участвуют в процессе преобразования гена, дублирующего кодирующую последовательность и приводящего к вставке интрона или промежуточной последовательности на уровне ДНК. Перечень других мегануклеаз по методу RARE-расщепления и их соответствующих сайтов распознавания приведен в таблице I в WO 03/004659 (стр. 17 – 20) (включен в настоящий документ посредством ссылки).

Кроме того, существуют способы создания специально подобранных эндонуклеаз по методу RARE-расщепления, которые распознают практически любую выбранную целевую нуклеотидную последовательность. Вкратце, химерные ферменты рестрикции могут быть получены с использованием гибридов между цинк-пальцевым доменом, предназначенным для распознавания специфической нуклеотидной последовательности, и неспецифическим доменом расщепления ДНК из природного фермента рестрикции, такого как FokI. Такие способы описаны, например, в WO 03/080809, WO 94/18313 или WO 95/09233 и в Isalan и соавт., 2001 г., *Nature Biotechnology*, 19, стр. 656- 660; Liu и соавт., 1997 г., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5525-5530).

Другой пример специально разработанных эндонуклеаз включает в себя так называемые нуклеазы TALE (TALEN), которые основаны на эффекторах, подобных активаторам транскрипции (TALE) из бактериального рода *Xanthomonas*, слитых с каталитическим доменом нуклеазы (например, FokI или ее варианта). Специфичность связывания ДНК этих TALE определяется вариабельными сдвоенными остатками повтора (RVD) тандемно расположенных единиц повтора 34/35 аминокислот таким образом, что один RVD специфически распознает один нуклеотид в целевой ДНК. Единицы повтора могут быть собраны для распознавания практически любых целевых последовательностей и слиты с каталитическим доменом нуклеазы, образуя эндонуклеазы, специфичные для

последовательности (см., например, Boch и соавт., 2009 г., *Science*, 326: стр. 1509-1512; Moscou и Bogdanove, 2009 г., *Science*, 326: стр. 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). В WO2012/138927 далее описаны мономерные (компактные) TALEN и TALEN с различными каталитическими доменами и их комбинациями.

Недавно был описан новый тип адаптируемой эндонуклеазной системы – так называемой системы CRISPR/Cas. Система CRISPR в ее естественной среде описывает молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну небольшую и индивидуальную некодирующую РНК в комбинации с нуклеазой Cas или другой нуклеазой CRISPR, такой как нуклеаза Cpf1 (Zetsche и соавт., Cpf1 Is a Single RNA-Guides Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System, *Cell*, 163, стр. 1-13, октябрь 2015 г.), которая может образовать специфический двухцепочечный разрыв ДНК. В настоящее время системы CRISPR подразделяются на два 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 г.). В искусственных системах CRISPR синтетическую некодирующую РНК и нуклеазу CRISPR и/или необязательно модифицированную нуклеазу CRISPR, модифицированную для действия в качестве никазы или лишенную какой-либо функции нуклеазы, можно использовать в комбинации по меньшей мере с одной синтетической или искусственной гидовой РНК или гРНК, сочетающей функцию крРНК и/или тракрРНК (Макарова и соавт., 2015 г., см. выше). Иммунный ответ, опосредуемый CRISPR/Cas в естественных системах, требует CRISPR-РНК (крРНК), причем созревание этой гидовой РНК, которая контролирует специфическую активацию нуклеазы CRISPR, значительно различается между различными системами CRISPR, охарактеризованными до настоящего времени. Во-первых, инвазивная ДНК, также называемая спейсером, интегрируется между двумя соседними участками повтора на проксимальном конце локуса CRISPR. Системы CRISPR типа II кодируют нуклеазу Cas9 как ключевой фермент для стадии интерференции; данная система содержит как крРНК, так и транскрибирующую РНК (тракрРНК) в качестве направляющего мотива. Они гибридизуются и образуют двухцепочечные (ds) участки РНК, которые распознаются RNaseIII и могут быть расщеплены с образованием зрелых крРНК. Затем они, в свою очередь, связываются с молекулой Cas в целях направления нуклеазы специфически в область целевой нуклеиновой кислоты. Рекомбинантные молекулы гРНК могут содержать как область распознавания вариабельной ДНК, так и область взаимодействия Cas и, таким образом,

могут быть специфически сконструированы независимо от конкретной целевой нуклеиновой кислоты и желаемой нуклеазы Cas. В качестве дополнительного механизма безопасности в области целевой нуклеиновой кислоты должны присутствовать PAM (мотивы, примыкающие к протоспейсеру); это последовательности ДНК, которые следуют непосредственно из ДНК, распознанной комплексом Cas9/гРНК. Последовательности PAM для Cas9 из *Streptococcus pyogenes* описаны как “NGG” или “NAG” (стандартный код нуклеотидов по номенклатуре IUPAC) (Jinek и соавт., A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, Science, 2012 г., 337: стр. 816-821). Последовательностью PAM для Cas9 из *Staphylococcus aureus* является “NNGRRT” или “NNGRR(N)”. Известны дополнительные варианты систем CRISPR/Cas9. Таким образом, Cas9 *Neisseria meningitidis* расщепляется в последовательности PAM NNNNGATT. Cas9 *Streptococcus thermophilus* расщепляется в последовательности PAM NNAGAAW. Недавно был описан дополнительный мотив PAM NNNNRYAC для системы CRISPR *Campylobacter* (WO 2016/021973 A1). Для нуклеаз Cpf1 было описано, что комплекс Cpf1-кРНК без тракРНК эффективно распознает и расщепляет целевую ДНК, за которой следует короткий Т-богатый PAM, в отличие от обычно G-богатых PAM, распознаваемых системами Cas9 (Zetsche и соавт., см. выше). Кроме того, с помощью модифицированных полипептидов CRISPR можно получить специфические одноцепочечные разрывы. Комбинированное использование Cas с различными рекомбинантными гРНК также может индуцировать высокоспецифичные двухцепочечные разрывы ДНК посредством двойного никотирования ДНК. Кроме того, при использовании двух гРНК можно оптимизировать специфичность связывания ДНК и, следовательно, расщепление ДНК. При этом существуют дополнительные эффекторы CRISPR, такие как эффекторы CasX и CasY, первоначально описанные для бактерий и представляющие собой дополнительные эффекторы, которые могут быть использованы для целей геномной инженерии (Burstain и соавт., New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes, Nature, 2017 г., 542, стр. 237-241).

Сайт расщепления SDN относится к точному местоположению на ДНК, где индуцируется разрыв двухцепочечной ДНК. Сайт расщепления может входить или не входить в сайт распознавания (совпадать с сайтом распознавания) SDN, и, следовательно, утверждается, что сайт расщепления SDN расположен на его сайте распознавания или вблизи него. Сайт распознавания фермента SDN, также иногда называемый сайтом связывания, представляет собой нуклеотидную последовательность, которая (специфически) распознается ферментом SDN и определяет его специфичность связывания. Например, мономер TALEN или ZNF имеет сайт распознавания, который

определяется их RVD-повторами или ZF-повторами, соответственно, тогда как его сайт расщепления определяется его доменом нуклеазы (например, FokI) и обычно расположен вне сайта распознавания. В случае димерных TALEN или ZFN сайт расщепления расположен между двумя сайтами распознавания/связывания соответствующих мономеров; эта промежуточная область ДНК, где происходит расщепление, называется областью спейсера. В варианте осуществления настоящего изобретения сайт распознавания расположен в целевой области.

Специалист в данной области техники может выбрать SDN, распознающий определенный сайт распознавания и вызывающий разрыв цепи в сайте расщепления в предварительно выбранном сайте или вблизи него, или сконструировать такой SDN. В других случаях сайт распознавания SDN может быть введен в целевой геном с использованием любого стандартного способа трансформации или путем скрещивания с организмом, имеющим сайт распознавания SDN в его геноме, и любая желаемая ДНК может быть впоследствии введена в сайт расщепления этого SDN или вблизи него.

В особенно предпочтительном аспекте этого варианта осуществления в растительную клетку дополнительно вводят молекулу нуклеиновой кислоты репарации.

Используемое здесь выражение «*матрица репарации*» обозначает молекулу одноцепочечной или двухцепочечной ДНК, или молекулу РНК, которая используется в качестве матрицы для модификации геномной ДНК в предварительно выбранном сайте вблизи сайта расщепления или в сайте расщепления. Используемое здесь выражение «*использование в качестве матрицы для модификации геномной ДНК*» означает, что матрица репарации копируется или интегрируется в предварительно выбранный сайт путем гомологичной рекомбинации между фланкирующей (фланкирующими) областью (областями) и соответствующей (соответствующими) областью (областями) гомологии в целевом геноме, фланкирующем предварительно выбранный сайт, необязательно в комбинации с негомологичным соединением концов (NHEJ) на одном из двух концов матрицы репарации (например, в случае, если имеется только одна фланкирующая область). Интеграция путем гомологичной рекомбинации обеспечит точное соединение матрицы репарации с целевым геномом до уровня нуклеотидов, в то время как NHEJ может привести к небольшим вставкам/делециям на границе между матрицей репарации и геномной ДНК.

Используемое здесь выражение «редактор оснований» обозначает белок или его фрагмент, обладающий способностью опосредовать целевую модификацию основания, т. е. преобразование интересующего основания, приводящее к интересующей точечной мутации. Предпочтительно по меньшей мере один базовый редактор в контексте

настоящего изобретения временно или постоянно соединен по меньшей мере с одним SDN, предпочтительно по меньшей мере с одним нефункциональным SDN, или необязательно с компонентом по меньшей мере одного (нефункционального) SDN. Слияние может быть ковалентным и/или нековалентным. В нескольких публикациях показана целевая конверсия оснований, в первую очередь цитидина (C) в тимин (T), с использованием системы CRISPR/Cas9 или нефункциональной нуклеазы, связанной с доменом цитидиндезаминазы, каталитического полипептида, редактирующего мРНК аполипопротеина В (APOBEC1), например, APOBEC, полученного из крысы. Дезаминирование цитозина (C) катализируется цитидиндезаминазами и приводит к образованию урацила (U), который обладает свойствами спаривания оснований тимина (T). Большинство известных цитидиндезаминаз действуют на РНК, и те немногие примеры, которые, как известно, принимают ДНК, требуют одноцепочечной (оц) ДНК. Исследования комплекса dCas9-целевой ДНК показывают, что по меньшей мере девять нуклеотидов (nt) смещенной цепи ДНК остаются неспаренными при образовании комплекса «R-петли» Cas9 – гидовой РНК – ДНК (Jorge и соавт., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, стр. 529-536 (2011 г.)). Действительно, в структуре комплекса R-петли Cas9 первые 11 nt протоспейсера на смещенной цепи ДНК не упорядочены, что позволяет предположить, что их движение не сильно ограничено. Также было высказано предположение, что мутации, индуцированные Cas9-системой в цитозинах в цепи без матрицы, могут быть вызваны их доступностью для клеточных ферментов цитозиндезаминазы. Был высказан довод о том, что подмножество этого участка оцДНК в R-петле может служить эффективным субстратом для цитидиндезаминазы, связанной с dCas9, для осуществления прямой программируемой конверсии C в U в ДНК (Komog и соавт., см. выше). Недавно Goudelli и соавт. ((2017 г.) Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage, *Nature*, 551(7681), 464.) описали редакторы оснований аденина (ABE), опосредующие конверсию A•T в G•C в геномной ДНК.

Используемое здесь выражение «модификация генома» означает, что геном изменен по меньшей мере на один нуклеотид. Это может происходить путем замены по меньшей мере одного нуклеотида и/или делеции по меньшей мере одного нуклеотида и/или вставки по меньшей мере одного нуклеотида, при условии, что это приводит к полному изменению по меньшей мере одного нуклеотида по сравнению с нуклеотидной последовательностью предварительно выбранного геномного целевого сайта перед модификацией, что позволяет идентифицировать модификацию, например, посредством таких методик, как секвенирование или ПЦР-анализ и т. п., которые должны быть хорошо известны специалисту.

Используемое здесь выражение *«предварительно выбранный сайт»* или *«предварительно определенный сайт»* указывает на конкретную нуклеотидную последовательность в геноме (например, ядерном геноме), в местоположение которой желательно вставить, заменить и/или удалить один или несколько нуклеотидов. Это может быть, например, эндогенный локус или конкретная нуклеотидная последовательность в ранее введенной чужеродной ДНК или трансгене, или связанная с ними. Предварительно выбранный сайт может представлять собой конкретное положение нуклеотида, в который (после которого) предполагается осуществить вставку одного или нескольких нуклеотидов. Предварительно выбранный сайт также может содержать последовательность из одного или нескольких нуклеотидов, которые должны быть обменены (заменены) или удалены.

Используемое здесь выражение *«фланкирующая область»* означает область молекулы нуклеиновой кислоты репарации с нуклеотидной последовательностью, которая гомологична нуклеотидной последовательности области ДНК, фланкирующей (т. е. расположенной против хода или по ходу транскрипции) предварительного выбранного сайта. Будет ясно, что длина и процент идентичности последовательностей фланкирующих областей должны быть выбраны таким образом, чтобы обеспечить гомологичную рекомбинацию между указанными фланкирующими областями и их соответствующей областью ДНК против хода или по ходу транскрипции от предварительного выбранного сайта. Область или области ДНК, фланкирующие предварительный сайт и гомологичные фланкирующим областям ДНК молекулы нуклеиновой кислоты репарации, также называются областью или областями гомологии в геномной ДНК.

Для обеспечения достаточной гомологии для рекомбинации, фланкирующие области ДНК молекулы нуклеиновой кислоты репарации могут различаться по длине и должны иметь длину по меньшей мере около 10 nt, около 15 nt или около 20 nt. При этом фланкирующая область может быть настолько длинной, насколько это практически возможно (например, примерно до 100-150 т.п.н., таких как полные бактериальные искусственные хромосомы (ВАС). Предпочтительно фланкирующая область должна составлять примерно от 50 nt до примерно 2000 nt, например, около 100 nt, 200 nt, 500 nt или 1000 nt. Более того, области, фланкирующие интересующую ДНК, не обязательно должны быть идентичны областям гомологии (областям ДНК, фланкирующим предварительный сайт) и могут иметь от примерно 80 % до примерно 100 % идентичности последовательности, предпочтительно от примерно 95 % до примерно 100 % идентичности последовательности с областями ДНК, фланкирующими

предварительно выбранный сайт. Чем длиннее фланкирующая область, тем менее строгие требования к гомологии. Кроме того, для достижения обмена целевой последовательности ДНК в предварительно выбранном сайте без изменения последовательности ДНК примыкающих последовательностей ДНК, фланкирующие последовательности ДНК предпочтительно должны быть идентичны расположенным против хода и по ходу транскрипции областям ДНК, фланкирующим предварительно выбранный сайт.

Используемое здесь выражение «*против хода транскрипции*» указывает на местоположение на молекуле нуклеиновой кислоты, которое находится ближе к 5'-концу указанной молекулы нуклеиновой кислоты. Аналогично, термин «*по ходу транскрипции*» относится к местоположению на молекуле нуклеиновой кислоты, которое находится ближе к 3'-концу указанной молекулы нуклеиновой кислоты. Во избежание сомнений, молекулы нуклеиновых кислот и их последовательности обычно представлены в их направлении от 5' до 3' (слева направо).

Дополнительным вариантом осуществления настоящего изобретения является способ получения растения, устойчивого к *Heterodera*, который может осуществляться путем трансформации растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, молекулой рекомбинантной ДНК или вектором, или экспрессионной кассетой, и регенерации трансгенного растения из трансформированной растительной клетки (см. Пример 3), или путем скрещивания и селекции, *например*, с одним из растений вышеупомянутого подвида *Beta vulgaris* subsp. *maritima*. Векторы или экспрессионные кассеты, а также способы трансформации растений уже описаны выше.

Способ получения растения, устойчивого к *Heterodera*, альтернативно включает в себя, как описано выше, введение сайт-направленной нуклеазы и матрицы репарации в клетку растения, предпочтительно растения вида *Beta vulgaris*, в котором сайт-направленная нуклеаза способна генерировать по меньшей мере один одноцепочечный разрыв или по меньшей мере один двухцепочечный разрыв ДНК в геноме клетки, предпочтительно против хода и/или по ходу транскрипции от целевой области, и матрица репарации содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Кроме того, данный способ включает в себя культивирование этой клетки в условиях, которые допускают репарацию, направляемую гомологией, или гомологичную рекомбинацию, при этом молекула нуклеиновой кислоты включается из матрицы репарации в геном растения. Кроме того, охватывается регенерация растения из модифицированной растительной клетки.

В предпочтительном варианте осуществления целевая область представляет собой аллельный вариант молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению,

причем аллельный вариант, если он присутствует в растении, не придает устойчивости к *Heterodera*. Было установлено, что аллельный вариант содержит ретротранспозоны.

Как описано в связи с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, могут быть введены замещения, делеции, вставки, присоединения и/или любые другие изменения, которые по отдельности или в комбинациях фактически изменяют нуклеотидную последовательность, но выполняют ту же функцию, что и исходная последовательность – в данном случае, нуклеотидная последовательность аллельного варианта молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Следовательно, в дополнительном варианте осуществления изобретение включает в себя нуклеотидную последовательность, которая представляет собой производную нуклеотидной последовательности аллельного варианта молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, или аминокислотную последовательность, которая представляет собой производную аминокислотной последовательности аллельного варианта по настоящему изобретению. Производная нуклеотидная или аминокислотная последовательность, которая имеет по меньшей мере одно замещение, делецию, вставку или присоединение одной или нескольких нуклеиновых кислот или аминокислот, при которых функциональность гена сохраняется, представляет собой производную нуклеотидной или аминокислотной последовательности. Таким образом, в нуклеотидную последовательность могут быть введены замещения, делеции, вставки, присоединения и/или любые другие изменения по отдельности или в комбинациях с геном, которые фактически изменяют нуклеотидную последовательность, но выполняют ту же функцию, что и исходная последовательность, с использованием стандартных способов, известных из предшествующего уровня техники, *например*, посредством сайт-направленного мутагенеза, методики TILLING, ПЦР-опосредованного мутагенеза, химически индуцированного мутагенеза, редактирования генома, редактирования оснований и т. д.

Что касается аминокислотной последовательности, то после модификации вышеупомянутым способом она также имеет общий структурный домен и/или обладает общей функциональной активностью. Нуклеотидные последовательности или аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 91 %, по меньшей мере на 92 %, по меньшей мере на 93 %, по меньшей мере на 94 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 96 %, по меньшей мере на 97 %, по меньшей мере на 98 %, по меньшей мере на 99 % или по меньшей мере на 100 % идентичны нуклеотидной последовательности или аминокислотной последовательности указанного аллельного варианта молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, определены здесь

как достаточно сходные. Соответственно, настоящее изобретение включает в себя нуклеотидную последовательность, которая способна гибридизоваться в строгих условиях с нуклеотидной последовательностью, которая комплементарна нуклеотидной последовательности аллельного варианта молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или нуклеотидной последовательности, которая кодирует соответствующую аминокислотную последовательность.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления способ по настоящему изобретению отличается тем, что по меньшей мере один двухцепочечный разрыв происходит в позиции, которая составляет не более 10 000 пар оснований, предпочтительно по меньшей мере 5 000 пар оснований, более предпочтительно по меньшей мере 1 000 пар оснований, против хода и/или по ходу транскрипции от целевой области, или которая удалена не более чем на 10 000 пар оснований, предпочтительно по меньшей мере на 5 000 пар оснований, более предпочтительно по меньшей мере на 1 000 пар оснований от аллельного варианта по настоящему изобретению.

Для специалиста в данной области техники может быть очевидным, что возможно возникновение нескольких различных чувствительных последовательностей, которые происходят из молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, но не придают устойчивости к *Heterodera*, так что последовательность, указанную выше, следует рассматривать только как пример последовательности, и настоящее изобретение не ограничивается вышеупомянутым аллельным вариантом молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Разумеется, чувствительные варианты молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут содержать ретротранспозоны не только как описано выше, но все виды мутаций, известные специалисту в данной области техники и упомянутые выше в последовательности ДНК или кДНК, или в промоторной области, могут приводить к чувствительным аллелям.

Как описано выше, при количественной наследственности QTL (локуса количественных признаков) в растение часто привносится не только желаемая устойчивость к патогену рода *Heterodera*, но и нередко нежелательные признаки, такие как, например, снижение урожайности вследствие наследования дополнительных генов, которые не связаны с положительным признаком устойчивости. Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления введение молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или вышеописанной комбинации молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая уже сама по себе проявляет доминирующий эффект устойчивости, или вектора или экспрессионной кассеты, не связано с введением нежелательных признаков, при этом предпочтительно отсутствует отрицательное влияние

на урожайность. Кроме того, изобретение охватывает растение, полученное таким способом.

Хотя анализы QTL, которые ранее стали известны из предшествующего уровня техники, могли обнаруживать фактические QTL, основные области генома, которые показали эффект QTL, также опосредовали недостатки, описанные выше, и по этой причине в данном контексте также рассматривается «сцепленный груз». В то же время QTL и связанные с ними эффекты не были описаны единообразно в соответствующем предшествующем уровне техники и просто опосредовали слабый эффект, вследствие чего использование этих результатов в селекции растений, устойчивых к *Heterodera*, было возможно лишь в ограниченной степени и было в значительной степени неопределенным. Целенаправленная селекция и контролируемая интеграция гена устойчивости в генный пул сахарной свеклы теперь возможны за счет идентификации описанного здесь гена устойчивости. Это обеспечивает селекцию и получение совершенно новых сортов, устойчивых к *Heterodera*, которые проявляют высокую устойчивость к патогену, не оказывая негативного влияния на выход сахара.

Настоящее изобретение также относится к способу идентификации и, возможно, получения устойчивого к патогену *Heterodera* растения вида *Beta vulgaris*, отличающемуся тем, что данный способ включает этап обнаружения присутствия и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, или полипептида по настоящему изобретению в растении или его образце/части. Присутствие и/или экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, или полипептида по настоящему изобретению можно проверить с помощью стандартных методов, известных специалисту в данной области техники, *например*, с помощью ПЦР, ОТ-ПЦР или вестерн-блоттинга.

Кроме того, способ идентификации по настоящему изобретению также включает в себя обнаружение молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению посредством обнаружения по меньшей мере одного полиморфизма в последовательности, придающей устойчивость, *т. е.* последовательностях молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Как уже было описано выше, специалисту в данной области техники может быть очевидно, что существует несколько чувствительных последовательностей, *т. е.* несколько последовательностей, которые кодируют аллельный вариант молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Следовательно, предпочтительный вариант осуществления способа по настоящему изобретению включает в себя обнаружение по меньшей мере одного полиморфизма с использованием молекулярных маркеров, которые обнаруживают полиморфизмы, в частности,

диагностические полиморфизмы. Такое обнаружение предпочтительно происходит с использованием по меньшей мере одного молекулярного маркера на полиморфизм, в частности, на диагностический полиморфизм. Специалисту в данной области техники известно, какие методы маркирования следует применять для обнаружения соответствующего полиморфизма, и как создаются молекулярные маркеры для него (см. *Advances in Seed Science and Technology*, том I, Vanangamudi и соавт., 2008 г.). Кроме того, настоящее изобретение охватывает молекулярные маркеры, которые описывают или обнаруживают полиморфизм в последовательностях молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Таким образом, также возможно использовать маркеры, которые не различают разные полиморфизмы, при условии, что маркеры способны обнаруживать такой полиморфизм, который встречается в молекуле нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, но не содержит чувствительного аллельного варианта.

Альтернативно или дополнительно способ идентификации по настоящему изобретению включает этап обнаружения по меньшей мере одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В результате этого генерируется сигнал, *например*, сигнал флуоресценции или усилитель последовательности. Кроме того, предыдущие способы идентификации также представляют собой способы селекции растения, которое проявляет устойчивость к *Heterodera* по настоящему изобретению. Способ селекции включает в себя заключительный этап селекции устойчивого растения.

В данном контексте настоящее изобретение также включает в себя разработку или получение молекулярных маркеров, которые подходят для обнаружения вышеупомянутых полиморфизмов устойчивого аллеля, или конструирование гибридизационных зондов, которые специфически связываются с нуклеотидной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, или получение пары молекул нуклеиновой кислоты, которая пригодна для амплификации в области ПЦР, специфичной для молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, и, таким образом, для их обнаружения в растении или растительной клетке.

Изобретение предпочтительно включает в себя способ получения олигонуклеотидов длиной по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20, предпочтительно по меньшей мере 21, 22, 23, 24 или 25, очень предпочтительно по меньшей мере 30, 35, 40, 45 или 50, и особенно предпочтительно по меньшей мере 100, 200, 300, 500 или 1000 нуклеотидов, которые специфически гибридизуются с нуклеотидной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или молекулой нуклеиновой кислоты, которая комплементарна ей, или парой молекул

нуклеиновой кислоты – предпочтительно, в форме олигонуклеотидов, – которая пригодна для присоединения в качестве прямого и обратного праймера к области, которая специфична для молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, и для ее амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР), или которая пригодна для гибридизации в качестве прямого и обратного праймера с областью в геноме *Beta vulgaris*, которая в *Beta vulgaris* имеет косегрегацию с устойчивостью к *Heterodera*, придаваемой полипептидом по настоящему изобретению, или с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

Способ получения олигонуклеотидов первоначально включает в себя: сравнение нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению с нуклеотидной последовательностью соответствующей молекулы нуклеиновой кислоты, которая не придает устойчивости; идентификацию различий в последовательности между двумя нуклеотидными последовательностями; и генерацию молекул нуклеиновой кислоты – здесь имеются в виду олигонуклеотиды, – которые специфически связываются с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, но не с молекулой нуклеиновой кислоты, которая не опосредует устойчивость.

Кроме того, олигонуклеотид по настоящему изобретению может быть соединен с флуоресцентным красителем для генерации сигнала флуоресценции, например, при возбуждении светом соответствующей длины волны. В качестве флуоресцентного красителя может использоваться флуорохром. Олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут быть сопряжены с другими соединениями, пригодными для генерации сигнала. Такие олигонуклеотиды не встречаются в природе, а также не могут быть выделены из природы. Для получения таких маркированных олигонуклеотидов выполняется следующее: ДНК может быть маркирована биортогонально. Для этого ДНК может быть маркирована *in vivo* или *in vitro* аналогами нуклеозидов, которые, например, впоследствии могут быть сопряжены с флуорофором по реакции Штаудингера. В дополнение к этому, ДНК также может быть химически снабжена флуорофорами. Олигонуклеотиды могут быть маркированы посредством синтеза фосфорамидита с помощью флуорофоров, которые, например, используются в кПЦР, секвенировании ДНК и гибридизации *in situ*. Кроме того, ДНК может быть генерирована ферментативно в ходе полимеразной цепной реакции с флуоресцентными нуклеотидами или быть маркирована лигазой или терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазой. ДНК также может быть обнаружена косвенно с помощью биотинилирования и флуоресцентного авидина. Для сопряжений в качестве флуорофоров, помимо прочего, используются флуоресцеин,

флуоресцентные лантаноиды, наночастицы золота, углеродные нанотрубки или квантовые точки. Одним из наиболее часто используемых флуоресцентных веществ является FAM (карбоксифлуоресцеин). Следовательно, изобретение охватывает олигонуклеотиды и, в частности, праймеры, которые обладают маркировкой FAM. FAM предпочтительно представлен в виде 6-FAM, тем не менее, при этом – в зависимости от желаемой длины волны излучения и возбуждения – могут использоваться и другие варианты FAM, например, 5-FAM. Примерами дополнительных флуоресцентных маркеров являются AlexaFluor, ATTO, Dabcyl, HEX, Rox, TET, Texas Red и Yakima Yellow. В зависимости от области применения олигонуклеотиды могут быть снабжены модификациями оснований или сахарофосфатного остова. К ним относятся, помимо прочего, амино-dT, азид-dT, 2-аминопурин, 5-Br-dC, 2'-дезоксиинозин (INO), 3'-дезокси-A, C, G, 5-мет-dC, 5-OH-мет-dCN6-мет-dA и другие.

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

Изобретение также включает в себя способ получения белка по настоящему изобретению. Способ включает в себя получение или культивирование культуры клеток, которая содержит любой из SEQ ID №№ 2, 5 и 8, и последующую экспрессию белка, кодируемого любым из SEQ ID №№ 2, 5 и 8.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к устойчивому к *Heterodera* растению или его части, которые были идентифицированы и, если применимо, отобраны с помощью способа, описанного выше. В частности, настоящее изобретение относится к популяции растений, включающей растения, которые доступны по одному из способов по настоящему изобретению, как описано выше, и которые предпочтительно устойчивы к свекловичной цистообразующей нематодe, и отличаются присутствием молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Популяция предпочтительно содержит по меньшей мере 10, предпочтительно по меньшей мере 50, более предпочтительно по меньшей мере 100, особенно предпочтительно по меньшей мере 500 и, в частности, при сельскохозяйственном выращивании предпочтительно по меньшей мере 1000 растений. Доля растений в популяции, которые не несут молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и/или восприимчивы к заражению *Heterodera*, в частности *Heterodera schachtii*, предпочтительно составляет менее 25 %, предпочтительно менее 20 %, более предпочтительно менее 15 %, еще более предпочтительно 10 %, и особенно предпочтительно менее 5 %, если она вообще присутствует.

С помощью точного картирования, описанного выше, можно идентифицировать ген (гены) в геноме, придающий (придающие) устойчивость к *Heterodera*. Это, в свою очередь, представляет собой основу для разработки зондов гибридизации ДНК или генетических маркеров в целевой области, с помощью которых можно обнаружить ген, опосредующий устойчивость к *Heterodera* или отличить ген, опосредующий устойчивость к *Heterodera*, от гена, который не придает устойчивости.

Зонды гибридизации ДНК могут быть получены из последовательности гена (генов), придающего (придающих) устойчивость к *Heterodera*, и использоваться для скрининга геномных банков и/или банков кДНК нужного организма. Зонды могут быть использованы для амплификации идентифицированных гомологичных генов с помощью известного процесса полимеразной цепной реакции (ПЦР) и для проверки гена, придающего устойчивость к *Heterodera*, на предмет эндогенного присутствия в организме или его успешного введения гетерологичным способом.

В этом случае специалист в данной области техники может прибегнуть к обычным способам гибридизации, клонирования и секвенирования, которые, например, перечислены в Sambrook *и соавт.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001 г. Специалист в данной области техники также может синтезировать и использовать олигонуклеотидные праймеры для амплификации последовательностей гена (генов), придающего (придающих) устойчивость к *Heterodera*. Для достижения специфической гибридизации такие зонды должны быть специфичными и иметь длину по меньшей мере из 15 нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 20 нуклеотидов. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Acid Probes*, часть 1, глава 2, «Обзор принципов гибридизации и стратегия анализов с использованием зондов нуклеиновых кислот». Elsevier, Нью-Йорк (1993 г.); и в *Current Protocols in Molecular Biology*, глава 2, Ausubel *и соавт.*, ред., Greene Publishing и Wiley Interscience, Нью-Йорк (1995 г.).

Таким образом, предметом настоящего изобретения является молекула нуклеиновой кислоты длиной по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, или 20, предпочтительно по меньшей мере 21, 22, 23, 24 или 25, очень предпочтительно по меньшей мере 30, 35, 40, 45 или 50, и особенно предпочтительно по меньшей мере 100, 200, 300, 500 или 1000 нуклеотидов, при этом данная молекула нуклеиновой кислоты специфически гибридизуется с ранее описанной нуклеотидной последовательностью по настоящему изобретению, которая содержит ген (гены), придающий (придающие) устойчивость к *Heterodera*. Сюда также явным образом входит диапазон от 15 до 35 нуклеотидов.

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

В частности, настоящее изобретение охватывает пару молекул нуклеиновой кислоты – предпочтительно в форме олигонуклеотидов или набора, содержащего эту пару олигонуклеотидов, – которая пригодна для гибридизации в качестве прямого и обратного праймера к области, которая специфична для молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, и для ее амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР), или которая пригодна в качестве прямого и обратного праймера для гибридизации с областью в геноме *Beta vulgaris*, который в *Beta vulgaris* проявляет косегрегацию с устойчивостью к патогену рода *Heterodera*, придаваемой полипептидом по настоящему изобретению, или с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Предпочтительно область в геноме *Beta vulgaris* расположена между маркером s5e3001s02 и маркером s5e4668xxx, фланкирована маркером s5e3001s02 и маркером s5e4668xxx или содержит хромосомный интервал между маркером s5e3001s02 и маркером s5e4668xxx.

С помощью настоящего изобретения также могут быть достигнуты следующие преимущества для селекции и разработки новых устойчивых линий растений рода *Beta*. Информация о последовательности, а также идентифицированные полиморфизмы, которые позволяют проводить дифференциацию между устойчивыми и потенциально чувствительными аллелями раскрытого гена, *m. e.* между аллелями, которые придают устойчивость к патогену рода *Heterodera*, и аллелями, которые не способны придавать эту устойчивость, позволяют разработать маркер, который представляет собой важное содействие для селекционера, в частности, в отношении разработки оптимизированных элитных линий без «сцепленного груза». Более того, знания о последовательной структуре могут быть использованы для идентификации дополнительных генов устойчивости, в частности, к *Heterodera*, которые являются, например, гомологичными или ортологичными.

Таким образом, настоящее изобретение также включает в себя способ идентификации дополнительных молекул нуклеиновых кислот, которые придают устойчивость к патогену рода *Heterodera*, если присутствуют в растении, и которые кодируют полипептиды или дополнительные белки, которые способны придавать устойчивость к патогену рода *Heterodera* в растении, в котором экспрессируется полипептид, соответственно. Таким образом, специалист в данной области техники может использовать базы данных, применяя подходящие профили поиска и компьютерные

программы для скрининга гомологичных последовательностей или для сравнения последовательностей. Более того, с помощью обычных методов молекулярной биологии специалист в данной области техники может самостоятельно получить дополнительные последовательности ДНК, кодирующие белки, устойчивые к *Heterodera*, и использовать их в рамках настоящего изобретения. Например, подходящие гибридизационные зонды могут быть получены из последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и использоваться для скрининга геномных банков и/или банков кДНК нужного организма. В этом случае специалист в данной области техники может прибегнуть к обычным способам гибридизации, клонирования и секвенирования, которые, например, перечислены в Sambrook *и соавт.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001 г. Используя известные последовательности, специалист в данной области техники может также синтезировать и использовать олигонуклеотидные праймеры для амплификации последовательностей молекул нуклеиновых кислот, придающих устойчивость к *Heterodera*.

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение охватывает способ идентификации молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, способный придавать устойчивость к *Heterodera* у растения вида *Beta vulgaris*, в котором экспрессируется полипептид. Таким образом, способ включает в себя сравнение аминокислотной последовательности полипептида по изобретению, который в *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* придает устойчивость к патогену рода *Heterodera* благодаря аминокислотным последовательностям из базы данных последовательностей или благодаря последовательностям аллельных вариантов полипептида по настоящему изобретению в генотипах вида *Beta vulgaris*. Кроме того, способ по настоящему изобретению включает в себя идентификацию аминокислотной последовательности или аллельного варианта, который по меньшей мере на 70 %, предпочтительно 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*; экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в растении; и необязательно последующую проверку устойчивости к патогену рода *Heterodera*.

Как описано выше, дополнительные белки, придающие устойчивость к *Heterodera*, или их кодирующие гены, *m. e.* гомологи, аналоги и ортологи, которые по меньшей мере на 70 %, предпочтительно по меньшей мере на 80 %, очень предпочтительно по меньшей мере на 90 %, особенно предпочтительно по меньшей мере на 95 % или даже на 98 %

идентичны аминокислотной последовательности полипептида, которая кодируется молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, могут быть идентифицированы с помощью классических биоинформационных подходов (поиск в базе данных и компьютерные программы для скрининга гомологичных последовательностей).

Дополнительный вариант осуществления изобретения относится к растению или семени, содержащему нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, как описано здесь, причем растение или семя такого растения имеет геном, позволяющий развивать тело свеклы с минимальной свежей массой, равной 200 г, 250 г, 300 г, 350 г, 400 г, 450 г или 500 г и максимальной массой 100 г, 1100 г, 1200 г, 1300 г, 1400 г, 1500 г, 1600 г, 1700 г, 1800 г, 1900 г или 2000 г. Соответствующий генетический состав для развития такого тела свеклы имеется, например, у следующих сортов: BTS 8629, BTS 8735, BTS 8500, BTS 8767 или BTS 8749. Специалист в данной области техники знает, как перенести нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению в растение, имеющее такой генетический состав. Семя в этом варианте осуществления может представлять собой дражированное семя.

Дополнительный вариант осуществления изобретения относится к растению или семени, содержащему нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, как описано здесь, причем растение или семя такого растения имеет геном, позволяющий развивать тело свеклы с концентрацией сахарозы в свежей массе тела свеклы, равной по меньшей мере 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % или даже 20 % (процентов по массе). Соответствующий генетический состав для развития такого тела свеклы имеется, например, у следующих сортов: BTS 8629, BTS 8735, BTS 8500, BTS 8767 или BTS 8749. Специалист в данной области техники знает, как перенести нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению в растение, имеющее такой генетический состав. Семя в этом варианте осуществления может представлять собой дражированное семя.

Таким образом, термин «гомолог(и)» означает, что соответствующие гены (из двух разных видов растений) имеют по существу одну и ту же функцию и общего предка, и, следовательно, обычно демонстрируют значительную идентичность в своих последовательностях нуклеиновых кислот или кодированных аминокислот. При этом также существует много генов, которые гомологичны 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 сходную функцию, но не созданы из одной и той же структуры, *т. е.* не имеют общего предка. В этом случае часто невозможно установить значимую идентичность

в их нуклеиновой кислоте или кодируемой аминокислотной последовательности, или, в лучшем случае, в конкретных функциональных доменах.

В контексте секвенирования генома гомологи в целях аннотации классифицируются более точно. Для этой цели были введены термины «ортология» и «паралогия». Ортологи – это гены, которые связаны через событие видообразования. Паралоги – это гены, которые восходят к событию дупликации.

Таким образом, ген, по сути, является гомологом, аналогом или ортологом в смысле настоящего изобретения, если он способен придавать растению устойчивость к *Heterodera*. Для проверки используются способы, которые уже описаны выше и известны специалисту в данной области техники, *например*, амплификация идентифицированного гомолога или аналога, или ортолога посредством ПЦР, клонирования в векторах экспрессии, введения в целевое растение или растительную клетку, и проверка устойчивости.

Как описано выше, раскрытое здесь использование аллеля устойчивого гена в цис- или трансгенетических подходах открывает возможность для новых устойчивых видов рода *Beta*, которые, используя эффект дозы, проявляют повышенную устойчивость, или в которых можно избежать разрыва устойчивости и оптимизировать развитие устойчивости посредством пирамидирования раскрытого гена с другими генами устойчивости. Также возможны модификации гена с использованием методики TILLING или целенаправленной инженерии для выработки новых аллелей устойчивости.

Настоящее изобретение также относится к использованию в растении идентифицированного аллеля гена, придающего устойчивость к *Heterodera*, в генетическом или молекулярном пакете с другими генетическими элементами, которые могут придавать агрономически выгодные свойства. Экономическая ценность культурных растений, таким образом, может быть заметно увеличена, в том смысле, что, например, показатели урожайности повышаются по сравнению с растениями, которые обладают такой же генетикой, но не снабжены нуклеиновой кислотой по настоящему изобретению. Кроме того, могут быть открыты новые посевные площади для растения, которые ранее были недоступны для выращивания этого растения вследствие биотических факторов, таких как сильное давление патогенов. В частности, настоящее изобретение относится к использованию идентифицированного аллеля гена, придающего устойчивость к *Heterodera*, в способах борьбы с заражением патогеном *Heterodera schachtii* при сельскохозяйственном или садоводческом выращивании растений рода *Beta*, *например*, включая идентификацию и селекцию растений рода *Beta* с помощью одного из способов, описанных выше, и/или культивирование выбранных таким образом растений, или их потомков. Таким образом,

настоящее изобретение включает способ культивирования растений вида *Beta vulgaris*, включающий на первом этапе получение устойчивых к *Heterodera* растений вида *Beta vulgaris* по настоящему изобретению или получение растений вида *Beta vulgaris* с помощью способа получения по настоящему изобретению, или идентификацию и селекцию растений вида *Beta vulgaris* с помощью способа идентификации по настоящему изобретению, который был описан выше; и включая на втором этапе культивирование растений с первого этапа, или размещение семенного материала из растения с первого этапа или выращивание растений с первого этапа. Таким образом, способ культивирования противодействует заражению *Heterodera* культурных растений. Способ культивирования может являться частью способа производства сахара. Способ производства сахара включает в себя этапы способа культивирования и дополнительно, в качестве предпоследнего этапа, сбор урожая культурных растений и, в качестве последнего этапа, экстракцию сахара из вышеупомянутых растений.

Способ культивирования также может быть частью способа получения семенного материала. Способ получения семенного материала включает в себя этапы способа культивирования и дополнительно, в качестве предпоследнего этапа, яровизацию культурных растений и, в качестве последнего этапа, экстракцию семян из вышеупомянутых растений. Экстрагированные семена необязательно могут быть дражированы для получения дражированного семенного материала вида *Beta vulgaris*. В данном случае речь идет о способе получения дражированного семенного материала.

Более того, способ получения семенного материала может быть разработан как способ получения семенного материала, устойчивого к *Heterodera*. Способ получения семенного материала, устойчивого к *Heterodera*, включает в себя этапы описанного выше способа получения семенного материала и дополнительно, в качестве последнего этапа, проверку нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в соответствии с описанным здесь способом по меньшей мере в одном из экстрагированных семян, предпочтительно по меньшей мере в 0,1 % или по меньшей мере в 1 % экстрагированных семян. Проверка особенно предпочтительно осуществляется таким образом, чтобы семя оставалось пригодным для прорастания. Это означает, что извлечение из семени ДНК, необходимой для проверки, не нейтрализует всхожесть семени. В таком случае проверка нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могла быть проведена в особенно большой доле всех экстрагированных семян. Например, проверка может проводиться по меньшей мере в 2 %, предпочтительно по меньшей мере в 3 %, особенно предпочтительно по меньшей мере в 4 % от всех экстрагированных семян.

Растения по настоящему изобретению, их клетки или семена, или семенной материал по настоящему изобретению могут обладать дополнительными, агрономически выгодными свойствами или быть снабжены таковыми. Одним из примеров является толерантность или устойчивость к гербицидам, таким как глифосат, глюфосинат или ингибиторы ALS. Предпочтительна устойчивость к глифосату или гербициду, ингибирующему ALS. Конкретный вариант осуществления устойчивости к глифосату раскрыт в US 7 335 816 B2. Такая устойчивость к глифосату, например, имеется в семенном материале, хранящемся в NCIMB, Абердин (Шотландия, Соединенное Королевство), под номером доступа NCIMB 41158 или NCIMB 41159. Такие семена могут быть использованы для получения толерантного к глифосату растения сахарной свеклы. Устойчивость к глифосату также может быть передана другим видам рода *Beta* путем скрещивания.

Таким образом, изобретение также охватывает растения, их клетки или семена, или семенной материал, отличающиеся тем, что они содержат молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, и, кроме того, тем, что фрагмент ДНК геномной ДНК растения, его частей или семян может быть амплифицирован посредством полимеразной цепной реакции с первым и вторым праймером.

Конкретный вариант осуществления устойчивости к гербицидам, ингибирующим ALS, раскрыт в документе WO 2012/049268 A1. Например, такая устойчивость к гербицидам, ингибирующим ALS, имеется в материале, хранящемся в NCIMB, Абердин, Соединенное Королевство, под номером NCIMB 41705. Кроме того, такая устойчивость к ALS-ингибитору может быть получена по методике TILLING или путем сайт-направленного мутагенеза, *например*, посредством редактирования генов, например, с помощью CRISPR/Cas. Таким образом, изобретение также охватывает растения, их клетки или семена, или семенной материал, отличающиеся тем, что они содержат молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, и, кроме того, тем, что они демонстрируют мутацию в эндогенном гене ацетолактатсинтазы, при этом ген ацетолактатсинтазы кодирует белок ацетолактатсинтазы, который в результате вследствие мутации в позиции 569 имеет аминокислоту, отличающуюся от триптофана. В результате мутации аминокислота в позиции 569 предпочтительно представляет собой аланин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, валин или аргинин. Кроме того, мутация может присутствовать как гетерозиготно, так и гомозиготно в растениях, их клетках или семенах, или семенном материале. Мы рекомендуем гомозиготное присутствие мутации, поскольку это способствует более стабильному или более интенсивному фенотипическому возникновению устойчивости.

Из предшествующего уровня техники специалисту в данной области техники известны многочисленные дополнительные гербициды и их применимость. В целях обеспечения соответствующей толерантности у растений он может обратиться к предшествующему уровню техники для получения знаний о том, какие генетические элементы должны использоваться и каким образом.

Дополнительным примером агрономически выгодного свойства является дополнительная устойчивость к патогенам, при этом патогенами могут быть, например, насекомые, вирусы, нематоды, бактерии или грибы. Например, широкая защита растения от патогенов может быть достигнута за счет комбинации различных устойчивостей/толерантностей к патогенам, поскольку генетические элементы могут проявлять аддитивные эффекты между собой. Например, специалисту в данной области техники известны различные гены такой устойчивости в качестве генетических элементов. Например, в US 2016/0152999 A1 раскрыт ген устойчивости RZ к заболеванию *Rhizomania*. Это заболевание вызывает возбудитель «вирус некротического пожелтения жилок свеклы». Несколько видов устойчивости к болезням, содержащихся в одном растении, оказывают синергическое воздействие друг на друга. Если растение впервые заражается патогеном, то его иммунная система обычно бывает ослаблена, и эпидермис как внешний барьер часто бывает поврежден, вследствие чего возрастает вероятность дальнейших инфекций. Дополнительным примером агрономически выгодного свойства является устойчивость к холоду или морозостойкость. Растения, которые проявляют это свойство, могут быть посеяны уже в начале года или могут оставаться в поле дольше, что может привести, например, к увеличению урожайности. В этом случае специалист в данной области техники также может обратиться к предшествующему уровню техники для поиска подходящих генетических элементов. Дополнительными примерами агрономически выгодных свойств являются эффективность использования воды, эффективность использования азота и урожайность. Генетические элементы, которые могут быть использованы для придания таких свойств, могут быть найдены в предшествующем уровне техники.

Кроме того, специалисту в данной области техники известны различные модификации для защиты от патогенов. В дополнение к семействам R-генов, которые часто описываются, можно эффективно использовать подход Avr/R, комплементацию гена Avr (WO 2013/127379), автоактивация R-гена (WO 2006/128444) или подход HIGS (индуцированный хозяином сайленсинг генов) (например, WO 2013/050024). В частности, автоактивация R-гена может быть важна для настоящего изобретения. Для этой цели необходимо создать нуклеиновую кислоту, которая кодирует автоактивированный белок

устойчивости для образования устойчивости к патогенам у растений. Затем эта нуклеиновая кислота содержит только ограниченную часть гена устойчивости NBS-LRR, такого как *wb*-R-ген, которая простирается по ходу транскрипции от 5'-конца кодирующей области гена устойчивости NBS-LRR до начала кодирования домена NBS гена устойчивости NBS-LRR.

В этом контексте также включен способ, который содержит этап удаления той области нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая кодирует N-концевую область и которая начинается с р-петли в домене NBS и продолжается до конца N-концевой области.

Белки устойчивости, которые кодируются такими укороченными нуклеиновыми кислотами, обычно являются автоактивированными, поскольку эти белки устойчивости вызывают иммунную реакцию в растении даже в отсутствие ассоциированного патогена и, таким образом, повышают базовый иммунитет растения. Кроме того, включены такая укороченная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению и полипептид, который она кодирует.

Кроме того, изобретение также включает в себя использование аллеля гена, придающего устойчивость к *Heterodera*, идентифицированного описанным выше способом, для комбинации с одной из предыдущих модификаций или с генетическим элементом, описанным выше, который может передавать растению одно или несколько агрономически выгодных свойств.

В дополнение 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 обычно производят из экологически устойчивых сырьевых материалов, таких как пищевые продукты и корма для животных, предпочтительно сахар или сироп (меласса), при этом меласса также используется для промышленного применения, *например*, в производстве спирта или в качестве питательной среды для производства биотехнологических продуктов, в производстве материалов или веществ для химической промышленности, *например*, очищенных химикатов, фармацевтических препаратов или их прекурсоров, диагностических средств, косметических средств, биоэтанола, или биогаза. Пример использования сахарной свеклы в качестве биогенного сырьевого материала в биогазовых установках описан в заявке DE 10 2012 022 178 A1; см., например, пункт 10.

Следующие примеры объясняют изобретение, но не ограничивают предмет изобретения. Если не указано иное, использованы стандартные методы молекулярной биологии; см., например, Sambrook *и соавт.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001 г., Fritsch

и соавт., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989 г.; Mayer *и соавт.*, *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*, ред., Academic Press, Лондон, 1987 г., и Weir *и соавт.*, *Handbook of Experimental Immunology*, тома I-IV, Blackwell, ред., 1986 г.

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

- SEQ ID № 1: последовательность геномной ДНК гена LLR2, придающего устойчивость к Heterodera, из *Beta vulgaris subsp. maritima*.

- SEQ ID № 2: последовательность кДНК гена LLR2, придающего устойчивость к Heterodera, поскольку он не встречается в природе.

- SEQ ID № 3: аминокислотная последовательность белка LLR2, придающего устойчивость к Heterodera, поскольку он кодируется SEQ ID № 1 или SEQ ID № 2.

- SEQ ID № 4: последовательность геномной ДНК гена LLR1, придающего устойчивость к Heterodera, из *Beta vulgaris subsp. maritima*.

- SEQ ID № 5: последовательность кДНК гена LLR1, придающего устойчивость к Heterodera, поскольку он не встречается в природе.

- SEQ ID № 6: аминокислотная последовательность белка LLR1, придающего устойчивость к Heterodera, поскольку он кодируется SEQ ID № 4 или SEQ ID № 5.

- SEQ ID № 7: последовательность геномной ДНК гена LLR3, придающего устойчивость к Heterodera, из *Beta vulgaris subsp. maritima*.

- SEQ ID № 8: последовательность кДНК гена LLR3, придающего устойчивость к Heterodera, поскольку он не встречается в природе.

- SEQ ID № 9: аминокислотная последовательность белка LLR3, придающего устойчивость к Heterodera, поскольку он кодируется SEQ ID № 7 или SEQ ID № 8.

- SEQ ID № 10: аллельная версия молекулярного маркера s5e3001s02, придающая устойчивость

- SEQ ID № 11: чувствительная аллельная версия молекулярного маркера s5e3001s02

- SEQ ID № 12: аллельная версия молекулярного маркера s5e4668xxx, придающая устойчивость

- SEQ ID № 13: чувствительная аллельная версия молекулярного маркера s5e4668xxx

Молекулярный маркер s5e3001s02 и молекулярный маркер s5e4668xxx являются внешними фланкирующими маркерами области, придающей устойчивость, которая содержит гены, придающие устойчивость, по SEQ ID № 1 и/или SEQ ID № 4.

Дополнительные молекулярные маркеры, пригодные для идентификации генов устойчивости по SEQ ID № 1 и/или SEQ ID № 4, или для идентификации геномных областей, кодирующих полипептид, придающий устойчивость, по SEQ ID № 3 или SEQ ID № 6, приведены в табл. 4. Маркеры также могут быть использованы для различения между придающей устойчивостью аллельной версией генов по настоящему изобретению и аллельной версией этих генов, которая не придает устойчивости.

Табл. 4 74

Маркер	SEQ ID №	Аллельный вариант, придающий устойчивость
s5e4355xxx	14	нет
s5e4355xxx	15	да
s5e7304s01	16	нет
s5e7304s01	17	да
s5e3316xxx	18	нет
s5e3316xxx	19	да
s5e3735xxx	20	да
s5e3735xxx	21	нет
s5p8662s01	22	да
s5p8662s01	23	нет
s5e4282xxx	24	нет
s5e4282xxx	25	да
s5e5857s01	26	да
s5e5857s01	27	нет
s5e5006xxx	28	нет
s5e5006xxx	29	да
s5p4394s01	30	нет
s5p4394s01	31	да
s5e5974s01	32	нет
s5e5974s01	33	да
s5e5869s01	34	да
s5e5869s01	35	нет
s5e5976s01	36	да
s5e5976s01	37	нет
s5p4361s01	38	нет

s5p4361s01	39	да
s5e5865s01	40	нет
s5e5865s01	41	да
s5p2211s01	42	нет
s5p2211s01	43	да
s5e5868s01	44	нет
s5e5868s01	45	да
s5e5890s01	46	нет
s5e5890s01	47	да
sxi0735s01	48	нет
sxi0735s01	49	да
s5e5894s01	50	да
s5e5894s01	51	нет
s5e5893s01	52	да
s5e5893s01	53	нет
s5p4401d01	54	да
s5p4401d01	55	нет
s5e5883s01	56	да
s5e5883s01	57	нет
s5e5887s01	58	нет
s5e5887s01	59	да
s5e5888s01	60	нет
s5e5888s01	61	да
s5e4503s02	62	да
s5e4503s02	63	нет
s5e4503xxx	64	да
s5e4503xxx	65	нет
s5e4021xxx	66	нет
s5e4021xxx	67	да
s5e5771s05	68	да
s5e5771s05	69	нет
s5e5771s01	70	нет
s5e5771s01	71	да
s5e5771s02	72	нет

s5e5771s02	73	да
s5e5771s03	74	да
s5e5771s03	75	нет
s5e3504xxx	76	нет
s5e3504xxx	77	да
s5e2943xxx	78	нет
s5e2943xxx	79	да
s5e2730xxx	80	да
s5e2730xxx	81	нет
s5e5182s03	82	нет
s5e5182s03	83	да
s5e6157s02	84	да
s5e6157s02	85	нет
s5e6157s03	86	да
s5e6157s03	87	нет

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Проведение теста на нематоду

- 1) Растения по настоящему изобретению высевали в тепличный торфяной субстрат
- 2) Растения пересаживали после появления всходов в стадии семядолей в пластиковые ящики (размером примерно 2*1*15 см), вместимостью примерно 30 мл, заполненные кварцевым песком в виде отдельных растений (одно растение на ящик). В качестве альтернативы саженцы из тканевой культуры могут быть перенесены непосредственно в пластиковые ящики. Условия температуры и освещенности: 16/8 часов света/темноты с изменением температуры 23 °C/12 °C.
- 3) Через неделю после пересадки имитировали заражение путем применения 600 личинок *Heterodera schachtii*.
- 4) Оценка растений и количества цист проводилась под биноклем через 4 недели после заражения.

Пример 2: Сборка генов

Локус устойчивости расположен на хромосоме 5, и целевая область была уменьшена в несколько этапов картирования до фланкирующих маркеров s5e5864s01 (интегрированная генетическая карта: 9,17 cM) и s5e4503s02 (9,74 cM), охватывающих физическое

расстояние 119341 п.о. на эталонной физической карте (ZR_VPMv7 – чувствительная к моногермии эталонная последовательность). В ходе скрининга ВАС устойчивой донорской линии были идентифицированы три клона ВАС для целевой области генома. Клоны ВАС были секвенированы с использованием метода PacBio (Fichot, Erin B., и R. Sean Norman. Microbial phylogenetic profiling with the Pacific Biosciences sequencing platform. *Microbiome* 1.1 (2013 г.): 10). Этот способ позволяет получать более длинные контиги последовательностей контигов и, таким образом, облегчает последующую сборку контигов, сгенерированных из геномных областей, содержащих повторяющиеся последовательности. Была собрана устойчивая последовательность без брешей, позволяющая проводить сравнения последовательностей между устойчивым и чувствительным эталонным генотипом, и разрабатывать новые маркеры в целевой области. На новом этапе точного картирования с использованием доступных рекомбинантов целевая область была уменьшена до двух новых фланкирующих маркеров, охватывающих участок последовательности 26484 п.о. у устойчивого и 39587 п.о. у чувствительного генотипов. Уменьшенная целевая область содержит только 9 аннотированных генов. Среди этих генов три tandemно повторяющихся гена LRR были идентифицированы как потенциальные причинные гены-кандидаты для устойчивости к NRBMH (LRR1, LRR2 и LRR3 (фигура 1)). Целевая область демонстрирует высокую степень сложности: а) устойчивая последовательность содержит большую дубликацию последовательности; б) гены LRR демонстрируют сходство последовательностей; в) в чувствительных генотипах несколько ретротранспозонов встроены в целевую область. Ввиду сложности последовательности сборка последовательностей RR и ss была очень трудоемкой и очень сложной процедурой.

В пределах уменьшенной целевой области было обнаружено пять рекомбинаций, и 180 потомков этих рекомбинантов были фенотипированы. Фенотипы определялись с помощью интенсивных статистических методов (t-критерий, степенной анализ). Выборка, состоящая из 10 растений на процент совпадений, из числа этих пяти рекомбинантов была проанализирована с использованием специфических доминантных маркеров, разработанных для трех генов LRR. Удалось протестировать на функциональность три гена LRR. Ген LRR1 как примерный результат не показывает никакие противоречивые данные ни в одном из рекомбинантов, т. е. все рекомбинанты, несущие ген LRR1, являются устойчивыми.

Процесс «клонирования на основе карты» включал в себя следующие этапы: генетическое точное картирование, физическое картирование, анализ последовательности WHG (всего генома), построение нескольких больших сегрегирующих популяций, рекомбинантный

скрининг, разработка маркера в целевой области, сравнительное секвенирование ВАС в устойчивом генотипе, анализ последовательностей устойчивого и чувствительного генотипа, биоинформатические анализы, прогнозирование белков, сравнение белков. Следующие этапы имели решающее значение для настоящего изобретения: точное картирование в сочетании с интенсивным фенотипированием, идентификация и секвенирование устойчивых клонов ВАС, разработка доминантных маркеров для трех генов LRR, анализ последовательностей, и сравнение последовательностей и белков между RR (устойчивыми) и ss (чувствительными) генотипами.

Пример 3: Введение гена, придающего устойчивость, в качестве трансгена посредством трансформации гена в *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*

Трансгенный подход к получению растений, устойчивых к *Heterodera*, применялся не только для альтернативной проверки гена (генов) LRR в качестве гена (генов), придающего (придающих) устойчивость, но и в качестве средства получения трансгенных событий устойчивости, которые придают новую устойчивость к *Heterodera* или улучшают уже существующую устойчивость к *Heterodera*.

Представляющий интерес ген LRR был клонирован в бинарный вектор pZFN-nptII (фигура 2) с помощью следующих стандартных процедур клонирования: внутри Т-ДНК этого вектора была клонирована кДНК гена устойчивости между дублированным промотором CaMV 35S и терминатором нопалинсинтазы (NOS), в целях обеспечения высокого конститутивного уровня экспрессии гена устойчивости в трансгенном растении. Кроме того, Т-ДНК включает в себя ген неомицинофосфотрансферазы II (*nptII*), который придает устойчивость к ряду аминогликозидных антибиотиков, таких как канамицин или паромомицин. Эти устойчивости к антибиотикам были использованы для отбора трансгенных растительных клеток и тканей. Промотор NOS и терминатор pAG7 фланкируют ген *nptII*. Кроме того, остов бинарного вектора содержит источник *ColE1* и *pVS1* для репликации плазмиды в *Escherichia coli* или *Agrobacterium tumefaciens*. Ген *aadA* придает устойчивость к стрептомицину/спектиномицину для отбора бактерий. Плазмиду pZFN-nptII-LRR трансформировали в штамме агробактерии AGL-1 посредством стандартной процедуры.

Трансформацию сахарной свеклы проводили в соответствии с Lindsey & Gallois (1990 г.), Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris*) by *Agrobacterium tumefaciens*, Journal of experimental botany, 41.5, стр. 529-536). Для этого в качестве исходного материала использовали «микроразмноженные побеги» генотипа 04E05B1DH5, который несет исключительно чувствительные аллели идентифицированного гена. Побеги размножали в

соответствующей среде в соответствии с Lindsey & Gallois (1990 г.). В целях индуцирования максимально большого количества меристем, «побеги» переносили в другую среду (см. Lindsey & Gallois (1990 г.)) и инкубировали в темном месте в течение нескольких недель при температуре примерно 30 °С. Штамм агробактерии AGL-1 с вектором pZFN-nptII-LRR культивировали в дополнительной среде (см. Lindsey & Gallois (1990 г.)), дополнительно снабженной соответствующими антибиотиками для отбора. Срезы меристемной ткани на основе обрабатываемого побега инкубировали с агробактерией в течение нескольких часов в дополнительной среде (см. Lindsey & Gallois (1990 г.)). Эксплантаты растений и агробактерии совместно культивировали в темном месте в течение по меньшей мере 2 дней в среде (см. Lindsey & Gallois (1990 г.)), и затем инокулированные эксплантаты инкубировали в темном месте в течение приблизительно 2 недель в дополнительной среде (см. Lindsey & Gallois (1990 г.)). После этого эксплантаты были дополнительно размножены в дополнительной среде (см. Lindsey & Gallois (1990 г.)) и субкультивированы в целях обеспечения возможности отбора трансгенной ткани. Затем листовую материал экстрагировали из зеленых растущих «побегов» и исследовали с помощью ПЦР на наличие трансгена. Подходящие «побеги» были укоренены и впоследствии перенесены в теплицу для получения семенного материала T1. Устойчивость к *Heterodera* в растениях T1 может быть протестирована впоследствии с помощью протокола, описанного в примере 1. Результаты приведены в табл. 1 – 3.

Табл. 1:

Линия	Геотипы	Количество цвет, подсчитанных на промытых корнях каждого отдельного растения																				Σ расте- ний	среднее кол-во цвет	Σ растений не более чем с 30 цветками																
		78	83	70	63	61	42	46	53	58	57	70	23	54	37	59	43	50	72	45	33				35															
A	чувствительный гибрид	78	83	70	63	61	42	46	53	58	57	70	23	54	37	59	43	50	72	45	33	35													21	54	1			
B	гомозиготная устойчивая линия – эталон	7	16	18	11	13	21	14	12	17	16	24	23	13	17	7	14	7	11	12	11															20	14	20		
C	контроль трансформации	8	35	46	26	41	25	23	41	31	61	45	48	38	28	33	47	55	18	13	42	13	29													25	34	8		
D	контроль трансформации	47	38	21	9	29	24	24	10	34	32	35	41	40	33	19	30	44	50	53	34	49	38	47	52	31										25	34,5	8		
E	контроль трансформации	36	>60	40	25	48	6	45	54	>60	50	44	>60	53	44	30	58	53	40	43	44	22	17	26	34	45										25	-	6		
F	контроль трансформации	31	34	37	24	34	17	29	25	29	48	34	23	34	34	42	41	43	47	40	32	27	28	24	53											25	34	9		
G	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 2	21	14	5	16	1	12	3	19	0	0																									10	-	10		
H	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 2	33	8	36	45	3	23	51	9	16	5	1	39	22	15	43	19	23	22	11	19	43	20	23	16	25										25	-	18		
I	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 2	33	24	20	25	24	23	42	25	22	24	15	31	17	10	10	17	19	22	14	34	24	20	21	21											25	-	20		
J	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 2	19	22	30	11	14	13	14	36	18	38	6	7	24	15	3	20	25	18	17	17	6	19	20	14	6										25	-	23		
K	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 2	20	10	28	8	5	25	3	5	7	5	11	7	9	17	31	15	11	3	40																	19	-	17	
L	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	46	36	36	>60	60	58	29	44	43	21	25	28	13	38	42	34	41	0	8	33	16	5	18	38	34											25	-	10	
M	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	>60	54	19	30	56	24	>60	30	44	>60	34	40	>60	18	16	39	>60	>60	51	>60	>60	45	22													25	-	7	
N	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	26	28	36	32	45	27	30	57	44	58	1	18	>60	37	46	>60	19	39	14	19	58	18	32	16	14											25	-	12	
O	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	53	27	30	26	31	41	37	38	34	22	50	17	52	14	46	43	34																				17	-	6
P	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	26	1	31	31	16	28	51	11	9	32	23	47	8	48	30	18	28	51	53	49	44	50	50	46	14											25	-	12	
Q	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	17	46	12	49	19	12	5	3	34	42	9	2	37	2	7	12	9	4																		18	-	13	
R	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	34	44	31	21	>60	>60	57	42	54	61	42	>60	48	38	>60	19	39	14	19	58	18	32	16	14												25	-	7	
S	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	32	22	31	6	24	50	29	18	17	6	14	12	58	18	10	25	19	39	15	11	22	24	14													25	-	18	
T	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	19	13	61	22	38	9	37	42	49	55	17	58	39	34	25	29	51	22	>60	53	20	13	29													25	-	11	
U	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	36	56	39	43	43	40	28	21	18	21	16	5	9	20	13	36	11	12	34	23	39	19	18	30	13											25	-	16	
V	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	35	34	47	21	23	33	16	13	25	48	54	35	24	14	26	36	27	35	43	63	33	24	39													25	-	10	
W	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	63	33	47	12	43	33	24	42	5	1	3	35	23	19	4	18	28	17	34	40	36	33	22	20	9										25	-	14		
X	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	11	16	>60	13	26	15	47	20	51	38	20	27	23	24	9	13	2	7	33	17	10	42	9	31												25	-	17	
Y	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	49	13	24	14	34	32	16	11	25	26	24	32	16	15	27	11	5	18	6	26	26	11	29	5											25	-	20		

Поскольку нематоды поражают корневую ткань, в анализ, показанный в таблицах, были включены только растения, которые показывали типичное развитие корней. Сегрегирующие растения представляют собой самовоспроизводство гетерозиготных трансгенных регенерантов. Ожидаемая фенотипическая сегрегация составляет 3

(устойчивых) к 1 (чувствительному). Растения с 30 или менее цистами считаются фенотипически устойчивыми, и соответствующие значения в табл. 1 выделены жирным шрифтом. Поскольку следует ожидать определенного стандартного отклонения, для статистической оценки было получено достаточно большое количество линий и отдельных особей.

Табл. 2

Линия	Генотип	Соотношение растений не более чем с 30 цистами (растений с устойчивым фенотипом) относительно общего количества растений [%]
A	чувствительный гибрид	4,8
B	гомозиготная устойчивая линия – эталон	100
C	контроль трансформации	32
D	контроль трансформации	32
E	контроль трансформации	24
F	контроль трансформации	36
G	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 2	100
H	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 2	72
I	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 2	80
J	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 2	92
K	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 2	89
L	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	40
M	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	28
N	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	48
O	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	35
P	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	48
Q	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	72
R	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	28
S	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	72
T	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	44
U	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	64
V	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	40
W	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	56
X	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	68
Y	сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	80

В табл. 2 показан процент растений не более чем с 30 цистами, которые считаются фенотипически устойчивыми растениями. Линия А является типично чувствительной линией, и только 4,8 % протестированных особей показали устойчивый фенотип. Линия В является линией, известной своей хорошей устойчивостью. 100 % протестированных особей линии В показали устойчивый фенотип. Поскольку только определенные линии адаптированы к применению для генетической трансформации, линии, используемые для преобразований, также были протестированы на устойчивость (в нетрансгенном

состоянии): протестированные четыре линии С – F показали 24-36 % фенотипически устойчивых особей.

Табл. 3

Генотип	Среднее соотношение растений, демонстрирующих устойчивый фенотип по всем линиям [%]
чувствительный гибрид	4,8
гомозиготная устойчивая линия – эталон	100
контроль трансформации	31
сегрегирующая конструкция SEQ ID № 2	86.6
сегрегирующая конструкция SEQ ID № 5	51.6
конструкция SEQ ID № 2 с поправкой на сегрегацию	~ 100
конструкция SEQ ID № 5 с поправкой на сегрегацию	~ 86.6

Вследствие сегрегации статистически ожидается, что 25 % трансформантов не являются носителями гена устойчивости. Принимая это во внимание, значение 75 % фенотипически устойчивых растений будет равно 100 % устойчивости, придаваемой соответствующим трансгеном. Таким образом, последние две строки табл. 3 показывают статистически скорректированные значения (умножение на коэффициент 1,33). Значения табл. 3 показывают значительное увеличение количества растений, имеющих устойчивый фенотип, после трансформации SEQ ID № 2 и SEQ ID № 5 по сравнению с контрольной группой трансформации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеотидная последовательность для повышения устойчивости к нематоды рода *Heterodera* у растения, в котором экспрессируется молекула нуклеиновой кислоты, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из:

(a) нуклеотидной последовательности, которая содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №№ 1, 4 и 7, или ее функционального фрагмента;

(b) нуклеотидной последовательности, которая содержит кодирующую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №№ 2, 5 и 8, или ее функционального фрагмента;

(c) нуклеотидной последовательности, которая в строгих условиях гибридизуется с комплементарной последовательностью нуклеотидной последовательности по (a), (b), (f) или (g);

(d) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, которая по меньшей мере на 70 % идентична нуклеотидной последовательности по любому из (a), (b), (f) или (g);

(e) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК, которая является аллелем или производным по (a), (b), (f) или (g), путем делеции, замещения, вставки, транзиции и/или присоединения одного или нескольких нуклеотидов;

(f) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№ 3, 6 и 9, или ее функционального фрагмента;

(g) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 70 % идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№ 3, 6 и 9;

(h) нуклеотидной последовательности, которая является вариантом последовательности ДНК любого из (a) – (g) вследствие вырожденности генетического кода,

при этом нуклеотидная последовательность необязательно функционально связана с промотором.

2. Вектор или экспрессионная кассета, содержащая нуклеотидную последовательность по п. 1.

3. Клетка, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1, или вектор или экспрессионную кассету по п. 2.

4. Дражированный и/или примированный семенной материал, содержащий нуклеотидную последовательность по п. 1, вектор или экспрессионную кассету по п. 2, или клетку по п. 3.

5. Дражированный и/или примированный семенной материал по п. 4, отличающийся тем, что дражированный и/или примированный семенной материал содержит нуклеотидную последовательность по п. 1, или содержит последовательность, кодирующую тот же полипептид эндогенно или трансгенно.

6. Дражированный и/или примированный семенной материал по п. 4, при этом дражированный и/или примированный семенной материал, который содержит нуклеотидную последовательность, эндогенно принадлежит к виду *Beta vulgaris* и не принадлежит к *B. vulgaris subsp. maritima*

7. Дражированный и/или примированный семенной материал по пп. 4, 5 или 6, который был подвергнут обработке, выбранной из группы, состоящей из:

- (a) шлифования;
- (b) инкрустации
- (c) окрашивания

8. Способ повышения устойчивости к нематоде рода *Heterodera* у растения, включающий следующие этапы:

(i) интеграция нуклеотидной последовательности по п. 1 посредством репарации, направляемой гомологией, или гомологичной рекомбинации, предпочтительно стимулируемой сайт-направленной нуклеазой, в геном по меньшей мере одной клетки растения и необязательная регенерация растения из растительной клетки; или

(ii) увеличение экспрессии полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью по п. 1, в растении, предпочтительно путем модификации нативного промотора или путем слияния кодирующей полипептид последовательности с

гетерологичным промотором, который проявляет более высокую активность по сравнению с нативным промотором, в частности, при заражении патогеном рода *Heterodera*; или

(iii) трансформация растительной клетки с помощью нуклеотидной последовательности по п. 1, или вектора или экспрессионной кассеты, содержащих нуклеотидную последовательность по п. 1, и необязательная регенерация трансгенного растения из трансформированной растительной клетки.

9. Способ получения растения, обладающего устойчивостью к нематоде рода *Heterodera*, включающий следующие этапы:

(a) трансформация растительной клетки с помощью нуклеотидной последовательности по п. 1, или вектора или экспрессионной кассеты, содержащих нуклеотидную последовательность по п. 1; и

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

(i) введение сайт-направленной нуклеазы и матрицы репарации в клетку растения, при этом сайт-направленная нуклеаза способна генерировать по меньшей мере один одноцепочечный разрыв или по меньшей мере один двухцепочечный разрыв ДНК в геноме клетки, предпочтительно против хода и/или по ходу транскрипции от целевой области, и матрица репарации содержит нуклеотидную последовательность по п. 1 или полипептид, кодирующий часть нуклеотидной последовательности по п. 1;

(ii) культивирование клетки по (i) в условиях, которые обеспечивают репарацию, направляемую гомологией, или гомологичную рекомбинацию, при этом нуклеотидная последовательность интегрируется из матрицы репарации в геном растения; и

(iii) регенерация растения из клетки, модифицированной по (ii); или

(I) введение сайт-направленной нуклеазы или редактора оснований в клетку растения, предпочтительно растения рода *Beta*, более предпочтительно растения вида *Beta vulgaris*, в котором сайт-направленная нуклеаза генерирует по меньшей мере один одноцепочечный разрыв или по меньшей мере один двухцепочечный разрыв ДНК в геноме клетки, предпочтительно против хода транскрипции, по ходу транскрипции или в пределах целевой области, которая гомологична нуклеотидной последовательности по п. 1,

II) культивирование клетки из (I) в условиях, которые допускают модификацию целевой области, выбирается из:

- (1) замены по меньшей мере одного нуклеотида;
 - (2) делеции по меньшей мере одного нуклеотида;
 - (3) вставки по меньшей мере одного нуклеотида; или
 - (4) любой комбинации (1) – (3); и
- (III) регенерация растения из клетки, модифицированной в (II).

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что целевая область:
- a) находится между маркером s5e3001s02 в соответствии с SEQ ID № 10 или SEQ ID № 11 и маркером s5e4668xxx в соответствии с SEQ ID № 12 или SEQ ID № 13, или
 - b) фланкирована маркером s5e3001s02 в соответствии с SEQ ID № 10 или SEQ ID № 11 и маркером s5e4668xxx в соответствии с SEQ ID № 12 или SEQ ID № 13, или
 - c) содержит хромосомный интервал между маркером s5e3001s02 в соответствии с SEQ ID № 10 или SEQ ID № 11 и маркером s5e4668xxx в соответствии с SEQ ID № 12 или SEQ ID № 13;

и необязательно содержит аллельный вариант нуклеотидной последовательности по п. 1, причем аллельный вариант не придает устойчивости к нематоде рода *Heterodera*, если присутствует в растении.

11. Способ по п. 9 или 10, отличающийся тем, что по меньшей мере один одноцепочечный разрыв или по меньшей мере один двухцепочечный разрыв происходит в позиции, которая находится максимум на 10 000 пар оснований против хода транскрипции и/или по ходу транскрипции относительно целевой области, или которая отстоит максимум на 10 000 пар оснований от аллельного варианта, определенного в п. 10.

12. Способ идентификации и, необязательно, получения или селекции растения, устойчивого к нематоде рода *Heterodera*, отличающийся тем, что способ включает, по меньшей мере, этап (i) или (ii):

- (i) обнаружение присутствия и/или экспрессии нуклеотидной последовательности по п. 1 в растении или части растения; и/или
- (ii) обнаружение по меньшей мере одной области, косегрегированной в пределах нуклеотидной последовательности по п. 1; и
- (iii) необязательная селекция растения, обладающего устойчивостью к нематоде рода *Heterodera*.

13. Растение, полученное из дражированного и/или примированного семенного материала по одному из пп. 4 – 7.

14. Способ культивирования растений, включающий в себя:

(i) получение растения по п. 11 или семян по одному из пп. 4 – 7, получение растений способом по одному из пп. 9 – 11 или идентификацию и селекцию растений способом по п. 12, и

(ii) выращивание растений из п. (i) или их потомков,

при этом данный способ противодействует заражению культурных растений нематодой рода *Heterodera*.

15. Олигонуклеотид длиной 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 наиболее предпочтительно по меньшей мере 100, 200, 300 или 500 нуклеотидов, который специфически гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, определенной по п. 1, в которой олигонуклеотид прямо или косвенно связан с флуорохромом.

16. Олигонуклеотид по п. 15, в котором флуорохром представляет собой FAM или HEX.

17. Смесь олигонуклеотидов – предпочтительно смесь олигонуклеотидов по п. 16 или набор, содержащий смесь олигонуклеотидов, – в которой олигонуклеотиды пригодны для гибридизации в качестве прямого праймера и обратного праймера к области в геноме *Beta vulgaris*, которая косегрегируется в *Beta vulgaris* с устойчивостью к нематоды рода *Heterodera*, придаваемой молекулой нуклеиновой кислоты по п. 1 или полипептидом по п. 2, при этом предпочтительно область в геноме *Beta vulgaris* расположена между маркером s5e3001s02 и маркером s5e4668xxx, фланкирована маркером s5e3001s02 и маркером s5e4668xxx, или содержит хромосомный интервал между маркером s5e3001s02 и маркером s5e4668xxx.

18. Способ получения олигонуклеотида, пригодного для селекции растения или семян растения для устойчивости к нематоды рода *Heterodera*, включающий в себя:

(a) идентификацию геномных нуклеиновых кислот указанного растения или семян растения на наличие маркера, генетически связанного с геномной областью, в

которой указанная геномная область связана с устойчивостью к нематоде рода *Heterodera*, при этом указанный маркер геномной зрелости находится в пределах 12 сМ или в пределах 80 000 тысяч пар оснований от любого из SEQ ID №№: 1, 2 4, 5, 7, 8;

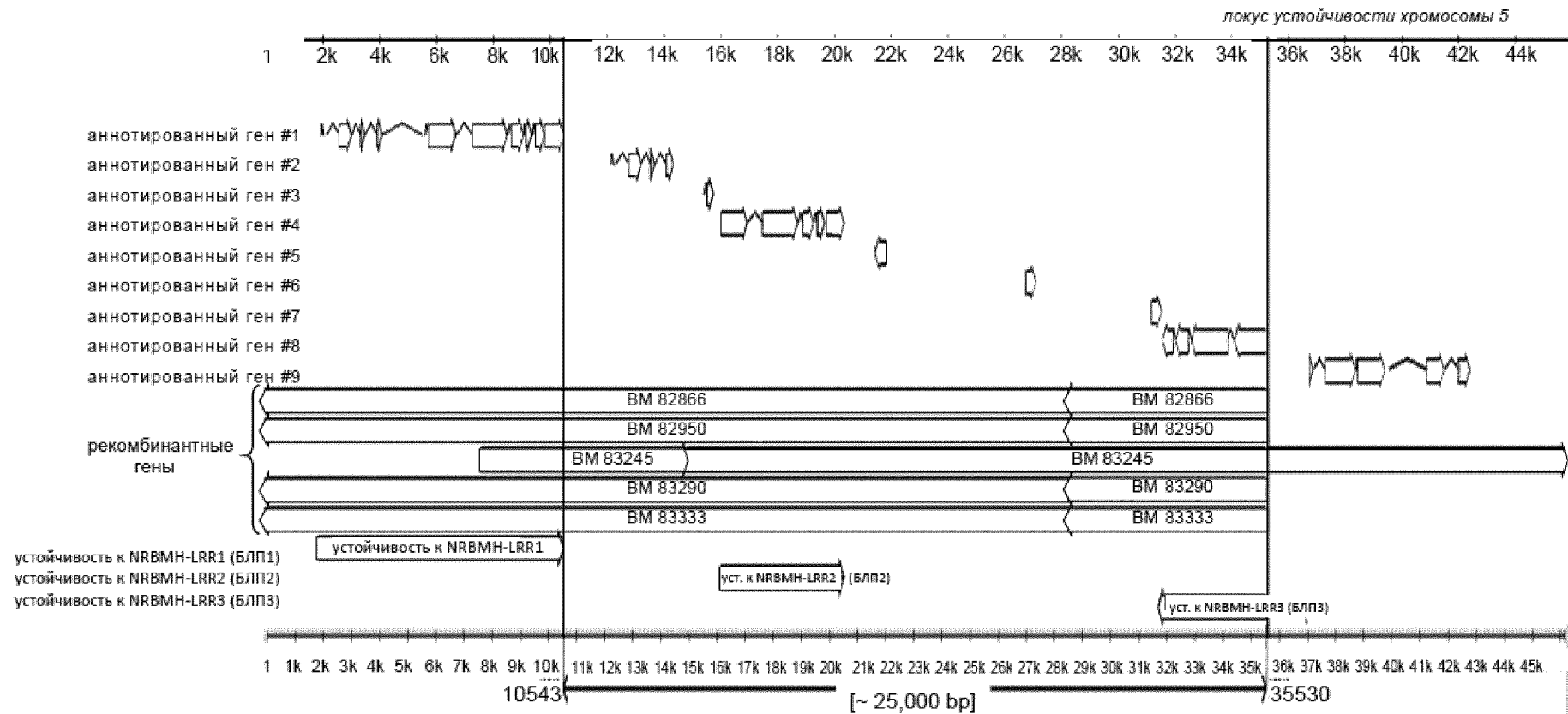
(b) получение олигонуклеотида, пригодного для гибридизации с маркером, указанным в п. (a).

19. Способ по п. 18, в котором олигонуклеотид связывается с флуорохромом.

20. Молекулярный маркер, олигонуклеотид или праймер, содержащий SEQ ID № из группы, состоящей из SEQ ID № 10 – 87.

21. Молекулярный маркер, олигонуклеотид или праймер, полученный из молекулярного маркера, олигонуклеотида или праймера по п. 20, причем молекулярный маркер, олигонуклеотид или праймер пригодны для селекции растения, содержащего нуклеотидную последовательность по п. 1, или пригодны для селекции растения, содержащего кодирующую часть нуклеотидной последовательности по п. 1.

22. Молекулярный маркер, олигонуклеотид или праймер по п. 20 или 21, содержащий одну или несколько химических модификаций или присоединений, выбранных из группы, состоящей из: нуклеотидов с удаленным азотистым основанием; нуклеотидов 8'охо dA и/или 8'охо dG; обратного основания на их 3'-конце; 2'О-метильных нуклеотидов; 5'-концевого кэпа; модификации остова, выбранной из группы, состоящей из модификации фосфотиоата, модификации метилфосфоната, модификации закрытой нуклеиновой кислоты (LNA), модификации O-(2-метоксиэтил) (MOE), модификации di PS и модификации пептидной нуклеиновой кислоты (PNA); внутряжелевых мостиков; флуоресцентных красителей, конъюгированных с ними; флуоресцентных красителей, конъюгированных с ними на 5' или 3' конце GRON; и одного или нескольких оснований, которые увеличивают энергию гибридизации; 2'О-метильных нуклеотидов на их 5' конце; 2'О-метильных нуклеотидов на их 3' конце, флуоресцентного красителя, конъюгированного с их 5'-концом, флуоресцентного красителя, конъюгированного с их 3'-концом, остатков фосфотиоата на их 5' конце, остатков фосфотиоата на их 3' конце, 3'-блокирующих заместителей, 5'-блокирующих заместителей, как 3'-, так и 5'-блокирующих заместителей.



Фиг. 1