



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки 2023.03.15

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

(22) Дата подачи заявки 2021.08.05

(54) ГЕН УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ И СРЕДСТВА ЕГО ИДЕНТИФИКАЦИИ

(31) 20191416.5

(72) Изобретатель:

(32) 2020.08.17

Торьек Отто, Борхардт Дитрих,

(33) EP

Мехелке Вольфганг, Шульц Бритта,

(86) PCT/EP2021/071944

Лайн Йенс Кристоф (DE)

(87) WO 2022/037967 2022.02.24

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

КВС ЗААТ СЕ & КО. КГАА (DE)

Зуйков С.А. (RU)

(57) Более эффективная селекция, направленная против заболевания пятнистостью листьев, вызываемой Церкоспорой, или разработка новых устойчивых линий обеспечивается путем предложения гена, опосредующего устойчивость к Церкоспоре в соответствии с настоящим изобретением; в частности, эффект доминантной устойчивости у растения-мишени вызывается свойством единственного идентифицированного гена. Ген, опосредующий устойчивость к Церкоспоре, и варианты осуществления настоящего изобретения, которые описаны ранее, предлагают дополнительные области применения, например, использование аллеля гена устойчивости в цисгенетических или трансгенетических подходах с целью создания новых устойчивых сортов.

202390384

A1

Sequence alignment data showing nucleotide sequences and their corresponding amino acid translations. The sequences are presented in a grid format with line numbers on the left and right sides.

A1

202390384

Ген устойчивости растений и средства его идентификации

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

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

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Церкоспорозная пятнистость листьев является одним из наиболее важных, распространенных во всем мире заболеваний листьев различных растений, включая виды *Beta vulgaris* и *Spinacia oleracea* (Шпинат огородный). Ее вызывает гриб *Cercospora beticola*. Растения, зараженные этим заболеванием, обычно образуют небольшие, относительно круглые пятна на листьях (2-3 мм), которые в середине светло-серые и окружены красно-коричневой каймой. При сильном заражении пятна на листьях перекрываются, так что целые участки листовой пластинки высыхают. Внутри полностью образованных пятен видны небольшие черные точки (псевдоостромые), а во влажных условиях образуется серый войлокообразный покров (носители конидий с конидиями) - преимущественно на нижней стороне листа. Сильно зараженные листья сначала желтеют, затем буреют и отмирают. Параллельно происходит рост новых листьев, однако при этом

листья снова заболевают и отмирают. Сначала симптомы заражения видны только на отдельных растениях; однако при распространении заболевания зачастую происходит образование стойких очагов заражения. Дальнейшее распространение по всему полю происходит посредством дождя и ветра. В случае растений мангольда, потребители не воспринимают поврежденные листья, и даже небольшое давление заболевания может привести к серьезному недобору урожая.

Патоген *Cercospora beticola* был впервые описан во второй половине 19 века в Италии. До 40% потерь урожая может произойти из-за сильного заражения, которое может быть вызвано влажной погодой, ранним закрытием рядов посадок, высоким потенциалом заражения в предыдущие годы или чрезмерным поливом. Эти потери происходят в результате снижения урожая свеклы и снижения содержания сахара, см. Хольтшульте ((2000) "*Cercospora beticola* – распространение заболеваемости по всему миру", стр. 5-16, в "Биология *Cercospora beticola* Sacc., агротехническое воздействие и меры борьбы за качество сахарной свеклы", том 2 (под ред. М.Дж.К. Ашер, Б. Хольтшульте, М.Р. Молард, Ф. Россо, Г. Штайнрюккен, Р. Беккерс). Международный институт исследований свеклы, Брюссель, Бельгия, стр. 215). Для борьбы с заболеванием зачастую используют посадки в междурядьях или фунгициды. Химическая борьба с *Cercosporabeticola* с помощью фунгицидов влечет за собой затраты для фермера и загрязняет окружающую среду. Более того, обработка съедобных листьев мангольда химическими веществами снижает восприятие потребителями. Повторное применение фунгицидов дополнительно увеличивает давление отбора на толерантные к фунгицидам штаммы *Cercospora beticola*. Это противоречит устойчивой сельскохозяйственной практике. Стоит упомянуть, что в течение последних нескольких лет появились стебли с *Cercospora beticola*, которые показали устойчивость, по меньшей мере, к одному фунгициду; см. Тркуля, Ненад Р. и соавт. "Молекулярные и экспериментальные доказательства мультиустойчивости полевых популяций *Cercospora beticola* к фунгицидам MBC (Тиофанаты), DMI (Триазолы) и QOI (Сторобилурины)". *European Journal of Plant Pathology* 149.4 (2017): 895-910. Проблема стала настолько серьезной, что Федеральное ведомство по защите прав потребителей и безопасности пищевых продуктов Германии (BVL) одобрило льготный допуск фунгицидов на основе меди для борьбы с Церкоспорой. Однако фунгициды на основе меди обычно считаются (в зависимости от дозировки) вредными для человека и окружающей среды. Медь - это тяжелый металл, который может накапливаться в почве.

Косвенно борются путем отбора сортов со здоровыми листьями и культивирования свеклы с использованием, по меньшей мере, 3-летней ротации сельскохозяйственной культуры. Существенно лучшая борьба с заражением может быть достигнута при использовании комбинации толерантных или устойчивых сортов. Менее восприимчивые сорта свеклы, устойчивые к Церкоспоре, предлагаются на рынке с 2000 года (Штайнрюккен 1997, "Die Züchtung von Cercospora-resistenten Zuckerrüben". ["Селекция сахарной свеклы, устойчивой к Церкоспоре"], Vorträge für Pflanzenzüchtung [Лекции по селекции растений], Том 37, Лекционный симпозиум, 4-5 марта, 1997 г., Киль). Эти сорта обладают количественной устойчивостью к *Cercospora beticola*. Устойчивость этих сортов основана на нескольких генах и передается количественно, при этом точное количество генов, ответственных за устойчивость, неизвестно; см. Вейланд и Кох (2004), Пятнистость листьев сахарной свеклы (*Cercospora beticola* Sacc.), *The Plant Journal*, 5(3), 157-166. Сложная количественная наследственность была подтверждена посредством нескольких анализов локусов количественных признаков (QTL). Этот способ позволяет провести картирование полигенной наследуемой устойчивости и является надежным методом идентификации количества и положения факторов генетической устойчивости на генетической карте сцепления растения-хозяина. Таким образом, можно было бы определить множественные причинные QTL на каждой хромосоме сахарной свеклы.

Картирования проводили с различными донорами, устойчивыми к Церкоспоре, при этом наблюдаемые эффекты QTL были, по большей части, незначительными. Максимальные заявленные фенотипические значения были на уровне 5%.

В непрерывных исследованиях были описаны списки дифференциально экспрессируемых генов. В исследовании Вельтмейер *и соавт.*, ((2011) Профили транскриптов в генотипах сахарной свеклы раскрывают сроки и силу защитных реакций на заражение *Cercospora beticola*, *Молекулярные взаимодействия растений и микробов*, 24 (7), 758-772), профиль экспрессии на стороне генома для различных генотипов сахарной свеклы (то есть, устойчивый, толерантный, восприимчивый и так далее к *Церкоспоре*) был создан с помощью технологии на основе микрочипов во время заражения патогеном с целью анализа транскрипционных изменений в профиле экспрессии в связи с пятнистостью листьев. С помощью этих анализов авторы смогли создать профиль транскрипции, индуцированный патогеном, в различных испытываемых генотипах сахарной свеклы и определить потенциальные гены-кандидаты. Однако эти гены еще не были подробно

охарактеризованы. Генетические и функциональные предпосылки устойчивости к Церкоспоре и идентичность генов устойчивости до сих пор были совершенно неясны.

Однако при количественной наследственности QTL, в растение привносится не только желаемая устойчивость к *Cercospora beticola*, но и, скорее, зачастую также нежелательные признаки, такие как, например, снижение урожайности, из-за наследования дополнительных генов, которые сцеплены с положительным признаком устойчивости к Церкоспоре. Это явление также известно под термином "сцепленный груз". Кроме того, огромные затраты на селекцию, необходимые для отбора множественных локусов устойчивости, при этом без снижения урожайности, могут негативно сказаться на жизнеспособности растений; см. Вейланд и Кох, 2004.

Компании, занимающиеся селекцией, уже более десяти лет предлагают на рынке сорта, толерантные к Церкоспоре. Устойчивость этих сортов наследуется посредством множества генов устойчивости с небольшим эффектом. Однако недостаток этих сортов состоит в том, что разработка сорта является очень трудоемкой и сложной из-за сложной наследственности, и у таких сортов при отсутствии заражения наблюдаются более низкие показатели урожайности по сравнению с обычными сортами. Среди прочего, это может быть связано с эпигенетическим взаимодействием некоторых генов устойчивости с генами, отвечающими за производство сахара, что приводит к снижению приспособленности растений в отсутствие патогена. Кроме того, Церкоспора демонстрирует тенденцию к преодолению толерантности традиционных сортов. Более того, имеющиеся на данный момент баллы устойчивости неадаптированных диких генетических ресурсов обычно ненадежны и несопоставимы друг с другом, поскольку основные исследования проводились в разных условиях окружающей среды, при разном давлении заражения и с разными патогенными стеблями с Церкоспорой. В связи с этим следует отметить, что параметры окружающей среды, такие как влажность, температура, ветер и т.д. (которые, как правило, нестабильны) оказывают значительное влияние на прогрессирование заболевания Церкоспорозом после заражения. Обычно определенный генетический ресурс демонстрирует высокий уровень толерантности / устойчивости в одном исследовании и, как правило, имеет тенденцию к полной восприимчивости в другом исследовании. Из-за вышеуказанных факторов до сих пор не удалось идентифицировать доминирующий ген устойчивости, оказывающий существенное влияние на Церкоспору, хотя существует большая потребность в таком гене, который можно было бы легко перенести в уже существующие сорта для придания устойчивости к Церкоспоре.

Использование новых методов селекции, основанных на редактировании генов, например, с помощью нуклеаз TALE (эффектор, подобный фактору транскрипции) или систем CRISPR (кластеризованные регулярные промежуточные короткие палиндромные повторы), а также трансгенных подходов неприменимо к имеющемуся на данный момент генетическому материалу из-за сложной наследственности и множества генов, которые участвуют в развитии устойчивости, большинство из которых еще не были идентифицированы и охарактеризованы.

Для селекции растений, устойчивых к церкоспорозной пятнистости листьев, то есть, для противодействия опасности, исходящей от вариантов Церкоспоры, преодолевающих устойчивость, необходимо постоянно идентифицировать новые гены устойчивости и интегрировать их в генные пулы культивируемых растений, таких как сахарная свекла. В частности, цель состояла в предложении подходящих генов устойчивости, которые, после экспрессии в растении, сами по себе уже производят очень большой эффект доминантной устойчивости к *Cercospora beticola*. В соответствии с настоящим изобретением, эта цель достигается с помощью вариантов осуществления, описанных в формуле изобретения и в спецификации.

РЕФЕРАТ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной придавать устойчивость к Церкоспоре - в частности, к грибу *Cercospora beticola* - присутствующему в растении, и, в частности, в *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*. Таким образом, в растении образуется полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты. Молекула нуклеиновой кислоты, после экспрессии которой образуется полипептид, сама по себе уже производит в растении очень большой эффект доминантной устойчивости к *Cercospora beticola*.

Кроме того, настоящее изобретение относится к устойчивому к Церкоспоре растению, растительной клетке, органу растения, растительной ткани, части растения, семени, семенному материалу или потомку растения, которое эндогенно или трансгенно содержит молекулу нуклеиновой кислоты или ее части. В соответствии с конкретным необязательному варианту осуществления настоящего изобретения, исключаются те растения и их компоненты, которые были получены посредством по существу биологического процесса.

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

Следовательно, настоящее изобретение относится к вариантам осуществления, которые перечислены в следующих пунктах и проиллюстрированы на примерах и фигурах.

- [1] Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, способный придавать устойчивость к Церкоспоре растения, в котором экспрессируется полипептид, характеризующаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая выбрана из
- (a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID No. 3;
 - (b) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID No. 2;
 - (c) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 53;
 - (d) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с нуклеотидной последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктами (a), (b) или (c) в жестких условиях;
 - (e) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, который, посредством замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты аминокислотной последовательности, отличается от полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью в соответствии с пунктами (a), (b) или (c);
 - (f) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 70% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 3;
 - (g) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 70% идентична последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 2;

при этом устойчивость к Церкоспоре является предпочтительно устойчивостью к *Cercospora beticola*, или при этом растение является предпочтительно растением подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, и является, особенно предпочтительно, сахарной свеклой.

- [2] Молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с пунктом [1], характеризующаяся тем, что эффект устойчивости к Церкоспоре, придаваемый полипептидом, является доминирующим в растении - предпочтительно, при этом полипептид придает эффект устойчивости, по меньшей мере, в один рейтинговый балл, и, предпочтительно, в более, чем один рейтинговый балл, особенно предпочтительно, по меньшей мере, в два рейтинговых балла, особенно предпочтительно, по меньшей мере, в три рейтинговых балла и, особенно предпочтительно, по меньшей мере, в четыре рейтинговых балла.
- [3] Молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с пунктом [1] или [2], характеризующаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты происходит из *Beta vulgaris* subsp. *maritima*.
- [4] Полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с одним из пунктов [1] - [3].
- [5] Вектор или кассета экспрессии, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с одним из пунктов [1] - [3], при этом молекула нуклеиновой кислоты является предпочтительно гетерологичной по отношению к вектору или кассете экспрессии.
- [6] Клетка, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с одним из пунктов [1] - [3], или вектор, или кассету экспрессии в соответствии с пунктом [5], при этом молекула нуклеиновой кислоты или кассета экспрессии предпочтительно присутствуют в виде эндогена или трансгена.
- [7] Устойчивое к Церкоспоре растение или его часть, характеризующееся тем, что растение или его часть содержит молекулу нуклеиновой кислоты или нуклеотидную последовательность в соответствии с одним из пунктов [1] - [3], или вектор, или кассету экспрессии в соответствии с пунктом [5], при этом растение, которое

эндогенно содержит молекулу нуклеиновой кислоты представляет собой растение вида *Beta vulgaris*, а не *Beta vulgaris* subsp. *maritima* - или *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*. Молекула нуклеиновой кислоты или нуклеотидная последовательность могут содержаться эндогенно или трансгенно. Семена растения в соответствии с этим пунктом могут быть получены из хранилища NCIMB (Национальные коллекции промышленных, пищевых и морских бактерий), Абердин, Великобритания под номером доступа NCIMB 43646. Растение в соответствии с этим пунктом можно получить из хранящихся семян.

- [8] Растение в соответствии с пунктом [7], характеризующееся тем, что растение является гибридным растением.
- [9] Растение в соответствии с пунктом [7] или [8], характеризующееся тем, что молекула нуклеиновой кислоты присутствует гетерозиготно или гомозиготно в геноме растения.
- [10] Семя или потомок растения в соответствии с одним из пунктов [7] - [9], при этом семя или потомок содержит молекулу нуклеиновой кислоты или нуклеотидную последовательность в соответствии с одним из пунктов [1] - [3] или вектор, или кассету экспрессии в соответствии с пунктом [5]. Молекула нуклеиновой кислоты может присутствовать трансгенно или нетрансгенно, или эндогенно. Семена растения в соответствии с этим пунктом могут быть получены из хранилища NCIMB, Абердин, Великобритания под номером доступа NCIMB 43646.
- [11] Способ повышения устойчивости растения к Церкоспоре, включающий следующие этапы:
- (i) интеграция молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с одним из пунктов [1] - [3], или вектора, или кассеты экспрессии в соответствии с пунктом [5], посредством гомологично направленной репарации или гомологичной рекомбинации - предпочтительно, поддерживаемой сайт-направленной нуклеазой - в геном, по меньшей мере, одной клетки растения и необязательно регенерация растения из, по меньшей мере, одной растительной клетки; или
 - (ii) увеличение экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с одним из пунктов [1] - [3], по меньшей мере, в одной клетке растения - предпочтительно, посредством модификации нативного промотора, например, содержащего

последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID No. 7, или посредством сцепления молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с одним из пунктов [1] - [3] с гетерологичным промотором, который имеет более высокий уровень активности по сравнению с нативным промотором, например, содержащий последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID No. 7 - в частности, после заражения Церкоспорой - и необязательно регенерация растения из, по меньшей мере, одной растительной клетки; или

- (iii) повышение активности и/или стабильности полипептида в соответствии с пунктом [4] посредством модификации нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с одним из пунктов [1] - [3], по меньшей мере, в одной клетке растения и необязательно регенерация растения из, по меньшей мере, одной растительной клетки; или
- (iv) трансформация растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с одним из пунктов [1] - [3], или вектором, или кассетой экспрессии в соответствии с пунктом [5], и необязательно регенерация (трансгенного) растения из трансформированной растительной клетки;

при этом устойчивость к Церкоспоре является предпочтительно устойчивостью к *Cercospora beticola*, или растение является предпочтительно растением вида *Beta vulgaris*, - предпочтительно *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* - и, в частности, сахарной свеклой.

[12] Способ получения растения, устойчивого к Церкоспоре, в соответствии с одним из пунктов [7] - [9], включающий следующие этапы:

- (a) трансформация растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с одним из пунктов [1] - [3], или вектором, или кассетой экспрессии в соответствии с пунктом [5], и
- (b) регенерация трансгенного растения из трансформированной растительной клетки; или
 - (i) введение сайт-направленной нуклеазы и репарационной матрицы в клетку растения вида *Beta vulgaris*, при этом сайт-направленная нуклеаза способна генерировать, по меньшей мере, один двухцепочечный разрыв ДНК в геноме клетки - предпочтительно, выше и/или ниже области-мишени - и репарационная матрица содержит молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с одним из пунктов [1] - [3];

- (ii) культивирование клетки из пункта (i) в условиях, которые допускают гомологично направленную репарацию или гомологичную рекомбинацию, при этом молекула нуклеиновой кислоты инкорпорирована из репарационной матрицы в геном растения; и
- (iii) регенерация растения из клетки, модифицированной в пункте (ii).

[13] Способ в соответствии с пунктом [12], характеризующийся тем, что область-мишень содержит аллельный вариант молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с одним из пунктов [1] - [3], при этом аллельный вариант кодирует полипептид, не придающий устойчивость или незначительную устойчивость к Церкоспоре.

[14] Способ в соответствии с пунктом [12] или [13], характеризующийся тем, что, по меньшей мере, один двухцепочечный разрыв происходит в положении, которое составляет не более 10 000 пар оснований выше и/или ниже области-мишени, или которое составляет не более 10 000 пар оснований, которые находятся на расстоянии от аллельного варианта, как определено в пункте [13].

[15] Способ в соответствии с пунктом [12] или [13], характеризующийся тем, что аллельный вариант молекулы нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая выбрана из

- (a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID No. 6;
- (b) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID No. 5;
- (c) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID No. 4;
- (d) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с нуклеотидной последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктами (a), (b) или (c) в жестких условиях;
- (e) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, который, посредством замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты аминокислотной последовательности, отличается от полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью в соответствии с пунктами (a), (b) или (c); или

- (f) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 80% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 6;
- [16] Растение или его часть, полученное или получаемое в соответствии со способом в соответствии с одним из пунктов [12] - [15].
- [17] Способ идентификации и необязательно предложения растения вида *Beta vulgaris*, устойчивого к Церкоспоре, характеризующийся тем, что способ включает, по меньшей мере, этап (i) или (ii):
- (i) обнаружение присутствия и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с одним из пунктов [1] - [3] или присутствия полипептида в соответствии с пунктом [4] в растении или части растения; и/или
 - (ii) обнаружение, по меньшей мере, одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с одним из пунктов [1] - [3] или в косегрегирующей области; и
 - (iii) возможный выбор растения, устойчивого к *Cercospora beticola*, при этом обнаружение на этапе (i) или на этапе (ii) основано на использовании, по меньшей мере, одного молекулярного маркера.
- [18] Способ идентификации молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, способный придавать устойчивость к Церкоспоре растению вида *Beta vulgaris*, в котором экспрессируется полипептид, характеризующийся тем, что способ включает следующие этапы:
- (i) сравнение аминокислотной последовательности полипептида в соответствии с пунктом [4] с аминокислотными последовательностями из базы данных последовательностей или идентификация аллельных вариантов, которые кодируют полипептид в соответствии с пунктом [4] в генотипах вида *Beta vulgaris*;
 - (ii) идентификация аминокислотной последовательности или аллельного варианта, кодирующего аминокислотную последовательность, при этом аминокислотная последовательность по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности полипептида в соответствии с пунктом [4];
 - (iii) введение молекулы нуклеиновой кислоты или аллельного варианта, кодирующего идентифицированную аминокислотную последовательность, в

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

(iv) обнаружение устойчивости к Церкоспоре.

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

(i) предложение растений в соответствии с одним из пунктов [7] - [9], посадка гранулированных семян растения сахарной свеклы или растения рода *Beta* в соответствии с одним из пунктов [26] - [39], получение растений вида *Beta vulgaris* с помощью способа в соответствии с одним из пунктов [12] - [15], или идентификация и отбор растений рода *Beta* с помощью способа в соответствии с пунктом [17], и

(ii) культивирование растений из пункта (i) или их потомков, при этом способ противодействует заражению культивируемых растений Церкоспорой.

[20] 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, особенно предпочтительно, по меньшей мере, 100, 200, 300 или 500 нуклеотидов, причем олигонуклеотид гибридизируется с нуклеотидной последовательностью, как определено в одном из пунктов [1] - [3].

[21] Пара олигонуклеотидов - предпочтительно, олигонуклеотидов в соответствии с пунктом [20] или набор, содержащий эти олигонуклеотиды - при этом олигонуклеотиды подходят для гибридизации в качестве прямого праймера и обратного праймера с областью в геноме *Beta vulgaris*, который в *Beta vulgaris* имеет косегрегацию с устойчивостью к Церкоспоре, которую придает полипептид в соответствии с пунктом [4], или с молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с одним из пунктов [1] - [3].

[22] Использование молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с одним из пунктов [1] - [3] для получения устойчивых к Церкоспоре растений подвида *Betavulgaris subsp. vulgaris*.

[23] Способ получения организма, который содержит мутированную версию в соответствии с пунктом [1] и/или мутированную версию промотора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из

(a) SEQ ID NO: 7

(b) нуклеотидной последовательности, которая гибридизируется в жестких условиях с последовательностью, которая комплементарна последовательности в соответствии с пунктом (a)

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

при этом способ включает следующие этапы:

- (I) Предложение организма или клетки, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты и/или промотор
- (II) Увеличение частоты мутаций организма или клетки или мутагенез организма или клетки
- (III) Фенотипический отбор организма, который в результате мутации проявляет измененную устойчивость или измененный уровень устойчивости к *Cercospora beticola*, или генотипический отбор организма, или клетки, которая содержит мутацию в молекуле нуклеиновой кислоты и/или промоторе, при этом мутация была создана на этапе (II) и необязательно
- (IV) Регенерация организма из клетки, полученной на этапе (III).

[24] Способ в соответствии с пунктом [23], при этом организмом является растение.

[25] Способ в соответствии с пунктом [24], при этом растение представляет собой *Beta vulgaris*, предпочтительно *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, более предпочтительно сахарная свекла или свекла столовая красная.

[26] Гранулированное семя растения сахарной свеклы или растения рода *Beta*, включая свеклу столовую красную, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с пунктом [1].

[27] Гранулированное семя в соответствии с пунктом [26], при этом, свекольное тело подходит в качестве сырья для промышленного производства сахара или для употребления в пищу.

- [28] Гранулированное семя в соответствии с пунктом [26] или [27], при этом гранулированное семя является однозародышевым семенем.
- [29] Гранулированное семя в соответствии с пунктами [26] - [28], при этом растение сахарной свеклы собирают перед стрелкованием.
- [30] Гранулированное семя в соответствии с пунктами [26] - [29], при этом устойчивость к Церкоспоре является устойчивостью к *Cercospora beticola*.
- [31] Гранулированное семя в соответствии с пунктами [26] - [30], при этом растение сахарной свеклы является двухлетним.
- [32] Гранулированное семя в соответствии с пунктами [26] - [31] и [124], которое было технически обработано, при этом техническая обработка выбрана из группы, состоящей из:
- (a) полировки;
 - (b) протравливания;
 - (c) инкрустации; и
 - (d) окрашивания.
- [33] Гранулированное семя в соответствии с пунктами [26] - [32], при этом гранула содержит, по меньшей мере, одно химическое вещество, выбранное из группы, выбранной из:
- a) инсектицида;
 - (b) фунгицида; и
 - (c) удобрения.
- [34] Гранулированное семя в соответствии с пунктами [26] - [33], при этом семя было подвергнуто праймированию или предварительному проращиванию до или во время гранулирования.
- [35] Гранулированное семя в соответствии с пунктами [26] - [34], при этом растение сахарной свеклы представляет собой гибридное растение сахарной свеклы.

- [36] Гранулированное семя в соответствии с пунктами [26] - [35], при этом нуклеотидная последовательность включает, по меньшей мере, одну мутацию.
- [37] Гранулированное семя в соответствии с пунктом [36], при этом, по меньшей мере, одна мутация является мутацией относительно SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 2.
- [38] Гранулированное семя в соответствии с пунктом [36] или [37], при этом нуклеотидная последовательность, включающая, по меньшей мере, одну мутацию, кодирует полипептид, который имеет аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 3.
- [39] Гранулированное семя в соответствии с пунктом [38], при этом нуклеотидная последовательность, включающая, по меньшей мере, одну мутацию, кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID No. 3.
- [40] Упаковка, содержащая гранулированные семена в соответствии с пунктами [26] - [39] или содержащая семенной материал, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с пунктом [1], при этом предпочтительным семенным материалом является семенной материал растения рода *Beta*.
- [41] Смесь гранулированной массы и семян сахарной свеклы, при этом семена сахарной свеклы содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, способный придавать устойчивость к Церкоспоре, при этом нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из
- (a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID No. 3;
 - (b) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID No. 2;
 - (c) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 53;
 - (d) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с нуклеотидной последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктами (a), (b) или (c) в жестких условиях;

- (e) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, который, посредством замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты аминокислотной последовательности, отличается от полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью в соответствии с пунктами (a), (b) или (c);
- (f) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 70% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 3;
- (g) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 70% идентична последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 2;

[42] Способ получения гранулированных семян сахарной свеклы в соответствии с пунктами [26] - [39], содержащий следующие этапы:

a) предложение семян сахарной свеклы, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, способный придавать устойчивость к Церкоспоре,

при этом нуклеотидная последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из

(i) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 95% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 3; и

(ii) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 95% идентична последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 2

b) вложение семян сахарной свеклы в гранулированную массу

c) гранулированной массе дают высохнуть, или гранулированную массу высушивают.

[43] Гранулированное семя в соответствии с пунктами [36] - [39], при этом нуклеотидная последовательность, включающая, по меньшей мере, одну мутацию, является искусственной нуклеотидной последовательностью, которая не встречается в природе.

[44] Способ в соответствии с пунктом [23], при этом на этапе (II) применяется мутагенизирующее химическое вещество, такое как EMS (этилметансульфонат) или мутагенизирующее излучение.

[45] Сорт рода *Beta*, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с пунктом [1], или гранулированное семя сорта.

[46] Лист растения швейцарского мангольда, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с пунктом [1].

[47] Пакет – предпочтительно пластиковый пакет - содержащий, по меньшей мере, один лист растения мангольд в соответствии с пунктом [46].

[48] Способ идентификации растения, предпочтительно растения вида *Beta vulgaris* или растения подвида *Beta vulgaris subsp. vulgaris*, которое устойчиво или толерантно к Церкоспоре, характеризующийся тем, что способ включает следующие этапы:

- (i) обнаружение присутствия и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с пунктом [1] или нуклеотидной последовательности, как определено в пункте [1], или присутствия полипептида, который кодируется молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с пунктом [1], или нуклеотидной последовательности, как определено в пункте [1], в растении или части растения; и/или
- (ii) обнаружение, по меньшей мере, одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с пунктом [1] или в косегрегирующей области,

при этом, косегрегирующая область представляет собой геномную область, которая косегрегируется с устойчивостью к Церкоспоре, придаваемой полипептидом, или с молекулой нуклеиновой кислоты, или с нуклеотидной последовательностью, и, при этом, косегрегирующая область содержит и фланкирована предпочтительно маркером s4p1395s01 и s4p0421s01. Более предпочтительно, косегрегирующая область содержит и фланкирована парой маркеров, выбранных из списка, состоящего из: sxi0123s02 и s4p0238s01, s4p1396s01 и sxh1195s02, s4p1398s01 и s4p0234s01, s4p1462s01 и s4p0232s01, s4p1464s01 и s4p0323s01, s4p0044s01 и s4p0322s01, s4p0056s01 и s4p0320s01, s4p0058s01 и sxh0942s04, s4p0059s01 и sxh1834s05, s4p1564s01 и s4p0317s01, s4p1998s01 и s4p4308s01, s4p1343s01 и s4p4305d01, s4p1408s01 и sxh0678s01, s4p1565s01 и s4p4301s01, s4p1409s01 и s4p8772s01, s4p1411s01 и s4p4295s01. Более предпочтительно, косегрегирующая область содержит и фланкирована парой маркеров, выбранных из списка, состоящего из: s4p1343s01 и s4p0421s01, s4p1408s01 и s4p0238s01, s4p1565s01 и sxh1195s02

s4p1409s01 и s4p0234s01, s4p1411s01 и s4p0232s01, s4p1414s01 и s4p0323s01, s4p1485s01 и s4p0322s01, s4p0257s01 и s4p0320s01, s4p0258s01 и sxh0942s04, s4p0260s01 и sxh1834s05, sxh0876s05 и s4p0317s01, s4p0262s01 и s4p4308s01, s4p0263s01 и s4p4305d01. Для целей картирования рекомендуются следующие пары маркеров: s4p4293s01 и s4p8772s01, предпочтительно s4p4295s01 и s4p8772s01. Структурные особенности маркеров приведены в Таблице 1В. Способ может включать, по меньшей мере, один из следующих этапов:

- Предложение, по меньшей мере, одного растения, его ткани, семени или, по меньшей мере, одной его клетки
- Извлечение ДНК, предпочтительно геномной ДНК, по меньшей мере, из одного растения, его ткани, семени или, по меньшей мере, из одной его клетки и
- Выполнение обнаружения извлеченной ДНК
- Выбор растения, устойчивого к Церкоспоре.

[49] Способ в соответствии с любым из пунктов [48] или [104] - [113], характеризующийся тем, что способ включает следующий этап:

- создание передаваемых в электронном виде и/или сохраняемых в электронном виде данных, представляющих обнаружение присутствия молекулы нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности.

[50] Способ в соответствии с пунктом [49], характеризующийся тем, что способ включает следующий этап:

- хранение данных на машиночитаемом носителе.

[51] Способ в соответствии с одним из пунктов [48]-[50], при этом, маркеры являются молекулярными маркерами и/или диагностическими маркерами.

[52] Способ идентификации растения, которое демонстрирует устойчивость или толерантность к *Церкоспоре*, процесс, содержащий обнаружение в растении, по меньшей мере, одного полиморфизма – предпочтительно однонуклеотидного полиморфизма - по меньшей мере, одним маркером, при этом, по меньшей мере, один маркер находится в пределах хромосомного интервала, фланкированного двумя маркерами s4p1395s01 и s4p0421s01, или в пределах хромосомного интервала, фланкированного парой маркеров, раскрытых в пункте [48], и, при этом, растение содержит молекулу нуклеиновой кислоты или нуклеотидную последовательность в

соответствии с пунктом [1]. Маркеры могут быть диагностическими и/или молекулярными маркерами. Способ может включать, по меньшей мере, один из следующих этапов:

- Предложение, по меньшей мере, одного растения, его ткани, семени или, по меньшей мере, одной его клетки
- Извлечение ДНК, предпочтительно геномной ДНК, по меньшей мере, из одного растения, его ткани, семени или, по меньшей мере, из одной его клетки
- Выполнение обнаружения извлеченной ДНК и
- Выбор растения, устойчивого к Церкоспоре.

[53] Процесс в соответствии с пунктом [52] при этом,

(i) указанный, по меньшей мере, один однонуклеотидный полиморфизм генетически сцеплен с молекулой нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательностью в соответствии с пунктом [1] или имеет частоту рекомбинации примерно 10%, предпочтительно 5%, более предпочтительно 1%, или менее, с молекулой нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательностью в соответствии с пунктом [1], или

(ii) указанный, по меньшей мере, один однонуклеотидный полиморфизм расположен в пределах 2562 т.п.о., 2300 т.п.о., 2100 т.п.о., 1900 т.п.о., 1700 т.п.о., 1500 т.п.о., 1300 т.п.о., 1100 т.п.о., 900 т.п.о., 700 т.п.о., 500 т.п.о., 300 т.п.о., 100 т.п.о., 50 т.п.о., 25 т.п.о., 10 т.п.о., 5 т.п.о. или 1 т.п.о., или менее от молекулы нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктом [1].

[54] Процесс или способ в соответствии с любым из пунктов [48], [52], [104] - [113], при этом, растение демонстрирует повышенную устойчивость или толерантность к *Церкоспоре*, по сравнению с растением, в котором отсутствует молекула нуклеиновой кислоты или нуклеотидная последовательность в соответствии с пунктом [1]

[55] Процесс в соответствии с любым из пунктов [52] – [54], [57] – [70], [106] - [113], при этом, однонуклеотидный полиморфизм представляет собой нуклеотид, присутствие которого генетически и/или статистически сцеплено с присутствием молекулы нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательностью в соответствии с пунктом [1].

[56] Способ в соответствии с пунктами [52] – [55], при этом, по меньшей мере, один маркер является маркером, приведенным в Таблице 1b, или, по меньшей мере, один маркер является парой маркеров, как раскрыто в пункте [48].

[57] Процесс идентификации растения, которое является устойчивым или толерантным к *Церкоспоре*, процесс, содержащий обнаружение в растении или в ДНК растения, по меньшей мере, двух однонуклеотидных полиморфизмов, по меньшей мере, двумя маркерами, при этом, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на или в пределах первого хромосомного интервала, фланкированного маркером, выбранным из группы, состоящей из:

s4p1395s01, sxi0123s02, s4p1396s01, s4p1398s01, s4p1462s01, s4p1464s01, s4p0044s01, s4p0056s01, s4p0058s01, s4p0059s01, s4p1564s01, s4p1998s01, s4p1343s01, s4p1408s01, s4p1565s01, s4p1409s01, s4p1411s01, s4p1414s01, s4p1485s01, s4p0257s01, s4p0258s01, s4p0260s01, sxh0876s05, s4p0262s01, s4p0263s01, s4p0264s01, s4p2271s01, s4p4288s01, s4p4290d01, s4p4293s01

и нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктом [1], и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на или в пределах второго хромосомного интервала, фланкированного полинуклеотидом в соответствии с пунктом 1, и маркер, выбран из группы, состоящей из:

s4p0421s01, s4p0238s01, sxh1195s02, s4p0234s01, s4p0232s01, s4p0323s01, s4p0322s01, s4p0320s01, sxh0942s04, sxh1834s05, s4p0317s01, s4p4308s01, s4p4305d01.

[58] Процесс в соответствии с пунктом [57], при этом, по меньшей мере, два маркера и нуклеотидная последовательность в соответствии с пунктом [1] фланкируют первый и второй хромосомный интервал, не являясь частью первого или второго хромосомного интервала.

[59] Процесс в соответствии с пунктом [57] или [58], при этом, по меньшей мере, два маркера расположены каждый в пределах 2562 т.п.о., 2300 т.п.о., 2100 т.п.о., 1900 т.п.о., 1700 т.п.о., 1500 т.п.о., 1300 т.п.о., 1100 т.п.о., 900 т.п.о., 700 т.п.о., 500 т.п.о., 300 т.п.о., 100 т.п.о., 50 т.п.о., 25 т.п.о., 10 т.п.о., 5 т.п.о. или 1 т.п.о. или менее от молекулы нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктом [1].

- [60] Процесс в соответствии с пунктами [57] – [59], при этом, по меньшей мере, один маркер расположен в геномной области, имеющей идентичность, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% с SEQ ID No. 74 или SEQ ID No. 75, при этом, идентичность предпочтительно приходится на всю длину SEQ ID No. 74 или SEQ ID No. 75.
- [61] Процесс в соответствии с пунктами [57] – [60], при этом, один из, по меньшей мере, двух маркеров расположен в геномной области, имеющей идентичность, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% с SEQ ID No. 74 и один из, по меньшей мере, двух маркеров расположен в геномной области, имеющей идентичность, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% с SEQ ID No. 75, при этом, идентичность предпочтительно приходится на всю длину SEQ ID No. 74 или SEQ ID No. 75.
- [62] Процесс в соответствии с пунктами [57] - [61], при этом, по меньшей мере, один из двух маркеров расположены в пределах 2562 т.п.о., 2300 т.п.о., 2100 т.п.о., 1900 т.п.о., 1700 т.п.о., 1500 т.п.о., 1300 т.п.о., 1100 т.п.о., 900 т.п.о., 700 т.п.о., 500 т.п.о., 300 т.п.о., 100 т.п.о., 50 т.п.о., 25 т.п.о., 10 т.п.о., 5 т.п.о. или 1 т.п.о. или менее от молекулы нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктом [1].
- [63] Процесс в соответствии с пунктами [57] - [62], при этом, по меньшей мере, два маркера расположены в пределах 2562 т.п.о., 2300 т.п.о., 2100 т.п.о., 1900 т.п.о., 1700 т.п.о., 1500 т.п.о., 1300 т.п.о., 1100 т.п.о., 900 т.п.о., 700 т.п.о., 500 т.п.о., 300 т.п.о., 100 т.п.о., 50 т.п.о., 25 т.п.о., 10 т.п.о., 5 т.п.о. или 1 т.п.о. или менее от молекулы нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктом [1].
- [64] Процесс в соответствии с пунктами [57] – [63], включающий обнаружение, по меньшей мере, двух однонуклеотидных полиморфизмов в первом хромосомном интервале и, по меньшей мере, двух однонуклеотидных полиморфизмов во втором хромосомном интервале, при этом, каждый однонуклеотидный полиморфизм обнаруживается с помощью разного маркера.

- [65] Процесс в соответствии с пунктами [57] – [64], включающий следующие этапы
- Предложение, по меньшей мере, одного растения, его ткани, семени или, по меньшей мере, одной его клетки
 - Извлечение ДНК, предпочтительно геномной ДНК, по меньшей мере, из одного растения, его ткани, семени семени или, по меньшей мере, из одной его клетки и
 - Выполнение этапа обнаружения, как определено в любом из пунктов [57] – [64], извлеченной ДНК.
- [66] Процесс или способ в соответствии с пунктами [48] – [65], при этом, этап обнаружения включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР).
- [67] Процесс или способ в соответствии с пунктами [48] – [65] или [112], или [113], включающий полимеразную цепную реакцию (ПЦР), при этом, ПЦР включает два аллель-специфичных прямых праймера (или их использование) и, при этом, этап обнаружения включает метод резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), при этом, присутствие, отсутствие или вид флуоресценции определяется датчиком. Сигнал датчика может быть преобразован в передаваемые электронным способом и/или сохраняемые электронным способом данные, представляющие обнаружение присутствия молекулы нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктом [1]. Кроме того, данные, передаваемые в электронном виде и/или сохраняемые в электронном виде, могут храниться на машиночитаемом носителе. Видом флуоресценции может быть ее цвет / длина волны или конкретный краситель, ответственный за флуоресценцию (например, FAM или HEX).
- [68] Процесс в соответствии с пунктом [67] кроме того, включает один общий обратный праймер или включает использование одного общего обратного праймера. Примеры общих праймеров приведены в Таблице 1b.
- [69] Процесс в соответствии с любым из пунктов [67], [68] [112] и [113], при этом, определение флуоресценции датчиком представляет собой считывание конечной точки флуоресценции.
- [70] Процесс в соответствии с любым из пунктов [67] или [69], [112] и [113], при этом, каждый из двух аллель-специфичных прямых праймеров содержит уникальную

хвостовую последовательность, которая подвергается химическому связыванию со специфической кассетой FRET во время ПЦР.

- [71] Способ идентификации растения, предпочтительно растения вида *Beta vulgaris* или растения подвида *Beta vulgaris subsp. vulgaris*, которое устойчиво или толерантно к Церкоспоре, характеризующийся тем, что способ включает следующие этапы:
- Предложение, по меньшей мере, одного растения, его ткани, семени или, по меньшей мере, одной его клетки
 - Извлечение ДНК, предпочтительно геномной ДНК, по меньшей мере, из одного растения, его ткани, семени или, по меньшей мере, из одной его клетки и
 - Обнаружение присутствия или отсутствия молекулы нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктом [1] в извлеченной ДНК, предпочтительно с помощью маркера, как указано в Таблице 1b, или с помощью пары маркеров, как раскрыто в пункте [48], с помощью пары олигонуклеотидов в соответствии с пунктами [20], [21], [72] или [73], или [76], набор из трех олигонуклеотидов в соответствии с пунктом [74] или [75], или молекулярный маркер, или набор молекулярных маркеров в соответствии с пунктом [84].
 - Необязательно выбор растения, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты или нуклеотидную последовательность в соответствии с пунктом [1] в извлеченной ДНК.
- [72] Пара олигонуклеотидов, подходящих для использования в качестве праймера в ПЦР, которые способны гибридизоваться с геномным интервалом, который содержит и фланкирован маркерами s4p1395s01 и s4p0421s01. Предпочтительно, геномный интервал содержит и фланкирован парой маркеров, выбранных из списка, состоящего из: sxi0123s02 и s4p0238s01, s4p1396s01 и sxh1195s02, s4p1398s01 и s4p0234s01, s4p1462s01 и s4p0232s01, s4p1464s01 и s4p0323s01, s4p0044s01 и s4p0322s01, s4p0056s01 и s4p0320s01, s4p0058s01 и sxh0942s04, s4p0059s01 и sxh1834s05, s4p1564s01 и s4p0317s01, s4p1998s01 и s4p4308s01, s4p1343s01 и s4p4305d01, s4p1408s01 и sxh0678s01, s4p1565s01 и s4p4301s01, s4p1409s01 и s4p8772s01, s4p1411s01 и s4p4295s01. Наиболее предпочтительно, геномный интервал содержит и фланкирован парой маркеров, выбранных из списка, состоящего из: 4p1343s01 и s4p0421s01, s4p1408s01 и s4p0238s01, s4p1565s01 и sxh1195s02 s4p1409s01 и s4p0234s01, s4p1411s01 и s4p0232s01, s4p1414s01 и s4p0323s01, s4p1485s01 и s4p0322s01, s4p0257s01 и s4p0320s01, s4p0258s01 и sxh0942s04, s4p0260s01 и sxh1834s05, sxh0876s05 и s4p0317s01, s4p0262s01 и s4p4308s01, s4p0263s01 и

s4p4305d01. Геномный интервал может быть геномным интервалом растения вида *Beta vulgaris* или подвида *Beta vulgaris subsp. vulgaris*.

- [73] Пара олигонуклеотидов, подходящих для использования в качестве праймера в ПЦР, которые способны гибридизироваться с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID No. 74 или SEQ ID No. 75 или с последовательностью, которая, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности в соответствии с SEQ ID No. 74 или SEQ ID No. 75 по всей длине последовательности в соответствии с SEQ ID No. 74 или SEQ ID No. 75.
- [74] Набор из трех олигонуклеотидов, подходящих для использования в качестве праймера в ПЦР, включающий два прямых праймера и обратный праймер, при этом, каждый праймер имеет различную нуклеотидную последовательность и, при этом, обратный праймер и только один из двух прямых праймеров способны гибридизироваться с геномным интервалом, который содержит и фланкирован маркерами s4p1395s01 и s4p0421s01. Предпочтительно, геномный интервал содержит и фланкирован парой маркеров, выбранных из списка, состоящего из: sxh0123s02 и s4p0238s01, s4p1396s01 и sxh1195s02, s4p1398s01 и s4p0234s01, s4p1462s01 и s4p0232s01, s4p1464s01 и s4p0323s01, s4p0044s01 и s4p0322s01, s4p0056s01 и s4p0320s01, s4p0058s01 и sxh0942s04, s4p0059s01 и sxh1834s05, s4p1564s01 и s4p0317s01, s4p1998s01 и s4p4308s01, s4p1343s01 и s4p4305d01, s4p1408s01 и sxh0678s01, s4p1565s01 и s4p4301s01, s4p1409s01 и s4p8772s01, s4p1411s01 и s4p4295s01. Наиболее предпочтительно, геномный интервал содержит и фланкирован парой маркеров, выбранных из списка, состоящего из: 4p1343s01 и s4p0421s01, s4p1408s01 и s4p0238s01, s4p1565s01 и sxh1195s02 s4p1409s01 и s4p0234s01, s4p1411s01 и s4p0232s01, s4p1414s01 и s4p0323s01, s4p1485s01 и s4p0322s01, s4p0257s01 и s4p0320s01, s4p0258s01 и sxh0942s04, s4p0260s01 и sxh1834s05, sxh0876s05 и s4p0317s01, s4p0262s01 и s4p4308s01, s4p0263s01 и s4p4305d01.
- [75] Набор из трех олигонуклеотидов, подходящих для использования в качестве праймера в ПЦР, включающий два прямых праймера и обратный праймер, при этом, каждый праймер имеет различную нуклеотидную последовательность и, при этом, обратный праймер и только один из двух прямых праймеров способны гибридизироваться с последовательностью в соответствии с SEQ ID No. 74 или SEQ ID No. 75 или с последовательностью, которая, по меньшей мере, на 99% идентична

последовательности в соответствии с SEQ ID No. 74 или SEQ ID No. 75 по всей длине последовательности в соответствии с SEQ ID No. 74 или SEQ ID No. 75.

[76] Пара или набор олигонуклеотидов в соответствии с пунктами [72] – [75], при этом, каждый олигонуклеотид содержит или состоит из 15-40 нуклеотидов, предпочтительно 17-30 нуклеотидов, более предпочтительно 19-25 нуклеотидов.

[77] Процесс количественного анализа уровня устойчивости или толерантности растения к *Церкоспоре*, включающий следующие этапы:

- Предложение, по меньшей мере, одного первого растения или, по меньшей мере, одного семени первого растения, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты или нуклеотидную последовательность в соответствии с пунктом [1], и по меньшей мере, одного второго растения или, по меньшей мере, одного семени, по меньшей мере, второго растения, у которого отсутствует молекула нуклеиновой кислоты или нуклеотидная последовательность в соответствии с пунктом [1]

- Культивировать растения или дать семенам прорасти и культивировать проросшие растения, при этом, а) условия культивирования допускают взаимодействие с *Церкоспорой* или б) растения инокулируют *Церкоспорой*

- Определение зараженной поверхности, по меньшей мере, одного листа каждого из двух растений.

- Необязательно сравнение уровня устойчивости или толерантности первого растения с уровнем устойчивости или толерантности второго растения, и/или определение рейтингового балла для первого и/ или второго растения, выбранное из Таблицы 1А.

[78] Процесс в соответствии с пунктом [77], при этом, этап культивирования заменяют инокуляцией листа первого растения и листа второго растения *Церкоспорой* или раствором, содержащим *Церкоспору*.

[79] Способ сокращения применения фунгицидных агрохимикатов, включающий следующие этапы:

I) Предложение семян или семенного материала, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты или нуклеотидную последовательность в соответствии с пунктом [1].

II) Посадка или высаживание рядами семян или семенного материала с тем, чтобы обеспечить прорастание семян или семенного материала.

III) Культивирование проросших растений, полученные на этапе II)

IV) Сбор растений, выращенных на этапе III) или сбор частей растений, таких как органы запаса, стержневые корни или сбор семян растений, культивируемых на этапе III)

при этом, применение фунгицидных агрохимикатов на этапе II) и/или на этапе III) сокращено или отсутствует.

[80] Способ в соответствии с пунктом [79], при этом, фунгицидный агрохимикат представляет собой агрохимикат, эффективный против *Церкоспоры*, при этом, эти агрохимикаты могут включать агрохимикаты, которые содержат, по меньшей мере, один из следующих фунгицидов: эпоксиконазол, крезоксим-метил, тиофанат-метил, манкозеп и фунгициды, которые эффективны против *Церкоспоры*, упомянутые в другом месте настоящего описания.

[81] Способ в соответствии с пунктом [79] или [80], при этом, применение фунгицидных агрохимикатов на этапе II) и или этапе III) сокращается или исключается, по сравнению с культивированием растений, у которых отсутствует молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с пунктом [1], в тех же или сопоставимых условиях, что и у растений на этапе III).

[82] Использование маркера или молекулярного маркера для идентификации и/или выбора растения, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты или нуклеотидную последовательность в соответствии с пунктом [1].

[83] Использование в соответствии с пунктом [82], при этом, маркер или молекулярный маркер используется в процессе или способе в соответствии с пунктами [48] – [71].

[84] Молекулярный маркер или набор молекулярных маркеров – предпочтительно содержащий два или три молекулярных маркера – подходящий для использования в процессе или способе в соответствии с пунктами [48] – [71].

[85] Способ экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктом [1], содержащий следующие этапы:
i) Введение молекулы нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктом [1], по меньшей мере, в одну клетку

- ii) Культивирование, по меньшей мере, одной клетки в условиях, которые допускают пролиферацию, по меньшей мере, одной клетки, и/или которые допускают экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктом [1]
- [86] Способ в соответствии с пунктом [85], при этом, способ представляет собой способ экспрессии *in vitro*.
- [87] Способ в соответствии с пунктом [85] или [86], при этом, введение на этапе i) осуществляется путем трансформации, трансфекции, электропорации или инфильтрации.
- [88] Способ в соответствии с пунктами [85] – [87], при этом введение молекулы нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности представляет собой введение вектора, плазмиды или транспортной ДНК (тДНК).
- [89] Способ в соответствии с пунктами [85] – [88], при этом, молекула нуклеиновой кислоты или нуклеотидная последовательность является частью кассеты экспрессии и функционально сцеплена с промотором, который является активным, частично активным или индуцируемым, по меньшей мере, в одной клетке по пункту i). Кассета экспрессии может быть кассетой экспрессии в соответствии с пунктом [5].
- [90] Способ в соответствии с пунктом [89], при этом, промотор имеет, по меньшей мере, 95% идентичность с последовательностью промотора 35S, полученного из *Вируса мозаики цветной капусты*, или является промотором 35S, полученным из *Вируса мозаики цветной капусты*.
- [91] Способ в соответствии с пунктом [90], при этом, промотор 35S, полученный из *Вируса мозаики цветной капусты*, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID No. 225.
- [92] Способ в соответствии с пунктами [85] – [91], при этом, по меньшей мере, одна клетка представляет собой клетку растения.

[93] Способ в соответствии с пунктами [85] – [89], при этом, по меньшей мере, одна клетка представляют собой микроорганизмы, предпочтительно бактерии или грибковые клетки, например дрожжи.

[94] Растение по пунктам [7] – [9], характеризующееся тем, что растение, кроме того, содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, способный передавать устойчивость к патогенному вирусу Beet Necrotic Yellow Vein Virus BNYVV растению, в котором экспрессируется полипептид, характеризующееся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из

- a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 227 или SEQ ID NO: 228,
- b) нуклеотидной последовательности, содержащей кодирующую последовательность последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 226,
- c) нуклеотидной последовательности, которая гибридизируется с комплементарной последовательностью нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктом a) или b) в жестких условиях,
- d) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, который получен путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью в соответствии с пунктом a) или b), из полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью в соответствии с пунктом a) или b),
- e) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, который имеет аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, предпочтительно, по меньшей мере, на 95%, наиболее предпочтительно на 99% идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью в соответствии с пунктом a) или b), или
- f) нуклеотидной последовательности, которая кодирует, по меньшей мере, один нуклеотидсвязывающий домен (NBS), соответствующий положениям аминокислот 168-227 SEQ ID NO: 227 или соответствующий положениям

аминокислот 182-241 SEQ ID NO: 228, по меньшей мере, один домен, богатый лейцином (LRR), соответствующий положениям аминокислот 591-613 SEQ ID NO: 227, или соответствующий положениям аминокислот 605-627 SEQ ID NO: 228, и/или, по меньшей мере, один внутренний повторяющийся домен (IR), соответствующий положениям аминокислот 1013-1072 SEQ ID NO: 227, или соответствующий положениям аминокислот 1027-1086 SEQ ID NO: 228.

[95] Растение в соответствии с пунктами [7] – [9], при этом, растение получено из семян, сохраненных NCIMB, Абердин, Великобритания под номером доступа NCIMB 43646.

[96] Семя или потомок в соответствии с пунктом [10], при этом, семя или потомок могут быть получены из сохраненного NCIMB, Абердин, Великобритания под номером доступа NCIMB 43646.

[97] Растение в соответствии с пунктами [7] – [9], [94] и [95], кроме того, характеризующееся тем, что растение содержит SEQ ID NO. 182 или может быть обнаружено с помощью маркера s4p8772s01.

[98] Процесс селекции растения, устойчивого к *Церкоспоре* вида *Beta vulgaris*, включающий следующие этапы:

i) Получение семян из сохраненных семян NCIMB, Абердин, Великобритания, под номером доступа NCIMB 43646 или потомства их сохраненных семян.

ii) Культивирование семян этапа i) в условиях, которые позволяют расти растениям

iii) Скрещивание растений, полученным в результате этапа ii), с растением вида *Beta vulgaris*.

Способ может необязательно включать дополнительный этап

iv) Определения присутствия или отсутствия молекулы нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктом [1] в потомстве, полученном в результате этапа iii) с помощью способа или процесса, описанного в настоящем документе, как, например, способ или процесс в соответствии с пунктами [48] – [71].

[99] Использование передаваемых в электронном виде и /или хранящихся в электронном виде данных, полученных в результате процесса в соответствии с любым из пунктов

[49], [50], [69], [70] и [104] - [113] для определения прогнозируемой селекционной ценности растения в популяции растений.

[100] Использование в соответствии с пунктом [99], при этом, прогнозируемая селекционная ценность, по меньшей мере, частично зависит от устойчивости к *Церкоспоре* и, при этом, популяция растений содержит 1000 или менее растений.

[101] Растение в соответствии с одним из пунктов [7] – [9] или семя, или потомок растения в соответствии с пунктом [10], при этом, молекула нуклеиновой кислоты или нуклеотидная последовательность в соответствии с пунктом [1] содержится или интегрирована в качестве интрогрессии.

[102] Орган хранения растения в соответствии с одним из пунктов [7] – [9] или [101]. Органом хранения может быть стержневой корень, в частности, свекольное тело.

[103] Лист или листья растения в соответствии с одним из пунктов [7] – [9] или [101], при этом растением может быть швейцарский мангольд или растение рода *Spinacia*.

[104] Способ идентификации растения, которое является устойчивым или толерантным к Церкоспоре, характеризующийся тем, что способ включает следующие этапы:

- (i) обнаружение присутствия или отсутствия нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из
 - (a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID No. 3;
 - (b) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID No. 2;
 - (c) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 53;
 - (d) нуклеотидной последовательности, которая гибридизируется с комплементарной последовательностью нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктами (a), (b) или (c) в 4 x SSC (раствор цитрата и хлорида натрия) при температуре 65 °C, и

последующей повторной промывке в 0,1 x SSC при температуре 65 °C в течение приблизительно 1 часа в общей сложности;

- (e) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 3;
- (f) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 90% идентична последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 2
- (ii) обнаружение присутствия или отсутствия полипептида, который кодируется нуклеотидной последовательностью, как определено на этапе (i), в растении или части растения; и/или
- (iii) обнаружение, по меньшей мере, одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности, как определено на этапе (1) или в косегрегирующей области,

при этом, косегрегирующая область представляет собой геномную область, которая косегрегируется с устойчивостью к Церкоспоре, придаваемой полипептидом, или с молекулой нуклеиновой кислоты, или с нуклеотидной последовательностью, и, при этом, косегрегирующая область содержит и фланкирована маркером s4p1395s01 и s4p0421s01.

[105] Способ в соответствии с пунктом [104], характеризующийся тем, что способ включает следующий этап:

- (iv) выбор растения, устойчивого к Церкоспоре.

[106] Способ в соответствии с пунктом [104] или [105], при этом, обнаружение на этапе (i) или (iii) основано, по меньшей мере, на одном полиморфизме или однонуклеотидном полиморфизме.

[107] Способ в соответствии с пунктом [106], кроме того, характеризуется тем, что

- а) указанный, по меньшей мере, один полиморфизм или однонуклеотидный полиморфизм генетически сцеплен с нуклеотидной последовательностью или имеет частоту рекомбинации 10% или менее по отношению к нуклеотидной последовательности,

b) указанный, по меньшей мере, один полиморфизм или однонуклеотидный полиморфизм расположен в пределах 2562 т.п.о., 2300 т.п.о., 2100 т.п.о., 1900 т.п.о., 1700 т.п.о., 1500 т.п.о., 1300 т.п.о., 1100 т.п.о., 900 т.п.о., 700 т.п.о., 500 т.п.о., 300 т.п.о., 100 т.п.о., 50 т.п.о., 25 т.п.о., 10 т.п.о., 5 т.п.о. или 1 т.п.о. или менее от нуклеотидной последовательности,

c) указанный, по меньшей мере, один полиморфизм или однонуклеотидный полиморфизм обнаруживается в семенах, хранимых NCIMB, Абердин, Великобритания под номером доступа NCIMB 43646 или

d) указанный, по меньшей мере, один полиморфизм или однонуклеотидный полиморфизм является частью косегрегирующей области,

при этом, нуклеотидная последовательность представляет собой нуклеотидную последовательность, определенную на этапе (i) пункта [104], и, при этом, косегрегирующая область представляет собой косегрегирующую область, определенную на этапе (iii) пункта [104].

[108] Способ в соответствии с любым из пунктов [104]-[107], при этом, этап (i) и/или этап (iii), кроме того, включает следующие этапы, которые завершаются обнаружением:

a) Предложения, по меньшей мере, одного растения, его ткани, семени или, по меньшей мере, одной его клетки и

b) Извлечения ДНК, предпочтительно геномной ДНК, по меньшей мере, из одного растения, его ткани, семени или, по меньшей мере, из одной его клетки.

Это означает, например:

Способ идентификации растения, которое является устойчивым или толерантным к Церкоспоре, характеризующийся тем, что способ включает следующие этапы:

ia) Предложение, по меньшей мере, одного растения, его ткани, семени или, по меньшей мере, одной его клетки и

ib) Извлечение ДНК, предпочтительно геномной ДНК, по меньшей мере, из одного растения, его ткани, семени или, по меньшей мере, из одной его клетки и

ic) Обнаружение присутствия или отсутствия нуклеотидной последовательности, как определено на этапе (i) пункта [104]

- ii) обнаружение присутствия или отсутствия полипептида, который кодируется нуклеотидной последовательностью, как определено на этапе (i), в растении или части растения; и/или
- iiiа) Предложение, по меньшей мере, одного растения, его ткани, семени или, по меньшей мере, одной его клетки и iiiб) Извлечение ДНК, предпочтительно геномной ДНК, по меньшей мере, из одного растения, его ткани, семени или, по меньшей мере, из одной его клетки и
- iiiс) Обнаружение, по меньшей мере, одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности, как определено на этапе (1) или в косегрегирующей области,

при этом, косегрегирующая область представляет собой геномную область, которая косегрегируется с устойчивостью к Церкоспоре, придаваемой полипептидом, или с молекулой нуклеиновой кислоты, или с нуклеотидной последовательностью, и, при этом, косегрегирующая область содержит и фланкирована маркером s4p1395s01 и s4p0421s01.

[109] Способ в соответствии с пунктами [104]-[108], включающий использование, по меньшей мере, двух олигонуклеотидов.

[110] Способ в соответствии с пунктом [109], при этом, олигонуклеотиды подходят для использования в качестве праймера в ПЦР и способны гибридизироваться с геномным интервалом, который содержит и фланкирован маркерами s4p1395s01 и s4p0421s01 или парой маркеров, как раскрыто в пункте [48]. Предпочтительно олигонуклеотиды могут гибридизироваться во время ПЦР с геномной матрицей, содержащей нуклеотидную последовательность, как определено на этапе (i) пункта [104], таким образом/на таком расстоянии, что полученный амплификат содержит до 2000 п.о., предпочтительно до 1500 п.о., более предпочтительно 1000 п.о., наиболее предпочтительно до 500 или 200, или до 100 п.о.

[111] Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов формулы изобретения, при этом, растение представляет собой растение рода *Beta*, *Spinacia*, *Glycine*, *Daucus* или *Pastinaca*.

[112] Способ в соответствии с любым из пунктов [104] - [111], включающий ПЦР на этапе (i) и/или (iii), при этом, ПЦР включает два аллель-специфичных прямых праймера и, при этом, этап обнаружения включает метод резонансного переноса энергии флуоресценции, и, при этом, присутствие, отсутствие или вид флуоресценция

определяется датчиком, при этом, необязательно генерируется сигнал датчика. Сигнал датчика может быть преобразован в передаваемые электронным способом и/или сохраняемые электронным способом данные, представляющие обнаружение присутствия молекулы нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктом [1]. Кроме того, данные, передаваемые в электронном виде и/или сохраняемые в электронном виде, могут храниться на машиночитаемом носителе. Определение флуоресценции датчиком может представлять собой считывание конечной точки флуоресценции.

[113] Способ в соответствии с пунктом [112], включающий, кроме того, один общий обратный праймер. Предпочтительно обратный праймер и аллель-специфичные прямые праймеры могут гибридизироваться во время ПЦР с геномной матрицей, содержащей нуклеотидную последовательность, как определено на этапе (i) пункта [104], таким образом/на таком расстоянии, что полученный амплификат содержит до 2000 п.о., предпочтительно до 1500 п.о., более предпочтительно 1000 п.о., наиболее предпочтительно до 500 или 200, или до 100 п.о. Праймером могут быть олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды, упомянутые в пункте [109].

[114] Растение рода *Beta*, *Spinacia*, *Glycine*, *Daucus* или *Pastinaca*, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, который способен придавать устойчивость к *Церкоспоре* растению, в котором экспрессируется полипептид, характеризующееся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из:

- (a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID No. 3;
- (b) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID No. 2;
- (c) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 53;
- (d) нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется с комплементарной последовательностью нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктами (a), (b) или (c) в 4 x SSC при температуре 65 °C, и последующей повторной промывке в 0,1 x SSC при температуре 65 °C в течение приблизительно 1 часа в общей сложности;

- (e) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 3;
- (f) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 90% идентична последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 2

при этом, растение рода *Beta* или *Spinacia*, кроме того, содержит эндогенный аллель, кодирующий ерсп-синтазу (енолпирувил-шикимат-3-фосфат синтазу), имеющую в положении 179 аминокислоту, отличную от пролина. В соответствии с конкретным вариантом осуществления, эта ерсп-синтаза является мутированной ерсп-синтазой, и мутация была сгенерирована мутационным реагентом, облучением, редактированием генов, сайт-специфичной точечной мутацией, цинк-пальцевыми нуклеазами, TALENS или культивированием соответствующих клеток *in vitro* и последующей селекцией с использованием гербицида, такого как глифосат.

[115] Растение в соответствии с пунктом [114], дополнительно характеризующееся тем, что растение является гибридным растением.

[116] Растение в соответствии с пунктом [114] или [115], дополнительно характеризующееся тем, что растение является двойным гаплоидным растением.

[117] Растение, в соответствии с любым из пунктов [114]-[116], дополнительно характеризующееся тем, что устойчивость к *Церкоспоре* является доминирующей.

[118] Растение в соответствии с любым из пунктов [114]-[117], дополнительно характеризующееся тем, что молекула нуклеиновой кислоты или нуклеотидная последовательность содержится в виде интрогрессии.

[119] Растение в соответствии с любым из пунктов [114]-[118], дополнительно характеризующееся тем, что молекула нуклеиновой кислоты или нуклеотидная последовательность гомозиготна.

[120] Растение в соответствии с любым из пунктов [114]-[119], дополнительно характеризующееся тем, что растение обладает толерантностью к глифосату.

[121] Растение в соответствии с любым из пунктов [114]-[120], дополнительно характеризующееся тем, что молекула нуклеиновой кислоты или нуклеотидная последовательность содержится в виде трансгена.

[122] Растение в соответствии с любым из пунктов [114]-[121], дополнительно характеризующееся тем, что молекулу нуклеиновой кислоты или нуклеотидную последовательность можно получить из семян, хранящихся в NCIMB, Абердин, Великобритания под номером доступа NCIMB 43646.

[123] Орган хранения или лист растения в соответствии с любым из пунктов [114] -[122].

[124] Гранулированное семя растения в соответствии с любым из пунктов [114]-[122], характеризующееся тем, что семя содержит молекулу нуклеиновой кислоты и эндогенный аллель.

[125] Растение в соответствии с любым из пунктов [114]-[122], орган хранения или лист в соответствии с пунктом формулы изобретения 13 или гранулированное семя в соответствии с пунктом формулы изобретения 14, при этом, ерсп-синтаза, имеющая в положении 179 аминокислоту, отличную от пролина, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из

i) последовательности SEQ ID NO: 223

ii) последовательности i), имеющей в положении 179 аминокислоту, отличную от серина и пролина, или

iii) последовательности, имеющей идентичность, по меньшей мере, 90% с последовательностью i) или ii)

по всей длине последовательности.

[126] Способ в соответствии с любым из пунктов [104] - [113], при этом, косегрегирующая область представляет собой косегрегирующую область, как определено в пункте [48].

[127] Способ в соответствии с любым из пунктов [109] - [113], при этом, по меньшей мере, два олигонуклеотида являются олигонуклеотидами, как определено в пунктах [20], [21], [72] или [73].

[128] Смесь гранулированной массы и семян растения сахарной свеклы, характеризующаяся тем, что семена сахарной свеклы являются семенами растения в соответствии с любым из пунктов [114]-[122], характеризующаяся тем, что семена содержат молекулу нуклеиновой кислоты и эндогенный аллель.

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

То, что понимается под "рейтинговым баллом" по смыслу настоящего изобретения, представляет собой качественную оценку устойчивости к заражению *Церкоспорой*, которая представлена с использованием шкалы от 1 до 9 (где 1 = сильная устойчивость и 9 = отсутствие устойчивости).

Таблица 1А: 9-уровневый рейтинг устойчивости к Церкоспоре

Рейтинговый балл	Фенотип листьев	Фенотип целого растения
1	Здоровый лист	Здоровый лист, целый
3	Больной лист, пятна на наружных листьях	Целое растение, начало заболевания, пятна на наружных листьях
5	Больной лист, слияние пятен в отмирающие участки	Целое растение, прогрессирующее заболевание, слияние пятен в отмирающие участки
7	Больной лист, большая часть листа бурая и мертвая, только нижняя листовая пластинка еще жива	Все растение больно, большие части наружных листьев отмирают
9	Больные листья, листовая пластинка и черешок отмерли и высохли	Все растение больно, наружные листья отмерли, внутренние листья сильно повреждены, сильный рост новых листьев

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

В сочетании со спецификацией длины нуклеотидной последовательности термин "приблизительно" означает отклонение на +/- 200 пар оснований - предпочтительно на +/- 100 пар оснований и, особенно предпочтительно, на +/- 50 пар оснований.

Косегрегирующая область представляет собой геномную область, которая в большинстве случаев или всегда наследуется вместе с геномной областью, локусом, геном, полиморфизмом или однонуклеотидным полиморфизмом, с которым она генетически сопряжена, генетически сцеплена или примыкает, или находится рядом. Например, генетическое сцепление может быть передано по наследству, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% следующему поколению или косегрегирующей области и геномной области, локусу, гену, полиморфизму или однонуклеотидному полиморфизму, с которыми оно генетически сопряжено, генетически сцеплено или примыкает, или находится близко на расстоянии не более 2562 т.п.о., 2300 т.п.о., 2100 т.п.о., 1900 т.п.о., 1700 т.п.о., 1500 т.п.о., 1300 т.п.о., 1100 т.п.о., 900 т.п.о., 700 т.п.о., 500 т.п.о., 300 т.п.о., 100 т.п.о., 50 т.п.о., 25 т.п.о., 10 т.п.о., 5 т.п.о. или 1 т.п.о., или менее. Присутствие косегрегирующей области является показательным или диагностическим для соответствующей геномной области, локуса, гена, полиморфизма или однонуклеотидного полиморфизма. Косегрегирующие области могут быть обнаружены/идентифицированы соответствующими способами, маркерами и олигонуклеотидами, включенными в настоящий документ, например, в семенах, хранящихся в NCIMB, Абердин, Великобритания под номером доступа NCIMB 43646. В контексте настоящего изобретения косегрегирующей областью может быть, в частности, геномная область в растении рода *Beta*, *Spinacia*, *Glycine*, *Daucus* или *Pastinaca*.

Термин "растение" включает растения различных родов, включая, но не ограничиваясь ими, *Beta*, *Spinacia*, *Glycine*, *Daucus* и *Pastinaca*.

"Растение рода *Beta*" относится к семейству амарантовых (*Amaranthaceae*). В число этих растений входят растения видов *Beta macrocarpa*, *Beta vulgaris*, *Beta lomatogona*, *Beta macrorhiza*, *Beta corolliflora*, *Beta trigyna* и *Beta nana*. Растение вида *Beta vulgaris* является, в частности, растением подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*. Например, среди них есть *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *altissima* (сахарная свекла в более узком смысле), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *vulgaris* (мангольд), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *conditiva* (свекла обыкновенная / свекла столовая красная), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *crassa/alba* (кормовая свекла). Следует отметить, что нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением не встречается в природе в сахарной свекле, мангольде, свекле обыкновенной или кормовой свекле, но может быть введена в них посредством воздействия человека.

"Растение рода *Spinacia*" относится к семейству амарантовых (Amaranthaceae). К этому роду, в частности, относится *Spinacia oleracea*, которая также известна как шпинат.

"Растение рода *Glycine*" относится к семейству бобовые (Fabaceae). К этому роду, в частности, относится *Glycine max*, который также известен как соевый боб.

"Растение рода *Daucus*" относится к семейству сельдерейные (Apiaceae). Этот род, в частности, охватывает *Daucus carota* и *Daucus carota* subsp. *sativus*, который также известен как морковь.

"Растение рода *Pastinaca*" относится к семейству сельдерейные (Apiaceae). Этот род, в частности, охватывает *Pastinaca sativa*, который также известен как пастернак.

"Функциональный фрагмент" нуклеотидной последовательности означает сегмент нуклеотидной последовательности, который обладает функциональностью, идентичной или сравнимой с функциональностью полной нуклеотидной последовательности, из которой происходит функциональный фрагмент. Как таковой, функциональный фрагмент может иметь нуклеотидную последовательность, которая идентична или гомологична всей нуклеотидной последовательности по всей длине, по меньшей мере, на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% или 99%. Он также явно охватывает диапазон от 90 до 100%. Кроме того, "функциональный фрагмент" нуклеотидной последовательности может также означать сегмент нуклеотидной последовательности, который модифицирует функциональность всей нуклеотидной последовательности, например, в ходе посттранскрипционного или транскрипционного сайленсинга гена. Как таковой, функциональный фрагмент нуклеотидной последовательности 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 всей нуклеотидной последовательности. Он также явно охватывает 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 сравнимую 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 имеет аминокислотную последовательность, которая идентична или, с учетом консервативных и полуконсервативных аминокислотных обменов, подобна белку, из которого происходит функциональная часть.

Термин "гетерологичный" означает, что введенный полинуклеотид происходит из клетки или организма с другим генетическим фоном, 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 в природе. Гетерологичный полинуклеотид может присутствовать в дополнение к соответствующему эндогенному гену.

По смыслу настоящего изобретения под термином "гомолог" понимается белок того же филогенетического происхождения; под термином "аналог" понимается белок, который выполняет ту же функцию, но имеет другое филогенетическое происхождение; под термином "ортолог" понимается белок из другого вида, который выполняет ту же функцию; и под термином "паралог" понимается белок, который появился внутри вида из-за дублирования, при этом, эта копия либо сохраняет ту же функцию белка, изменяет свою матрицу экспрессии, но не функцию, изменяет свою функцию белка или разделяет функцию исходного гена между обеими копиями.

Под терминами "гибридизация" или "гибридизирование" следует понимать процесс, при котором одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты связывается с цепью нуклеиновой кислоты, которая комплементарна в максимально возможной степени, то есть, образует с ней пары оснований. Стандартные методы гибридизации описаны, например, в работе Сэмбруки *соавт.*, Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001. Предпочтительно следует понимать, 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 спаривание оснований с цепью нуклеиновой кислоты, которая комплементарна в максимально возможной степени. Возможность такого отжига зависит от жесткости условий гибридизации. Термин "жесткость" относится к условиям гибридизации. Высокая жесткость присутствует, когда спаривание оснований усложняется; низкая жесткость присутствует, если спаривание оснований упрощается. Например, жесткость условий

гибридизации зависит от концентрации соли или ионной силы и температуры. В целом, жесткость может быть увеличена путем повышения температуры и/или уменьшения содержания соли. Под термином "жесткие условия гибридизации" следует понимать такие условия, при которых гибридизация преимущественно происходит только между гомологичными молекулами нуклеиновых кислот. Термин "условия гибридизации", таким образом, относится не только к условиям, преобладающим при фактическом добавлении нуклеиновых кислот, но также и к условиям, преобладающим на следующих этапах промывки. Например, жесткие условия гибридизации представляют собой условия, при которых, преимущественно, гибридизируются только те молекулы нуклеиновой кислоты, которые имеют, по меньшей мере, 70% - предпочтительно, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% идентичность последовательностей. Жесткими условиями гибридизации являются, например: гибридизация в 4 x SSC при температуре 65 °C и последующая повторная промывка в 0,1 x SSC при температуре 65 °C в общей сложности в течение приблизительно 1 часа. Гибридизация предпочтительно происходит в жестких условиях.

Последовательности, показывающие определенный уровень идентичности с исходной последовательностью, могут показывать данный уровень идентичности по всей длине исходной последовательности. Это применимо как к нуклеотидным последовательностям, так и к аминокислотным последовательностям.

По отношению к нуклеиновой кислоте в форме двухцепочечной ДНК, "комплементарная" нуклеотидная последовательность означает, что вторая цепь ДНК, комплементарная первой цепи ДНК, имеет нуклеотиды, которые соответствуют основаниям первой цепи, в соответствии с правилами спаривания оснований. Комплементарная последовательность предпочтительно полностью комплементарна контр-последовательности и, таким образом, предпочтительно имеет ту же длину.

Следует понимать, что термин "выделенная молекула нуклеиновой кислоты" означает молекулу нуклеиновой кислоты, извлеченную из ее естественной или исходной среды. Этот термин также охватывает синтетически полученную молекулу нуклеиновой кислоты. Следует понимать, что термин "выделенный полипептид" означает полипептид, извлеченный из его естественной или исходной среды. Этот термин также охватывает синтетически полученный полипептид.

"Молекулярный маркер" или "маркер" представляет собой нуклеиновую кислоту, которая является полиморфной в популяции растений и используется в качестве эталона или ориентирующей точки. В зависимости от технического контекста, термин "маркер" может относиться к конкретному положению генома, которое можно обнаружить с помощью соответствующего "молекулярного маркера", при этом, "молекулярный маркер" в большинстве случаев последовательно совместим с положением генома. Маркер для обнаружения события рекомбинации должен быть пригодным для мониторинга различий или полиморфизмов в популяции растений. Таким образом, такой маркер способен обнаруживать и дифференцировать различные состояния аллелей (аллели). Термин "молекулярный маркер" также относится к нуклеотидным последовательностям, которые комплементарны или, по меньшей мере, в значительной степени комплементарны, или гомологичны геномным последовательностям - например, нуклеиновым кислотам, которые используются 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 длины фрагментов*) или SNP (*однонуклеотидные полиморфизмы*). Маркеры могут быть получены из геномных или экспрессируемых нуклеиновых кислот, например, сплайсированных РНК, кДНК или EST, и могут также относиться к нуклеиновым кислотам, которые используются в качестве зондов или пар праймеров, и как таковые подходят для амплификации фрагмента последовательности с использованием методов, основанных на ПЦР. Маркеры, которые описывают генетические полиморфизмы (между частями популяции), могут быть обнаружены с использованием хорошо зарекомендовавших себя методов из предшествующего уровня техники (Введение в генетический анализ, 7-е издание, Гриффитс, Миллер, Судзуки и *соавт.*, 2000). Например, среди них - секвенирование ДНК, основанная на ПЦР сиквенс-специфичная амплификация, верификация RFLP, верификация полинуклеотидных полиморфизмов посредством аллель-специфичной гибридизации (ASH), обнаружение амплифицированных переменных последовательностей генома растения, обнаружение 3SR (*самоподдерживающаяся репликация последовательностей*), обнаружение SSR, SNP, RFLP или AFLP (*полиморфизмы длин амплифицированных фрагментов*). Кроме того, также известны способы обнаружения EST (*маркерные экспрессируемые последовательности*) и SSR-маркеров, полученных из последовательностей EST и RAPD (*случайно амплифицированная полиморфная ДНК*). В зависимости от контекста, термин "маркер" в описании может также

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

Маркеры также включают синтетические олигонуклеотиды, которые могут быть связаны, по меньшей мере, с одной молекулой обнаружения, при этом, молекулы обнаружения могут быть использованы для реакции обнаружения или генерации сигнала в рамках способа верификации. Синтетические олигонуклеотиды также включают меченые праймеры. Синтетические олигонуклеотиды и меченые праймеры являются искусственными соединениями, не встречаются в природе и не могут быть выделены из природы. Получение таких соединений более подробно объясняется ниже.

"Однонуклеотидный полиморфизм" или SNP представляет собой генетическую вариацию между двумя образцами ДНК, при этом, по меньшей мере, один нуклеотид между двумя образцами отличается. В большинстве случаев образцы относятся к двум одним и тем же видам, и сравнение или выравнивание двух образцов выполняется на основе гомологичных областей генома. SNP могут вызывать аллельные вариации, но не все SNP обязательно должны встречаться в функциональном элементе генома, таком как ген. SNP могут использоваться для дифференциации, например, различных генотипов/гаплотипов или могут использоваться для скрининга и отбора на предмет присутствия или отсутствия функционального элемента генома, такого как, например, конкретный ген или его аллельный вариант. Из-за генетической связи SNP не обязательно должны находиться в пределах функционального элемента генома, который должен быть выбран. Примеры SNP по смыслу настоящего изобретения приведены в Таблице 1b, в частности, они включены в общие последовательности праймеров. Обнаружение или идентификация SNP может происходить посредством ПЦР, включающей два разных прямых праймера и один общий обратный праймер. Технические детали для такого обнаружения или идентификации могут быть получены из отрывков пунктов [67] - [70] выше.

"Промотор" представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность ДНК, обычно расположенную выше кодирующей области, которая содержит точку связывания для РНК-полимеразы и инициирует транскрипцию ДНК. Промотор дополнительно содержит другие элементы, которые действуют как ген-регулятор экспрессии генов (например, цис-регуляторные элементы). "Основной или минимальный промотор" представляет собой промотор, который содержит базовые элементы, необходимые для инициации транскрипции (например, ТАТА-бокс и/или инициатор).

"Патоген" означает организм, который, при взаимодействии с растением, приводит к появлению симптомов заболевания, по меньшей мере, в одном органе растения. Например, к числу этих патогенов относятся животные, грибковые, бактериальные или вирусные организмы или оомицеты.

Под термином "патогенная инфекция" следует понимать самый ранний момент времени, в который патоген взаимодействует с тканью растения-хозяина. В этом смысле, термин "заражение" означает возникновение контакта между патогеном и хозяином. При закреплении патогена на хозяине, например, грибковой споры на поверхности листа растения, механизмы обнаружения патогена и передачи сигнала начинаются в клетке растения-хозяина. В случае *Cercospora beticola*, конидии образуются в период влажной, теплой погоды и переносятся на соседние растения дождем и ветром. При новых случаях заражения, чаще всего сначала появляются отдельные пятна на физиологически более старых наружных листьях. Чаще всего они довольно четко отграничены от здоровой ткани листа бурым кольцом. Бурые конидии-носители гриба в средней части пятен можно наблюдать с помощью увеличительного стекла (рейтинговый балл 3). Количество этих бурых пятен быстро увеличивается, при этом, спорокарпии первоначально перекрывают еще меньшие мертвые участки (рейтинговый балл 5). При дальнейшем течении болезни, которая теперь распространяется и на внутренние листья, в конце концов впервые происходит отмирание наружных листьев (рейтинговый балл 7), а затем практически всех листьев (рейтинговый балл 9). Течение заболевания и тяжесть симптомов сильно зависят от местности и от ежегодно меняющихся погодных условий.

Термин "органы" растения означает, например, листья, побег, стебель, корни, гипокотиль, вегетативные почки, меристемы, зародыши, пыльники, оплодотворенные яйцеклетки, семена или плоды. "Части растения" включают, но не ограничиваются ими, побег или черешок, листья, цветки, соцветия, корни, плоды и семена, а также пыльцу. Термин "части растения" также означает объединение нескольких органов, например, цветка или семени, или части органа, например, поперечное сечение побега растения. "Ткани" растения представляют собой, например, каллусную ткань, запасную ткань, меристематическую ткань, ткань листа, ткань побега, корневую ткань, опухолевую ткань растения или репродуктивную ткань, а также камбий, паренхиму, сосудистую ткань, склеренхиму и эпидермис. Однако этим списком тканей не ограничивается. Например, под растительными "клетками" следует понимать, например, выделенные клетки, имеющие клеточную стенку или ее агрегаты, или протопласты.

"Частота рекомбинации" означает, что между некоторыми элементами генома, такими как однонуклеотидные полиморфизмы, гены, локусы, QTL или генетические области, во время мейоза происходит кроссинговер. Частота рекомбинации 1% равна 1 сМ. Частоту рекомбинации можно определить по генерации карт мейоза.

"Ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением" представляет собой молекулу нуклеотида или последовательность нуклеиновой кислоты, как описано в отрывке пункта [1] выше. Ген может быть генетически сцеплен с косегрегирующими областями.

"Сорт" означает группировку растений в пределах одного ботанического таксона самого низкого известного ранга, группировка которого, независимо от того, полностью ли соблюдены условия для предоставления права селекционеру, может быть - определена выражением характеристик, вытекающих из данного генотипа или комбинации генотипов,

- отличаться от любой другой группы растений выражением, по меньшей мере, одной из указанных характеристик и

- рассмотрена как единое целое с точки зрения ее пригодности для размножения в неизменном виде.

В сочетании с настоящим изобретением 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 располагаться выше точки инициации транскрипции минимального промотора, но также и ниже нее, например, в транскрибируемой, но не транслируемой лидерной последовательности или внутри интрона.

Термин "устойчивость" следует понимать в широком смысле, и он охватывает диапазон защиты от ретардации до полного блокирования развития заболевания. Одним примером важного патогена является *Cercospora beticola*. Устойчивая растительная клетка по настоящему изобретению или устойчивое растение по настоящему изобретению предпочтительно достигает устойчивости к *Cercospora beticola*. Устойчивость к патогену следует приравнивать к устойчивости к заболеванию, которое вызывает этот патоген;

например, устойчивость к *Cercospora beticola*, а также она является устойчивостью к пятнистости листьев. Например, увеличение устойчивости может быть измерено по уменьшению биомассы грибов на растении-хозяине; для этого ДНК гриба может быть определена с помощью количественной ПЦР в сравнении с ДНК растения в зараженной растительной ткани. Дополнительным подходом к измерению устойчивости является оптический рейтинг, при этом, присваиваются баллы от 1 (не чувствителен) до 9 (очень чувствителен).

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

"Сырье для промышленного производства сахара" означает растительный материал, который может подаваться на установку по производству сахара, специализирующуюся на извлечении сахара из сахарной свеклы. Таким сырьем обычно является свекольное тело (стержневой корень) собранной сахарной свеклы. Для обеспечения соответствия процессу извлечения свекольное тело должно иметь достаточную массу, объем и коническую форму, чтобы сырье можно было механически нарезать на кусочки (свекольные полоски). Эти свекольные полоски максимально увеличивают площадь поверхности для извлечения сахара и должны иметь низкое содержание натрия, калия и азота, чтобы обеспечить эффективное извлечение. После извлечения оставшийся свекольный жом прессуют, сушат и используют в качестве корма для животных.

"Концентрация сахарозы" выражается в процентах от массы свежего корня.

"Однозародышевый" означает, что из семени вырастает ровно одно растение, тогда как их полизародышевого или мультитародышевого семени (также называемом "семенной клубочек") вырастает несколько растений.

"Стрелкование" означает образование цветущего стебля (или стеблей) на сахарной свекле в естественной попытке произвести семена и размножиться. Стрелкование происходит у сахарной свеклы из-за яровизации, то есть, в результате стресса от охлаждения, который может возникнуть, например, во время зимней спячки. Однако выращиваемую в промышленных масштабах сахарную свеклу собирают перед стрелкованием, поскольку процесс стрелкования и последующее заложение семян снижает содержание сахарозы в свекольном теле.

"Интрогрессия" означает, что нуклеотидная последовательность была перенесена в геном растения, при этом, эта нуклеотидная последовательность происходит от растения, которое не принадлежит к тому же виду или подвиду. Это может, например, означать, что нуклеотидная последовательность, происходящая от растения подвиды *Beta vulgaris maritima*, была перенесена в растение подвиды *Beta vulgaris vulgaris*.

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

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

Фигура 2: Генетическая (левая часть) физическая (правая часть) карта геномной области, включая ген устойчивости, с указанием положения некоторых наиболее важных маркеров.

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

Фигура 4: Статистическая блок-схема оценки данных, сгенерированных через восемь дней после заражения во время трансгенной верификации гена устойчивости.

- Фигура 5:** Статистическая блок-схема оценки данных, сгенерированных через одиннадцать дней после заражения во время трансгенной верификации гена устойчивости.
- Фигура 6:** Статистическая блок-схема оценки данных, сгенерированных через восемь дней после заражения во время трансгенной верификации гена устойчивости.
- Фигура 7:** Статистическая блок-схема оценки данных, сгенерированных через пятнадцать дней после заражения во время трансгенной верификации гена устойчивости.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной придавать устойчивость к Церкоспоре, присутствующей в растении - в частности, в *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* - в котором экспрессируется полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, патогеном является грибок *Cercospora beticola*, который является одним из наиболее важных и разрушительных патогенов листьев сахарной свеклы, свеклы обыкновенной и мангольда, среди прочих, и может приводить к потере урожая более чем на 40%. Грибок продуцирует вторичный метаболит церкоспорин, который вступает в реакцию с кислородом в присутствии света и приводит к образованию активных форм кислорода (ROS). ROS вызывают массивное повреждение клеток в листовой ткани зараженного растения, которое проявляется в виде некрозов.

Настоящее изобретение основано на генетическом тонком картировании, идентификации, выделении и характеристике гена или локуса гена, 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 заболеванию пятнистостью листьев, вызываемому Церкоспорой, или является ее причиной. Исходным материалом была популяция *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, которая была получена от 37 образцов *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, взятых из разных источников. Семена растения *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* (сорт сахарной свеклы 6626), обладающее устойчивостью в соответствии с настоящим изобретением, перед подачей заявки хранились в Национальной коллекции промышленных, пищевых и морских бактерий (NCIMB), Абердин, Великобритания, под номером доступа NCIMB 43646. В частности, растение рода *Beta*, растение вида *Beta vulgaris* или растение подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, или растение

сахарной свеклы, содержащее ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением, может быть получено из хранящихся семян.

Нуклеотид и аминокислота, кодирующие последовательность молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, характеризуются многочисленными полиморфизмами, которые отличают ген NPS-LRR, идентифицированный в соответствии с настоящим изобретением, от "чувствительного" варианта гена, то есть, варианта гена, который не придает устойчивости к Церкоспоре. Примеры полиморфизмов представлены на Фигуре 1.

Молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением может быть выделенной молекулой нуклеиновой кислоты. Предпочтительно это ДНК и, особенно предпочтительно, кДНК (кодирующая ДНК). Полипептид, который кодируется молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно придает устойчивость к патогену *Cercospora beticola*, который вызывает заболевание пятнистость листьев растений, вызываемому Церкоспорой. Кроме того, полипептид, который кодируется молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, придает - в частности, растению рода Beta - устойчивость к этому патогену. Растение предпочтительно является растением вида *Beta vulgaris* - особенно предпочтительно, растением подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*; среди них, например, сорта сахарной свеклы, свеклы обыкновенной, кормовой свеклы, мангольда и швейцарского мангольда.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID No. 3 и/или с последовательностью, кодирующей ДНК в соответствии с SEQ ID No. 2. Кроме того, настоящее изобретение предлагает нуклеотидную последовательность, которая содержит последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID No. 1 и SEQ ID No. 53.

Ген, идентифицированный в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой ген/белок устойчивости типа NBS-LRR, который характеризуется специфическими структурными мотивами. Общая структура таких белков устойчивости в растениях уже хорошо изучена (Мартин *и соавт.*, Annual Review Plant Biology 54 (2003), 23-61). Однако принцип структурного 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, то есть, генетическая структура, как правило, в значительной степени неизвестен. Следовательно, идентификация гена или белка, придающего устойчивость Церкоспоре, исключительно на основе известного структурного мотива невозможна. Кроме того, область последовательности оказалась областью с очень высокими повторами, которая содержит, среди прочего, *тандемные повторы* с очень высокой гомологией последовательностей, что делает разработку диагностических маркеров, а также сбор данных о последовательностях особенно трудными.

С помощью создания популяции из более чем 4000 делящихся потомков и разработки специальных рекомбинантных экранов целевая область была уменьшена и, таким образом, еще более выделена посредством анализа информативных рекомбинантов (генотипических и фенотипических) в серии испытаний на устойчивость. Это генетическое картирование, а также создание физических карт, сопровождаемых секвенированием WHG ("секвенирование всего генома"), сравнительным секвенированием ВАС (Vas-by-Vas) и биоинформационными анализами, привело к идентификации трех рекомбинантных генотипов, которые подтвердили наличие гена устойчивости (1 рекомбинант в соседнем гене, с одной стороны, и 2 рекомбинанты в соседнем гене, с другой стороны). В свете особых требований, авторы изобретения поместили структуру с очень высокими повторами в целевую область, которая, среди прочего, содержит *тандемные повторы* с очень высокой гомологией последовательностей, что значительно затруднило разработку маркера и, следовательно, идентификацию информативных рекомбинантов. Следующие этапы были особенно решающими для локации генетической структуры гена устойчивости:

- разработка маркеров s4p0264s01, s4p2271s01, sxh0678s01, s4p4293s01, s4p4295s01, s4p4301s01 (см. Таблицу 1В).
- Тонкое картирование в сочетании с интенсивным фенотипированием. Фенотипы были верифицированы с расчетом 90-180 потомков на растение в испытании в теплице и с использованием интенсивных статистических методов (например, t-критерий, анализ мощности и так далее).
- Идентификация и секвенирование клонов ВАС из пулов ВАС устойчивого генотипа.
- Оценка последовательности, а также сравнение последовательности и белка между RR (то есть, устойчивым) и ss (то есть, чувствительным) генотипами; таким образом, недвусмысленная сборка данных о последовательностях RR и ss не всегда была возможна из-за сложности последовательностей.

Таблица 1В: Маркер в целевой области, относящийся к чувствительному генотипу, устойчивому генотипу и консенсусной последовательности.

Маркер	Последовательности: чувствительные / устойчивые/ консенсусные	Положение на генетической карте [сМ]	Положение на физической карте [п.о.]
s4p1395s01	SEQ ID No. 100 / SEQ ID No. 101 / SEQ ID No. 102	56,35582927	55312395
sxi0123s02	SEQ ID No. 103 / SEQ ID No. 104 / SEQ ID No. 105	56,47317509	55357303
s4p1396s01	SEQ ID No. 106 / SEQ ID No. 107 / SEQ ID No. 108	56,61163027	55409550
s4p1398s01	SEQ ID No. 109 / SEQ ID No. 110 / SEQ ID No. 111	56,78339709	55473271
s4p1462s01	SEQ ID No. 112 / SEQ ID No. 113 / SEQ ID No. 114	56,84738427	55496705
s4p1464s01	SEQ ID No. 115 / SEQ ID No. 116 / SEQ ID No. 117	56,87553455	55506972
s4p0044s01	SEQ ID No. 118 / SEQ ID No. 119 / SEQ ID No. 120	58,84432555	56160463
s4p0056s01	SEQ ID No. 121 / SEQ ID No. 122 / SEQ ID No. 123	59,85754673	56456734
s4p0058s01	SEQ ID No. 124 / SEQ ID No. 125 / SEQ ID No. 126	60,00588436	56498250
s4p0059s01	SEQ ID No. 127 / SEQ ID No. 128/ SEQ ID No. 129	60,00633209	56498372
s4p1564s01	SEQ ID No. 130 / SEQ ID No. 131/ SEQ ID No. 132	60,00815936	56498883
s4p1998s01	SEQ ID No. 133 / SEQ ID No. 134/ SEQ ID No. 135	60,02385255	56503259
s4p1343s01	SEQ ID No. 136 / SEQ ID No. 137 / SEQ ID No. 138	60,42647909	56613667

s4p1408s01	SEQ ID No. 139 / SEQ ID No. 140 / SEQ ID No. 141	60,42651091	56613673
s4p1565s01	SEQ ID No. 142 / SEQ ID No. 143 / SEQ ID No. 144	60,54596773	56645847
s4p1409s01	SEQ ID No. 145 / SEQ ID No. 146 / SEQ ID No. 147	60,547695	56646306
s4p1411s01	SEQ ID No. 148 / SEQ ID No. 149 / SEQ ID No. 150	60,86562555	56730683
s4p1414s01	SEQ ID No. 151 / SEQ ID No. 152 / SEQ ID No. 153	60,99547782	56764641
s4p1485s01	SEQ ID No. 154 / SEQ ID No. 155 / SEQ ID No. 156	61,54654291	56905647
s4p0257s01	SEQ ID No. 157 / SEQ ID No. 158 / SEQ ID No. 159	62,42235182	57120242
s4p0258s01	SEQ ID No. 160 / SEQ ID No. 161 / SEQ ID No. 162	62,42346318	57120506
s4p0260s01	SEQ ID No. 163 / SEQ ID No. 164 / SEQ ID No. 165	62,59136591	57160401
sxh0876s05	SEQ ID No. 166 / SEQ ID No. 167 / SEQ ID No. 168	62,730303	57193142
s4p0262s01	SEQ ID No. 169 / SEQ ID No. 170 / SEQ ID No. 171	62,79537191	57208387
s4p0263s01	SEQ ID No. 172 / SEQ ID No. 173 / SEQ ID No. 174	62,79557191	57208429
s4p0264s01	SEQ ID No. 54 / SEQ ID No. 55 / SEQ ID No. 10	62,79590373	57208510
s4p2271s01	SEQ ID No. 56 / SEQ ID No. 57 / SEQ ID No. 11	62,81185523	57212240
s4p4288s01	SEQ ID No. 175 / SEQ ID No. 176 / SEQ ID No. 177	62,81950148	57214020
s4p4290d01	SEQ ID No. 178 / SEQ ID No. 179 / SEQ ID No. 180	62,83393842	57217392
s4p4293s01	SEQ ID No. 58 / SEQ ID No. 59 / SEQ ID No. 12	62,84491806	57219956
s4p4295s01	SEQ ID No. 60 / SEQ ID No. 61 / SEQ ID No. 13	62,85399055	57222060
s4p8772s01	SEQ ID No. 181 / SEQ ID No. 182 / SEQ ID No. 183		

s4p4301s01	SEQ ID No. 62 / SEQ ID No. 63 / SEQ ID No. 14	62,94635089	57243521
sxh0678s01	SEQ ID No. 64 / SEQ ID No. 65 / SEQ ID No. 15	62,97474964	57250119
s4p4305d01	SEQ ID No. 184 / SEQ ID No. 185 / SEQ ID No. 186	62,98035341	57251418
s4p4308s01	SEQ ID No. 187 / SEQ ID No. 188 / SEQ ID No. 189	63,00151327	57256313
s4p0317s01	SEQ ID No. 190 / SEQ ID No. 191 / SEQ ID No. 192	63,16585209	57294143
sxh1834s05	SEQ ID No. 193 / SEQ ID No. 194 / SEQ ID No. 195	63,26778918	57317441
sxh0942s04	SEQ ID No. 196 / SEQ ID No. 197 / SEQ ID No. 198	63,31312755	57327765
s4p0320s01	SEQ ID No. 199 / SEQ ID No. 200 / SEQ ID No. 201	63,49891636	57369798
s4p0322s01	SEQ ID No. 202 / SEQ ID No. 203 / SEQ ID No. 204	63,52934236	57376639
s4p0323s01	SEQ ID No. 205 / SEQ ID No. 206 / SEQ ID No. 207	63,79248973	57435390
s4p0232s01	SEQ ID No. 208 / SEQ ID No. 209 / SEQ ID No. 210	64,19409409	57523548
s4p0234s01	SEQ ID No. 211 / SEQ ID No. 212 / SEQ ID No. 213	64,32903091	57552769
sxh1195s02	SEQ ID No. 214 / SEQ ID No. 215 / SEQ ID No. 216	64,32903091	57552771
s4p0238s01	SEQ ID No. 217 / SEQ ID No. 218 / SEQ ID No. 219	64,36171473	57559821
s4p0421s01	SEQ ID No. 220 / SEQ ID No. 221 / SEQ ID No. 222	65,86730118	57873806

Соединения, предложенные в Таблице 1B, могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров в соответствии с настоящим изобретением. Все маркеры подходят для обнаружения генетического материала, содержащего ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением (особенно путем идентификации генетически сцепленных полиморфизмов, таких как однонуклеотидные полиморфизмы), и для отслеживания

наследования генетического материала от исходного растения к потомству исходного растения посредством селекции с помощью маркеров (MAS). В этом отношении маркеры, раскрытые в настоящем документе, могут быть весьма полезными при передаче гена устойчивости в соответствии с настоящим изобретением от одного подвида к другому подвиду. Раскрытые в настоящем документе маркеры, кроме того, могут быть использованы для генетического картирования и отслеживания рекомбинации в результате мейоза. Представляется, что ген устойчивости расположен близко к физическим положениям 57219956 п.о. и 57243521 п.о. или находится между ними. Раскрытые в настоящем документе маркеры, которые расположены очень близко к этой области, в высшей степени подходят для обнаружения гена устойчивости. Раскрытые в настоящем документе маркеры, которые находятся на большем расстоянии от гена устойчивости, по-прежнему демонстрируют сильное генетическое сцепление с геном устойчивости, но, кроме того, могут быть использованы для обнаружения редких событий рекомбинации и генетического обмена во фланкирующих участках гена устойчивости. Это может быть полезно, например, в подходах обратного скрещивания и передачи гена устойчивости в другой генетический фон. Маркеры, раскрытые в настоящем документе, и особенно те, которые находятся на большем расстоянии от гена устойчивости, особенно полезны, когда ген устойчивости передается потомству как часть косегрегирующей области. Ген устойчивости, включающий косегрегирующие области, также может передаваться от одного подвида к другому подвиду. Успешная передача может быть подтверждена маркерами, раскрытыми в настоящем документе, например, путем обнаружения гена устойчивости или косегрегирующей области. Маркеры, раскрытые в настоящем документе, также могут быть использованы для уменьшения косегрегирующих областей в программе обратного скрещивания, включающей несколько поколений, при сохранении гена устойчивости в соответствии с настоящим изобретением в потомстве. Дополнительные маркеры для обнаружения гена устойчивости в соответствии с настоящим изобретением могут быть установлены из данных, раскрытых в настоящем документе. В частности, могут быть установлены те маркеры, которые расположены в геномном интервале, который фланкирован маркерами s4p0421s01 и s4p1395s01, или которые фланкированы теми парами маркеров, которые приведены в отрывке пункта [48] выше. Установлению дополнительных маркеров способствует геномный материал, состоящий из семян, которые хранились в NCIMB, Абердин, Великобритания, под номером доступа NCIMB 43646. Этот геномный материал позволяет, например, выравнивать генетический материал, кодирующий устойчивость в соответствии с настоящим изобретением, с генетическим материалом, в котором отсутствует ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением.

Генетический материал, лишенный устойчивости, может быть гомологом или иметь то же физическое положение (сравните по Таблице 1b), что и генетический материал, кодирующий устойчивость в соответствии с настоящим изобретением. Эти выравнивания могут быть использованы для идентификации полиморфизмов, таких как однонуклеотидные полиморфизмы. На основе полиморфизмов могут быть созданы дополнительные маркеры для обнаружения идентифицированных полиморфизмов, в частности, тех полиморфизмов, которые генетически сцеплены с геном устойчивости в соответствии с настоящим изобретением. Выравнивания и обнаружение полиморфизмов на основе выравнивания обычно включают использование компьютеров и хранение данных на машиночитаемых носителях. Также предлагается преобразовать сигнал, генерируемый молекулярными маркерами во время анализа генетического материала, в данные, передаваемые электронным способом и/или хранящиеся в электронном виде, которые могут быть обработаны с помощью компьютера. Такой процесс с использованием компьютера может включать определение или расчет прогнозируемой селекционной ценности растения. Прогнозируемая селекционная ценность может включать уровень устойчивости или толерантности к Церкоспоре. Более подробную информацию о прогнозируемой селекционной ценности можно получить из документа US8321147B2.

Анализы показали, что ген LRR имеет умеренную белковую гомологию с белком устойчивости Cf-2 из томатов (UNIPROT|Q41397_SOLPI P. Cf-2.1) (идентичность последовательности $322/830=38\%$). Фактически, идентифицированный белок, придающий устойчивость к Церкоспоре, является лучшим белком сахарной свеклы, имеющим гомологию с белком устойчивости томатов Cf-2. Белок устойчивости Cf-2 из томатов придает устойчивость к *Cladosporium fulvum* - разновидности гриба черной плесени (US 6,287,865 B1) - посредством взаимодействия с белком авирулентности Avr2 от *C. fulvum*. Это приводит к активации иммунной защиты растений от патогена; см. Диксон и соавт., 1996 (Диксон, Марк С., и соавт., "Локус устойчивости к заболеванию томатов Cf-2 содержит два функциональных гена, кодирующих лейцин-богатые повторы белка". *Cell* 84.3 (1996): 451-459). Из-за гомологии последовательностей между геном Cf-2 и идентифицированным геном LRR следует предположить, но при этом не привязываясь к какой-либо одной теории, что аналогичный защитный механизм, формирующий основу устойчивости к Церкоспоре, также имеет место в случае сахарной свеклы. Однако не следует исключать другой механизм из-за умеренной гомологии последовательностей.

Кроме того, в нуклеотидную последовательность в соответствии с настоящим изобретением могут быть введены замещения, делеции, вставки, добавления и/или проведены любые другие изменения, которые по отдельности или в комбинациях фактически изменяют нуклеотидную последовательность, при этом, модифицированная нуклеотидная последовательность может, однако, выполнять ту же функцию, что и исходная последовательность. В настоящем случае речь идет о кодировании аминокислотной последовательности, которая придает устойчивость к заболеванию пятнистостью листьев, вызываемому Церкоспорой. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения, изобретение, следовательно, включает нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, который представляет собой производное полипептида, который кодируется нуклеотидной последовательностью в соответствии с настоящим изобретением, или который включает аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим изобретением. Производная аминокислотная последовательность, которая имеет, по меньшей мере, одно замещение, делецию, вставку или добавление, по меньшей мере, одной аминокислоты, при этом, функциональность кодируемого полипептида/белка сохраняется, представляет собой производное полипептида. Замещения, делеции, вставки, добавления и/или любые другие изменения, либо по отдельности, либо в комбинациях, которые фактически изменяют нуклеотидную последовательность, но выполняют ту же функцию, что и исходная последовательность, могут, таким образом, быть введены в нуклеотидную последовательность с использованием обычных способов, которые известны из предшествующего уровня техники, например, посредством сайт-направленного мутагенеза, ПЦР-опосредованного мутагенеза, транспозонного мутагенеза, редактирования генома и так далее.

Замещение одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей те же или эквивалентные, или сходные химические/физические свойства, называется "консервативным замещением" или "полуконсервативным замещением". Примерами физических/химических свойств аминокислоты являются, например, гидрофобия или заряд. Специалисту в данной области техники известно, какое аминокислотное замещение представляет собой консервативное или полуконсервативное замещение. Более того, общие знания позволяют специалисту в данной области техники распознавать, идентифицировать и обнаруживать, какие аминокислотные делеции и добавления безвредны для функциональности белка устойчивости, и в каких положениях они возможны. Специалисту в данной области техники известно, что в случае присутствия белка NBS-LRR для

модификации аминокислотной последовательности (замещений, делеций, вставок или добавлений, по меньшей мере, одной аминокислоты) функциональность, в частности, консервативных доменов, должна быть сохранена, и что поэтому в этих доменах возможны только ограниченные предшествующие модификации.

Настоящее изобретение, таким образом, включает функциональный фрагмент нуклеотидной последовательности в соответствии с настоящим изобретением. Термин "фрагмент", таким образом, включает 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 вышеупомянутым способом, она также имеет общий структурный домен и/или обладает общей функциональной активностью. Нуклеотидные последовательности или аминокислотные последовательности, которые имеют идентичность, по меньшей мере, приблизительно 70%, по меньшей мере, приблизительно 75%, по меньшей мере, приблизительно 80%, по меньшей мере, приблизительно 85%, по меньшей мере, приблизительно 90%, по меньшей мере, приблизительно 91%, по меньшей мере, приблизительно 92%, по меньшей мере, приблизительно 93%, по меньшей мере, приблизительно 94%, по меньшей мере, приблизительно 95%, по меньшей мере, приблизительно 96%, по меньшей мере, приблизительно 97%, по меньшей мере, приблизительно 98%, по меньшей мере, приблизительно 99% или, по меньшей мере, приблизительно 100% с нуклеотидной последовательностью или аминокислотной последовательностью в соответствии с настоящим изобретением определены в данном документе как достаточно сходные. Они также явно охватывает диапазон от 90 до 100%. Для функциональных фрагментов устанавливается достаточное сходство, если нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность в целом обладает тем же свойством, что и ранее названная нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность настоящего изобретения. Те нуклеотидные последовательности, которые кодируют производную или полученную аминокислотную последовательность, генерируются либо прямо, либо косвенно (например, посредством

этапов амплификации или репликации) из исходной нуклеотидной последовательности, которая соответствует нуклеотидной последовательности в соответствии с настоящим изобретением по всей длине или, по меньшей мере, частично.

Соответственно, настоящее изобретение включает нуклеотидную последовательность, которая способна гибридизироваться при жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности в соответствии с настоящим изобретением или с нуклеотидной последовательностью, которая кодирует аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим изобретением.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением характеризуется тем, что после экспрессии в растении она уже сама по себе придает эффект доминантной устойчивости к патогену - предпочтительно, к *Cercosporabeticola* - или что она кодирует полипептид, который способен придавать эффект доминантной устойчивости к патогену к Церкоспоре. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты или полипептид придает эффект устойчивости на уровне, по меньшей мере, одного рейтингового балла - предпочтительно, по меньшей мере, двух рейтинговых баллов и, особенно предпочтительно, от трех до четырех рейтинговых баллов. Такой ген, который уже сам по себе придает растению такую сильно выраженную устойчивость к Церкоспоре, или который кодирует полипептид, способный придавать такую выраженную устойчивость, не известен из предшествующего уровня техники. Как уже было описано выше, в ранее доступных на рынке сортах устойчивость к Церкоспоре передается через множество генов устойчивости, оказывающих незначительный эффект, и недостатком таких сортов является то, что их разработка происходит очень медленно и является дорогостоящей из-за сложной передачи, и что такие сорта имеют заметно более низкую урожайность по сравнению с нормальными сортами при отсутствии заражения. Среди прочего, это может быть связано с эпигенетическим взаимодействием некоторых генов устойчивости с генами, отвечающими за производство сахара, что приводит к снижению приспособленности растений в отсутствие патогена.

Таким образом, авторы изобретения смогли впервые предложить ген устойчивости к Церкоспоре, который может быть использован для заметно упрощенной селекции. Благодаря включению этого гена в элитные линии, теперь возможно очень быстро разработать очень высокоурожайные сорта с высокой устойчивостью к Церкоспоре.

Соответственно, в рамках настоящего изобретения впервые предложены растения сахарной свеклы, мангольда, свеклы столовой красной или свеклы обыкновенной, кормовой свеклы, обладающие устойчивостью в соответствии с настоящим изобретением к *Cercospora beticola* и, таким образом, они охвачены настоящим изобретением. Поскольку перечисленные растения все являются культурными растениями, культуры или растения, которые подходят для сельскохозяйственной культивации, и которые обладают устойчивостью в соответствии с настоящим изобретением, являются частью настоящего изобретения. В частности, такие культуры являются частью настоящего изобретения, которые содержат подземный орган хранения, подходящий для использования в качестве пищи, сырья или промышленного источника сахара, и которые содержат устойчивость в соответствии с настоящим изобретением, являются дополнительным аспектом настоящего изобретения. Органом хранения может быть, например, сахаросодержащее свекольное тело сахарной свеклы, потребляемое свекольное тело свеклы столовой красной или питательное свекольное тело кормовой свеклы. Подземный орган хранения может составлять более 50%, а для сахарной свеклы даже более 70% от общей массы взрослого растения. Кроме того, также семена или посевной материал этих растений являются частью настоящего изобретения. Семена или посевной материал могут быть технически обработаны, как описано далее ниже. Частью настоящего изобретения являются также растения рода *Spinacia*, *Glycine*, *Daucus* и *Pastinaca*, содержащие ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением. В частности, включены растения вида *Spinacia oleracea* и их разновидности, содержащие ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением. Органом хранения может быть стержневой корень, в частности, свекольное тело.

Ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением может находиться под контролем или может быть функционально сцеплен с промотором в соответствии с SEQ ID No. 7. Ген устойчивости может также находиться под контролем или может быть функционально сцеплен с молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей промотор в соответствии с SEQ ID No. 7. Последовательности, имеющие 90%, 95% или 99% идентичности последовательности по всей длине последовательности в соответствии с SEQ ID No. 7, охвачены в этом отношении.

В этом контексте, настоящее изобретение также включает нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок в соответствии с SEQ ID No. 3, при этом, в конкретном варианте осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота в соответствии с SEQ ID No. 1 исключена.

Кроме того, настоящее изобретение относится к рекомбинантной и/или гетерологичной молекуле ДНК, которая содержит последовательности молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, эта молекула ДНК предпочтительно имеет регуляторную последовательность. Таким образом, она может быть функционально сцеплена с этой регуляторной последовательностью или находиться под влиянием этой регуляторной последовательности. Эта регуляторная последовательность предпочтительно является промоторной последовательностью и/или другими последовательностями транскрипции или элементов контроля трансляции - например, цис-элементов. Регуляторная последовательность, которая контролирует экспрессию гена, который включает молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно представляет собой последовательность, которая способна придавать или модулировать экспрессию в результате заражения патогеном. Этот промотор предпочтительно способен контролировать экспрессию последовательности ДНК конкретно в листьях растения. Регуляторная последовательность может быть гетерологична экспрессирующей последовательности. Преимущество такого подхода состоит в том, что специалист в данной области техники может лучше регулировать скорость экспрессии экспрессирующей последовательности, ткань, в которой происходит экспрессия и 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 растения от патогенов (пример: гены устойчивости (R-гены) или гены, которые кодируют ферменты, участвующие в передаче сигнала, такие как киназы или фосфатазы, и G-белок, или которые кодируют патогенный эффектор (которые известны как гены авирулентности (*avr*))). Гетерологичная последовательность ДНК может быть одной из последовательностей ДНК в соответствии с настоящим изобретением. Гетерологичная последовательность ДНК может также дополнительно кодировать дополнительные компоненты защиты растения от патогенов. Следовательно, гетерологичная последовательность ДНК может быть сконструирована таким образом, что после ее транскрипции создается полицистронная мРНК.

Настоящее изобретение, кроме того, также относится к полипептиду, который может кодироваться молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением и к его функционально и/или иммунологически активному фрагменту, а также к антителу,

которое специфически связывается с полипептидом или с его фрагментом. Полипептид особенно предпочтительно имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID No. 3. Рекомбинантное получение белков, полипептидов и фрагментов знакомо специалисту в данной области техники (Сэмбрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001, или Вингфилд, П. Т., 2008, Производство рекомбинантных белков, Current Protocols in Protein Science, 52:5.0:5.0.1–5.0.4). Поликлональные или моноклональные антитела к белку в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены специалистом в данной области техники в соответствии с известными способами (Э. Харлоу *и соавт.*, редактор, Антитела: Лабораторное руководство (1988)). Получение моноклональных антител, а также фрагментов Fab и F(ab')₂, которые также полезны для способов обнаружения белка, может быть осуществлено с помощью различных традиционных способов (Годдинг, Моноклональные антитела: принципы и практика, стр. 98-118, Нью-Йорк: Academic Press (1983)). Антитела затем могут быть использованы для скрининга библиотек экспрессии кДНК с целью идентификации идентичных, гомологичных или гетерологичных генов посредством иммунологического скрининга (Сэмбрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 1989, или Осубель *и соавт.*, 1994, "Текущие протоколы в молекулярной биологии". John Wiley & Sons), или могут быть использована для анализов вестерн-блоттинга. В частности, настоящее изобретение относится к антителам, которые избирательно обнаруживают полипептид, кодируемый аллелем, придающим устойчивость к Церкоспоре в соответствии с настоящим изобретением, и по существу не обнаруживают полипептид, кодируемый соответствующим чувствительным аллелем, то есть, они обнаруживают меньше в 2 раза - предпочтительно, в 5 раз, и, более предпочтительно, в 10 или более раз - полипептида, кодируемого соответствующим чувствительным аллелем, чем полипептида, кодируемого аллелем, придающим устойчивость к Церкоспоре в соответствии с настоящим изобретением.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело в соответствии с настоящим изобретением характеризуется тем, что оно представляет собой синтетический полипептид, который не встречается в природе.

Кроме того, антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть сцеплены с флуоресцентным красителем для того, чтобы их можно было использовать, например, в иммуногистохимическом способе и вызывать окраску антител. Флуоресцентным

красителем может быть флуорохром. Антитела в соответствии с настоящим изобретением также могут присутствовать сцепленными с другими сигнальными молекулами. Среди них, например, биотин, радиоизотопы, репортерные ферменты, такие как щелочная фосфатаза, или олигонуклеотиды.

Дополнительным объектом настоящего изобретения являются векторы или кассеты экспрессии, которые включают молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу рекомбинантной ДНК в соответствии с настоящим изобретением - возможно, под контролем регуляторных элементов и, в частности, под контролем функциональных регуляторных элементов в растениях, а также отрицательные и/или положительные селективные маркеры. Таким образом, остов вектора гетерологичен молекуле нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, а это означает, что такой вектор не встречается в природе и не может быть выделен из природы. Вектор представляет собой плазмиду, космиду, бактериофаг или вектор экспрессии, трансформирующий вектор, челночный вектор или клонирующий вектор; он может быть двухцепочечным или одноцепочечным, линейным или кольцевым; или он может трансформировать прокариотический или эукариотический организм либо путем интеграции в его геном, либо внехромосомно. Молекула нуклеиновой кислоты или молекула ДНК в соответствии с настоящим изобретением в векторе экспрессии или кассете экспрессии предпочтительно функционально сцеплена, по меньшей мере, с одной регуляторной последовательностью, которая обеспечивают транскрипцию и, необязательно, экспрессию в прокариотической или эукариотической клетке; (Сэмбрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001). Эти регуляторные последовательности предпочтительно являются промоторами или терминаторами - в частности, начальной точкой инициации транскрипции, местоположением связывания рибосомы, сигналом обработки РНК, местоположением терминации транскрипции и/или сигналом полиаденилирования. Например, молекула нуклеиновой кислоты в данном документе находится под контролем подходящего промотора или терминатора. Подходящими промоторами могут быть конститутивные промоторы (пример: промотор 35S из "Вируса мозаики цветной капусты" (Оделл *и соавт.*, Nature 313 (1985), 810 - 812); особенно подходящими являются промоторы, которые являются патогенно индуцируемыми (пример: промотор PR1 из петрушки (Rushton *et al.*, EMBO J. 15 (1996), 5,690-5,700)). Особенно подходящими патогенно индуцируемыми промоторами являются синтетические или химерные промоторы, которые не встречаются в природе, состоят из множества элементов и содержат минимальный

промотор, а также имеют, по меньшей мере, один *цис*-регуляторный элемент выше минимального промотора, при этом, по меньшей мере, один *цис*-регуляторный элемент служит местом связывания для специальных факторов транскрипции. Химерные промоторы могут быть сконструированы в соответствии с желаемой спецификой, и они могут быть индуцированы или репрессированы различными факторами. Примеры таких промоторов можно найти в работах WO 00/29592, WO 2007/147395 и WO 2013/091612. Например, подходящим терминатором является терминатор нопалин-синтазы (Депикер *и соавт.*, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 561-573). Подходящими промоторами и терминаторами также могут быть нативный промотор и нативный терминатор, последовательности ДНК которых воспроизведены в SEQ ID Nos. 7 и 8. Векторы или кассеты экспрессии дополнительно содержат обычные индикаторные/репортерные гены или гены устойчивости для обнаружения переноса желаемого вектора или молекулы ДНК/молекулы нуклеиновой кислоты и для отбора индивидуумов, которые их содержат, поскольку прямое обнаружение гена посредством экспрессии по большей части является скорее трудным. Поскольку молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением в данном документе сама кодирует полипептид, который придает устойчивость к заболеванию пятнистостью листьев, вызываемому Церкоспорой, то для экспрессии в растительных клетках необязательно предложить дополнительный ген устойчивости; однако это рекомендуется для обеспечения быстрого отбора.

Примерами индикаторных/репортерных генов являются, например, ген люциферазы и ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP). Кроме того, они также позволяют проводить испытания на активность и/или регуляцию промотора гена. Примерами генов устойчивости - в частности, для трансформаций растений - являются ген неомицинофосфотрансферазы, ген гигромицинофосфотрансферазы или ген, кодирующий фосфинотрицинацетилтрансферазу. Дополнительными маркерами положительного отбора могут быть ферменты, которые предлагают трансформированному растению селекционное преимущество перед нетрансформированным растением - в частности, преимущество в питательных веществах, такие как манноза-6-фосфатизомераза или ксилоизомераза. Однако это не исключает дополнительных индикаторных/репортерных генов или генов устойчивости, известных специалисту в данной области техники. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, вектор представляет собой вектор растения. Кроме того, кассета экспрессии может присутствовать в виде интегрированной в геном растения.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к клеткам, которые включают векторы, молекулы рекомбинантной ДНК и/или молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Клетка-хозяин 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 растительную клетку; растительная клетка 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, настоящее изобретение также охватывает клеточную культуру, которая содержит такие клетки. Клеточная культура предпочтительно представляет собой чистую культуру или изолят, который не содержит клеток другого типа.

Специалисту в данной области техники известны как многочисленные способы, такие как конъюгация или электропорация, с помощью которых он может ввести молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, молекулу рекомбинантной ДНК и/или вектор, или кассету экспрессии по настоящему изобретению в агробактерию, так и такие способы, как разнообразные способы трансформации (биолистическая трансформация, трансформация, опосредованная агробактериями), с помощью которых он может ввести молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, молекулу ДНК и/или вектор по настоящему изобретению в растительную клетку (Сэмбрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001).

Кроме того, настоящее изобретение предпочтительно относится к растению, устойчивому к Церкоспоре, предпочтительно к растению вида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* или к его части - которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, которая придает устойчивость к Церкоспоре. Растение, устойчивое к Церкоспоре, может содержать молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением в качестве трансгена или в качестве эндогена. В рамках настоящего изобретения, впервые были получены растения подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. В данном документе настоящее изобретение также включает растения подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, которые

содержат молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением в качестве эндогена.

Часть, таким образом, может представлять собой клетку, ткань, орган или комбинацию множества клеток, тканей или органов. Комбинация нескольких органов представляет собой, например, цветок или семя. Растение, устойчивое к Церкоспоре по настоящему изобретению, предпочтительно демонстрирует более высокую устойчивость к Церкоспоре, в частности, к *Cercospora beticola* - чем соответствующее растение, которое не содержит молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением (контрольное растение). Контрольное растение в идеале имеет генотип, идентичный трансгенному растению, и культивировалось в идентичных условиях, но не содержит молекулу нуклеиновой кислоты, придающую устойчивость. Уровень устойчивости, например, к *Cercospora beticola*, может быть качественно установлен у растений рода Beta путем определения рейтинговых баллов. Более высокая устойчивость проявляется в улучшении устойчивости, по меньшей мере, на один рейтинговый балл, по меньшей мере, на два рейтинговых балла и, предпочтительно, по меньшей мере, на три или более рейтинговых балла.

Растительная клетка или растение, или его часть по настоящему изобретению, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, в частности, растение рода Beta, предпочтительно проявляет более высокую устойчивость к патогену - в частности, к *Cercospora beticola* - чем соответствующая растительная клетка или растение, или его часть, которая не содержит молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением или содержит чувствительный аллельный вариант молекулы нуклеиновой кислоты. Уровень устойчивости, например, к *Cercospora beticola*, может быть качественно установлен у растений рода Beta путем определения рейтинговых баллов. Более высокая устойчивость проявляется в улучшении устойчивости, по меньшей мере, на один рейтинговый балл, по меньшей мере, на два рейтинговых балла и, предпочтительно, по меньшей мере, на три или более рейтинговых балла.

В случае трансгенной растительной клетки, или растения, или его части, она содержит молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу ДНК в соответствии с настоящим изобретением в качестве трансгена или вектора, или кассеты экспрессии по настоящему изобретению. Такой трансгенной растительной клеткой или растением, или его частью

является, например, клетка, которая трансформирована - предпочтительно стабильно - молекулой нуклеиновой кислоты, молекулой ДНК в соответствии с настоящим изобретением, или вектором, или кассетой экспрессии по настоящему изобретению. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты функционально сцеплена, по меньшей мере, с одной регуляторной последовательностью, которая обеспечивает транскрипцию и, необязательно, экспрессию в растительной клетке. Общая структура, состоящая из молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением и регуляторной последовательности (последовательностей), может также представлять 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.

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

Кроме того, настоящее изобретение также относится к клеточному экстракту из клетки - предпочтительно, из растительной клетки, особенно предпочтительно, из клетки *Beta vulgaris* и, особенно предпочтительно, из клетки одной из следующих культур: сахарной свеклы, мангольда или свеклы обыкновенной. Ни одно растение не может быть регенерировано из клеточного экстракта.

Аналогичным образом настоящее изобретение охватывает геном растения, содержащий нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением.

Концентрация сахара из клеточного экстракта, таким образом, может быть увеличена по сравнению с клеткой, которая не является клеткой в соответствии с настоящим изобретением, но которая принадлежит к тому же виду или культуре. Это относится, в частности, к условиям заражения *Церкоспорой*.

Настоящее изобретение также охватывает использование клеточного экстракта для производства сахара (сахарозы) или для производства сока - предпочтительно, свекольного сока.

Аналогичным образом настоящее изобретение охватывает сахар - в частности, сахарозу - содержащийся в клетках в соответствии с настоящим изобретением и в их вакуолях.

Дополнительным аспектом настоящего изобретения является семенной материал, содержащий семена, которые содержат нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением. Нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением может присутствовать трансгенно или эндогенно. Семенной материал и семена могут быть технически обработаны. Таким образом, настоящее изобретение также содержит технически обработанный семенной материал и технически обработанные семена. Различные варианты технически обработанного семенного материала подробно объясняются ниже, при этом, термин "семенной материал" также включает семена. Технически обработанный семенной материал может присутствовать в полированной форме. Таким образом, удаляется самый внешний слой семени, так что семя приобретает более округлую форму. Это полезно при посеве, где оптимально однородная форма приводит к равномерному распределению зерен семенного материала. Технически обработанный семенной материал, кроме того, охватывает гранулированный семенной материал. Таким образом, семенной материал вкладывается в гранулированную массу, которая защищает содержащийся в ней семенной материал и приводит к увеличению массы, так что гранулированный семенной материал демонстрирует большую устойчивость к сносу под воздействием ветра и, таким образом, меньшую восприимчивость к сдуванию ветром, и, в то же время, обеспечивается более точное позиционирование во время посева. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, все гранулированные зерна семенного материала партии или единицы, предназначенные для продажи, имеют по существу одинаковую форму и одинаковую массу. Возможны отклонения в диаметре и массе на 5%. Однако отклонения предпочтительно не превышают 1%. В качестве одного из основных компонентов, гранулированная масса может содержать, например, минеральное соединение, такое как глина, бентонит, каолин, перегной и/или торф, например. Можно добавить адгезивный материал, такой как полиацетамид. Дополнительные возможные компоненты указаны в работе US 4,067,141. Кроме того, гранулированная масса может содержать дополнительные химические агенты, которые положительно влияют на культивирование на практике. В данном документе это могут быть вещества, которых относят к числу удобряющих агентов. К ним относятся соединения, богатые, по меньшей мере, одним из следующих элементов: азотом, фосфором и калием (макроэлементы). Следовательно, ингредиенты для удобрения могут содержать, например, нитратный азот, аммонийный азот, нитрат магния, кальций-аммиачная селитра,

моноаммонийфосфат, монокалийфосфат и нитрат калия. Кроме того, гранулированная масса может содержать фунгициды, инсектициды и/или антифиданты. Фунгицидами могут быть тирам и/или гимексазол, и/или другие фунгициды. Инсектицидом может быть вещество из группы неоникотиноидов. Веществом из группы неоникотиноидов предпочтительно является имидаклоприд (код АТС: QP53AX17) и/или клотианидин (номер CAS 210880-92-5). Кроме того, инсектицидом также может быть цифлутрин (номер CAS 68359-37-5), бета-цифлутрин или тефлутрин. Следует отметить, что соединение, включенное в состав массы для протравливания или гранулированной массы, усваивается растением и проявляет системный эффект, тем самым предлагая надлежащую защиту всего растения. Таким образом, растения, полученные из гранулированных семян, содержащих, по меньшей мере, один пестицид, отличаются от растений, встречающихся в природе, и демонстрируют лучшую производительность в условиях биотического стресса. В этом контексте, настоящее изобретение также охватывает смесь гранулированной массы и семян в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, настоящее изобретение также охватывает способ получения гранулированных семян в соответствии с настоящим изобретением, содержащий следующие этапы:

- a) предложение семени растения, содержащего нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением,
- b) вложение семян растения сахарной свеклы в гранулированную массу, и
- c) гранулированной массе дают высохнуть или гранулированную массу высушивают, при этом, семенами растения могут быть необязательно праймированные или предварительно пророщенные семена растений, или семенам растений могут позволить быть праймированными на этапе b). Необязательно, способ может быть завершен дополнительным этапом d)
- d) Упаковка вложенных семян растений, полученных на этапе c), в упаковку. Примеры подходящих упаковок приведены в данном документе в другом месте. Семя растения может, например, быть семенем растения рода *Beta*, как описано в данном документе, включая сахарную свеклу или свеклу столовую красную.

Гранула семени также может содержать полезные бактерии. Предпочтительно, чтобы бактерии находились в жизненном статусе и могли подвергаться пролиферации. Симбиотические бактерии могут оказывать разнообразное положительное влияние на прорастание семян, включая повышенный жизненный тонус, повышенную скорость прорастания и лучшую устойчивость к стрессу. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, микроорганизмы вида *Pseudomonas*

spp. включены в гранулы семян. Дополнительно могут быть добавлены штаммы различных бактерий. Возможный способ повышения жизнеспособности микроорганизмов содержит этапы:

- a) суспендирование, по меньшей мере, одной предварительной культуры микробных клеток в растворе полимерной субстанции,
- b) иммобилизация указанных микробных клеток путем опускания раствора этапа a) в раствор многовалентных ионов, тем самым получая полимерные частицы,
- c) культивирование инкапсулированных микроорганизмов в указанных полимерных частицах в течение, по меньшей мере, 12 часов, предпочтительно в течение, по меньшей мере, 24 часов в жидкой среде, пока не будет получено увеличение плотности клеток, по меньшей мере, на 2-10 log,
- d) сбор полимерных частиц и e) сушка полимерных частиц.

Гранулированные семена, содержащие ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением и содержащие, кроме того, микроорганизмы, которые были получены способом, раскрытым в этом пункте, являются частью настоящего изобретения. Кроме того, микроорганизмы могут быть инкапсулированы и/или могут быть вложены во внеклеточную матрицу, содержащую нафтазарин.

В этом контексте, технически обработанный семенной материал охватывает также протравленный семенной материал. Настоящее изобретение может быть применено к любой форме протравленного семенного материала. Таким образом, также охватываются сухая протравка, влажная протравка и суспензионная протравка. Таким образом, протравливание может также содержать, по меньшей мере, один краситель (окрашивание), так что протравленный семенной материал можно быстро отличить от непротравленного семенного материала, и, кроме того, после посева обеспечивается хорошая видимость в окружающей среде. Протравливание может также содержать те агрохимикаты, которые описаны в контексте гранулированной массы. Таким образом, настоящее изобретение включает такой протравленный семенной материал, при котором протравливание содержит, по меньшей мере, одно средство против подкормки, такое как инсектицид и/или, по меньшей мере, один фунгицид. Необязательно может быть применено так называемое электронное протравливание (протравливание с применением электрической энергии). Электронное протравливание не является протравливанием в строгом смысле этого слова, но очень подходит для уничтожения патогенов растений, которые прилипают к семенам или семенному материалу, перед посадкой семян или семенного материала. Также преимуществом является то, чтобы семена или семенной материал, которые были

обработаны только с помощью электронного протравливания (без использования агрохимикатов), можно было скармливать животным в случае, если имеется больше семян или семенного материала, чем это необходимо для обработки поля.

Дополнительной формой технически обработанного семенного материала является инкрустированный семенной материал. В этом контексте также говорится о покрытии, а также о семенном материале, обработанном покрытием. Отличие гранулированного семенного материала заключается в том, что зерна семени сохраняют свою первоначальную форму, при этом, этот способ особенно экономичен. Способ описан, например, в работе EP 0 334 258 A1. Дополнительной формой технически обработанного семенного материала является пророщенный или праймированный семенной материал. Проросший семенной материал предварительно обрабатывают с помощью предварительного проращивания, в то время как праймированный семенной материал был предварительно обработан праймированием ("проращивание"). Преимущество предварительно пророщенных и праймированных семян заключается в более коротком времени появления всходов. В то же время момент появления всходов после посева более точно синхронизирован. Это обеспечивает лучшую агротехническую обработку во время культивации 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, а затем процесс останавливают. При праймировании процесс останавливается до того, как корешок выйдет из оболочки семенного материала. По сравнению с предварительно пророщенным семенным материалом, семенной материал, который был подвергнут праймированию, нечувствителен к стрессу, связанному 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 этом контексте технически предварительно обработанный семенной материал также включает праймированный и повторно высушенный семенной материал. Процесс предварительного проращивания описан в работе US 4,905,411 A. Различные варианты праймирования описаны в работе EP 0 686 340 A1. В дополнение к этому, также возможно одновременное гранулирование и праймирование семенного материала в одном процессе. Этот способ описан в работе EP 2 002 702 B1. Настоящее изобретение охватывает праймированный семенной материал, который, кроме того, является гранулированным.

Технически обработанный семенной материал может дополнительно быть снабжен, по меньшей мере, одним 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 средством борьбы с сорняками и, следовательно, не содержит сорняков.

В дополнение к этому, настоящее изобретение также охватывает смесь, содержащую семенной материал в соответствии с настоящим изобретением или семена в соответствии с настоящим изобретением, и протравленную массу, как определено выше. Таким образом, протравленная масса предпочтительно осуществлена в виде гранулированной массы, как определено выше.

При хранении семенного материала в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно выбирать условия хранения, которые не оказывают отрицательного влияния на стабильность или срок хранения семенного материала. Колебания влажности могут, в частности, оказать в данном случае неблагоприятное воздействие. Частью настоящего изобретения является способ хранения семенного материала в пакете или контейнере, который является одновременно водоотталкивающим и воздухопроницаемым. Такой пакет или контейнер может быть сконструирован в виде картонной коробки или упаковки. Такая картонная коробка или упаковка необязательно может иметь внутреннюю пароизоляцию. Если картонная коробка или упаковка сконструирована в виде двухслойной картонной коробки, ее стабильность повышается. Контейнер, пакет, картонная коробка или упаковка, содержащие семенной материал в соответствии с настоящим изобретением, или технически обработанный семенной материал в соответствии с настоящим изобретением, также являются частью настоящего изобретения. Аналогичным образом, частью настоящего изобретения является хранение семенного материала в соответствии с настоящим изобретением или технически обработанного семенного материала в соответствии с настоящим изобретением в таком пакете, контейнере, коробке, упаковке или картонной коробке.

Настоящее изобретение также охватывает сорта, содержащие ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, сюда включены растения, семена и семенной материал такого сорта. Семена и семенной материал такого сорта могут быть подвергнуты технической обработке, как описано в данном документе (например,

гранулированию). Подходящими сортами сахарной свеклы для введения гена устойчивости являются, например,

BTS 7300 N, BTS 2045, BTS 3750, DAPHNA, КОПТЕЦКА KWS или SABATINA KWS. Растения сахарной свеклы названных сортов также являются примерами гибридных растений сахарной свеклы. Подходящими сортами свеклы столовой красной для введения гена устойчивости являются, например, Jolie, Scarlett (PV-9503) или Diaz, при этом, Jolie и Diaz также являются примерами гибридных растений свеклы столовой красной. Подходящими сортами швейцарского мангольда для введения гена устойчивости являются, например, Fluence, Ion или Tesla / PV-9022. Подходящими сортами *Spinacia oleracea* (шпинат) для введения гена устойчивости являются, например, PV-9210, PV-1194 или La Paz / PV-1237. Гибридные растения извлекают выгоду из эффекта гетерозиса.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение в соответствии с настоящим изобретением является гибридным растением или двойным гаплоидным растением. Гибридные растения и двойные гаплоидные растения не встречаются в природе и не могут быть выделены из природы. В другом варианте осуществления растения в соответствии с настоящим изобретением, молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением присутствует в гетерозиготной или гомозиготной форме. В случае гибридного растения, молекула нуклеиновой кислоты также может присутствовать в гемизиготной форме. Настоящее изобретение также охватывает гибридные семена и двойные гаплоидные семена, которые содержат нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением или полипептид в соответствии с настоящим изобретением.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения содержит растение - предпочтительно, вида *Beta vulgaris* - которое характеризуется тем, что устойчивость к Церкоспоре у этого растения дополнительно повышена. Например, это может быть реализовано посредством "пирамидирования генов", то есть, устойчивость повышается с использованием этого эффекта дозы. Для этого растения в соответствии с настоящим изобретением, которые содержат аллель, придающий устойчивость к Церкоспоре, подвергают избыточной трансформации с помощью этого аллеля устойчивости, чтобы увеличить количество транскрипции гена в растении. Альтернативный подход включает редактирование гена/сайт-направленный мутагенез или TILLING-опосредованную модификацию нативного промотора аллеля, придающего устойчивость, с целью увеличения скорости его экспрессии, или модификацию самого аллеля гена LRR, придающего устойчивость, с целью повышения его активности или стабильности. Такой способ

повышения активности посредством модификации гена устойчивости описан, например, в работе WO 2006/128444 A2 и может быть осуществлен с помощью методов, известных специалисту в данной области техники. Дополнительный подход может включать слияние молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением с гетерологичным промотором, который проявляет более высокую активность по сравнению с нативным промотором - в частности, после заражения Церкоспорой.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к растению сахарной свеклы или к его части, или к гранулированному семени такого растения, которое можно собирать до стрелкования, поскольку стрелкование растений сахарной свеклы не происходит в течение первых 10, 11, 12, 13, 14 или 15 месяцев после прорастания, и развитие свекольного тела заканчивается в этот период. Подходящими сортами для создания растения сахарной свеклы в соответствии с этим пунктом путем введения устойчивости в соответствии с настоящим изобретением являются, например, DAPHNA, KORTESSA KWS или SABATINA KWS.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение сахарной свеклы или его часть, или гранулированное семя такого растения имеет геном, позволяющий развивать свекольное тело, имеющее массу, составляющую, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или даже 90% от общей массы полностью выросшего растения. Подходящими сортами для создания растения сахарной свеклы в соответствии с этим пунктом путем введения устойчивости в соответствии с настоящим изобретением являются, например, DAPHNA, KORTESSA KWS или SABATINA KWS.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, растение сахарной свеклы или его часть, или гранулированное семя такого растения имеет геном, позволяющий развивать свекольное тело, имеющее минимальную массу 200 г, 250 г, 300 г, 350 г, 400 г, 450 г или 500 г и максимальную массу 1000 г, 1100 г, 1200 г, 1300 г, 1400 г, 1500 г, 1600 г, 1700 г, 1800 г, 1900 г или даже 2000 г, с помощью фотосинтеза. Подходящими сортами для создания растения сахарной свеклы в соответствии с этим пунктом путем введения устойчивости в соответствии с настоящим изобретением являются, например, DAPHNA, KORTESSA KWS или SABATINA KWS.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к растению сахарной свеклы или его части, или к гранулированному семени такого растения, при этом, геном растения сахарной свеклы позволяет получить свекольное тело, имеющее

концентрацию сахарозы, составляющую, по меньшей мере, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или даже 20%. Подходящими сортами для создания растения сахарной свеклы в соответствии с этим пунктом путем введения устойчивости в соответствии с настоящим изобретением являются, например, DAPHNA, KORTESSA KWS или SABATINA KWS.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, растение сахарной свеклы или его часть, или гранулированное семя такого растения включает, по меньшей мере, одну, по меньшей мере, две, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре, по меньшей мере, пять, по меньшей мере, десять, по меньшей мере, двадцать или даже, по меньшей мере, тридцать мутаций относительно SEQ ID No. 1, 2 или 4.

Способ получения организма, который содержит мутированную версию молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с приведенным выше вариантом осуществления настоящего изобретения [1] и/или мутированную версию промотора, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из (a) SEQ ID NO: 7, (b) нуклеотидной последовательности, которая гибридизируется в жестких условиях с последовательностью, которая комплементарна последовательности в соответствии с пунктом (a), и (c) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 70% идентична последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 7, при этом, способ включает следующие этапы:

- (I) Предложение организма или клетки, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты и/или промотор
- (II) Увеличение частоты мутаций организма или клетки или мутагенез организма или клетки
- (III) Фенотипический отбор организма, который в результате мутации проявляет измененную устойчивость или измененный уровень устойчивости к *Cercospora beticola*, или генотипический отбор организма, или клетки, которая содержит мутацию в молекуле нуклеиновой кислоты и/или промоторе, при этом мутация была создана на этапе (II) и необязательно
- (IV) Регенерация организма из клетки, полученной на этапе (III).

Организмом может быть растение. Предпочтительно, чтобы растение было *Beta vulgaris*. Однако также возможно использовать одноклеточные организмы в качестве бактерий. Бактерией может быть *E.coli*. Если организмом является растение, то способ может быть применен как *in vivo*, так и *in vitro*. Если организмом является растение и способ

применяется как *in vitro*, то может быть создана клеточная культура растения, и в клеточной культуре может произойти увеличение частоты мутаций или мутагенизация. Увеличение частоты мутаций охватывает, например, применение мутагенных агентов, таких как, например, 5-бромурацил или этилметансульфонат (EMS), или применение физических мутагенов, таких как ионизирующее излучение или ультрафиолетовый свет. Мутагенизация охватывает также целенаправленный мутагенез. Целенаправленный мутагенез может быть достигнут с помощью таких точных методов, как редактирование генов (как описано далее ниже). Регенерация организма из клеток объясняется в различных стандартных справочниках по клеточной биологии. Регенерация растений, например, объясняется в стандартном справочнике "Биотехнология растений: комплексная биотехнология, второе дополнение" (Майкл У. Фаулер, Грэм Уоррен, Мюррей Му-Янг – Pergamon Press - 1992). Регенерация *Beta vulgaris* из клеточной культуры описана в работе Линдси и Галлуа "Трансформация сахарной свеклы (*Beta vulgaris*) посредством *Agrobacterium tumefaciens*". *Journal of experimental botany* 41.5 (1990): 529-536.

Эти справочники также описывают, как создаются культуры растительных клеток. Как объяснено дополнительно выше, мутированная версия молекулы нуклеиновой кислоты, соответственно, промотор, характеризуют себя предпочтительно за счет скорости экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, придающей устойчивость, которая увеличивается в результате мутации. Такой эффект также может зависеть от присутствия нескольких мутаций. Например, можно ввести две, три, четыре, пять или более мутаций в промотор или молекулу нуклеиновой кислоты.

Путем введения мутаций, таким образом в клетке может быть создан белок, придающий большую устойчивость, или белок оказывает лучший эффект. Таким образом, устойчивость по сравнению с контрольным растением, содержащим неизмененную нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением, может быть увеличена, например, по меньшей мере, на 1, 2, 3, 4, 5 или более процентов. Увеличение может быть измерено, как объяснено далее ниже. Более того, устойчивость из-за мутации или мутаций может быть увеличена, по меньшей мере, на один рейтинговый балл. Определение рейтинговых баллов объясняется в другом месте настоящего документа. Кроме того, белок устойчивости может придавать - в результате мутаций – измененный эффект и при некоторых обстоятельствах может проявлять действие против таких патогенов, которые адаптировались к первоначальному механизму устойчивости. В этом контексте, настоящее изобретение охватывает также такие мутированные варианты нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением и мутированные варианты белка в соответствии с настоящим

изобретением. Предпочтительно настоящее изобретение охватывает такие варианты, которые не встречаются в природе и не могут быть выделены из природы, чтобы убедиться, что патоген не имел возможности адаптироваться к таким вариантам. Вышеописанный способ получения организма, который содержит мутированную версию молекулы нуклеиновой кислоты, может, кроме того, включать дальнейший этап, в котором идентифицируются те организмы или, соответственно, растения, которые обладают дополнительной повышенной устойчивостью вследствие мутации или мутаций. Если произошло увеличение устойчивости, это может быть определено с помощью приведенных в данном документе рейтинговых баллов или измерения уровня устойчивости.

Помимо вышеописанного способа получения организмов, которые содержат мутированную версию молекулы нуклеиновой кислоты или промотора, также возможно химически модифицировать соответствующие нуклеиновые кислоты в выделенном состоянии для достижения желаемых эффектов (как, например, те, которые описаны выше). Преимущество такого подхода заключается в том, что соединения можно редактировать еще более точно. Для этой цели предлагается следующий способ:

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

(a) SEQ ID NO: 7

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

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

при этом, способ содержит следующие этапы:

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

(II) химическая модификация молекулы нуклеиновой кислоты или промотора с помощью одного из следующих этапов:

(IIa) Мутагенизация

(IIb) Редактирование генов

(IIc) Рестрикция и лигирование соответственно вставкой или делецией.

Кроме того, химические модификации могут быть сгенерированы с помощью таких подходов, как указано в другом месте настоящего документа в контексте аллельных вариантов. Редактирование генов, приведенное на этапе (II) выше, равнозначно термину "Редактирование генома". Необязательно химически модифицированная молекула нуклеиновой кислоты или химически модифицированный промотор могут быть впоследствии введены в клетку или могут быть стабильно интегрированы. С помощью такой клетки, химически модифицированная молекула нуклеиновой кислоты и модифицированный промотор могут размножаться в контексте клеточной пролиферации. Впоследствии они могут быть выделены в огромном количестве и могут быть проведены анализы экспрессии. Анализ экспрессии особенно подходит, когда химическая модификация касается промотора. Можно собрать клетки и выделить химически модифицированный белок устойчивости для химического анализа. Если клетка, которая содержит химически модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты или модифицированный промотор, является растительной клеткой, то из этой клетки может быть регенерировано целое растение. Подходы, описанные в этом отрывке, могут быть выполнены в дополнение к приведенному выше способу получения модифицированной формы молекулы нуклеиновой кислоты и/или модифицированного промотора, и полученные варианты также являются частью этого изобретения. Более того, растение, содержащее химически модифицированную молекулу нуклеиновой кислоты или модифицированный промотор, также является частью настоящего изобретения. Таким образом, настоящее изобретение также относится к растению, полученному этим способом. Кроме того, настоящее изобретение относится также к химически модифицированным молекулам нуклеиновых кислот, полученным этим способом, и к кодируемым полипептидам. Эти соединения могут быть оптимизированными версиями исходных (не модифицированных) соединений, при этом результирующий уровень устойчивости – как объяснено дополнительно выше - может быть увеличен, по меньшей мере, на 1, 2, 3, 4, 5 или более процентов или может быть увеличен, по меньшей мере, на один рейтинговый балл. В этом отношении способ получения химически модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты также является способом оптимизации молекулы нуклеиновой кислоты. Способ оптимизации может, кроме того, содержать дополнительный этап, на котором идентифицируют те модифицированные варианты молекулы нуклеиновой кислоты, которые приводят, по сравнению с неизменными вариантами, к повышенной устойчивости растения.

В другом варианте осуществления, растение по настоящему изобретению дополнительно, трансгенно или эндогенно, содержит вторую молекулу нуклеиновой кислоты в другом положении в геноме, которая кодирует полипептид, способный придавать устойчивость к Церкоспоре в растении, в котором экспрессируется полипептид. Например, по меньшей мере, один из 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, гомологично направленной репарации или гомологичной рекомбинации в растении. Среди них, например, устойчивость к ризомании RZ1 (Левеллен Р.Т., И.О. Скоен и А. В. Эрихсен, "Селекция сахарной свеклы на устойчивость к ризомании: оценка реакций растения-хозяина и отбор, и наследование устойчивости". 50й Зимний конгресс Международного института исследования сахарной свеклы, Брюссель (Бельгия), 11-12 февраля 1987 года. IRB. Генеральный секретариат, 1987), или устойчивость к ризомании RZ3 (WO 2014/202044), при этом, вариант осуществления настоящего изобретения, касающийся RZ3, более подробно объясняется в отрывке [94].

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу повышения устойчивости к Церкоспоре у растения вида *Beta vulgaris*, при этом, повышение устойчивости происходит без гена, придающего устойчивость в соответствии с настоящим изобретением, по сравнению с изогенным растением.

Повышение устойчивости может происходить посредством интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением 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 *Beta vulgaris* subsp. *maritima* и последующего отбора, или посредством гомологично направленной репарации, или гомологичной рекомбинации. Два последних упомянутых способа предпочтительно поддерживаются сайт-направленными нуклеазами, которые могут быть выбраны из следующих нуклеаз, но не ограничиваются ими: нуклеаза CRISPR, включая нуклеазу Cas9, CasX, CasY или Cpf1, нуклеаза TALE, цинк-пальцевая нуклеаза, мегануклеаза, нуклеаза Аргонавт, эндонуклеаза рестрикции, включая FokI или ее вариант, рекомбиназа или две, сайт-специфичные, никующие эндонуклеазы. Введение гена, придающего устойчивость, посредством CRISPR-опосредованной гомологичной рекомбинации в *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* показано в Примере 1.

Кроме того, настоящее изобретение охватывает также способ получения растения сахарной свеклы рода *Beta*, которое с агрономической точки зрения демонстрирует улучшенную устойчивость к *Cercospora beticola*, способ, содержащий внедрение в указанное растение хромосомного интервала, который придает улучшенную устойчивость к *Cercospora beticola*, при этом, хромосомный интервал соответствует положению между последовательностью, представленной маркером, выбранным из группы, состоящей из s4p4293s01 и s4p4295s01

и последовательностью, представленной маркером, выбранным из группы, состоящей из s4p4301s01 и sxh0678s01,

характеризующийся тем, что хромосомный интервал содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который способен придавать устойчивость к *Cercospora beticola* в растении, в котором экспрессируется полипептид, при этом нуклеотидная последовательность выбрана из

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

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

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

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

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

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

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

Альтернативный подход включает увеличение экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением в растении. Это может происходить посредством модификации нативного промотора, при этом, модификация предпочтительно происходит

посредством редактирования гена или сайт-направленного мутагенеза, который опосредуется сайт-направленными нуклеазами, и, необязательно, моделями репарации. Примеры таких нуклеаз уже приводились выше. Увеличение экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением может также происходить посредством слияния молекулы нуклеиновой кислоты с гетерологичным промотором, который проявляет более высокую активность по сравнению с нативным промотором - в частности, после заражения Церкоспорой. Слияние может также происходить с помощью сайт-направленной нуклеазы и моделей репарации, а также посредством прямой вставки после разрыва двухцепочечной цепи.

Как уже упоминалось выше, способ повышения устойчивости к Церкоспоре может также приводить к повышению активности и/или стабильности полипептида в соответствии с настоящим изобретением посредством модификации нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Такой способ повышения активности посредством модификации гена устойчивости описан, например, в работе WO 2006/128444 A2 и может быть осуществлен с помощью методов, известных специалисту в данной области техники. Этот подход подробно объясняется далее ниже.

Альтернативно, устойчивый к Церкоспоре генотип может быть получен из чувствительного к Церкоспоре генотипа посредством случайного или направленного мутагенеза последовательности нуклеиновой кислоты чувствительного гена, и, таким образом, устойчивость к Церкоспоре может быть повышена. Примеры полиморфизмов, которые отличают чувствительный аллель от устойчивого аллеля, представлены на Фигуре 1.

Например, чувствительный аллель может быть модифицирован посредством мутации гена с помощью нуклеаз TALE (TALEN) или цинк-пальцевых нуклеаз (ZFN), а также систем CRISPR/Cas, которые, среди прочего, описаны посредством примера в работе WO 2014/144155 A1 (Разработка геномов растений с использованием систем CRISPR/Cas) и в работе Осакабе и Оосаке, *Plant Cell Physiol.*, 56 (2015), 389-400. Это также может быть достигнуто с помощью использования способа, обозначенного как TILLING (*Целенаправленный поиск индуцированных локальных повреждений в геномах*), при этом, описано, например, в заявке на патент Германии DE 10 2013 101 617, как вызываются точечные мутации в чувствительном гене, и впоследствии отбираются растения, которые демонстрируют подходящую, то есть, придающую устойчивость, мутацию, например, ячмень, устойчивый к вирусу желтой мозаики; см. DE 10 2013 101 617 на стр. 4, 8 и 12, в

пунктах [0014], [0026] и [0038]. Способ TILLING также подробно описан в публикации Хеникоффом *и соавт.* (Хеникофф *и соавт.*, Plant Physiol. 135, 2004, 630–636).

Эти способы предпочтительно приводят к улучшению устойчивости, по меньшей мере, на один рейтинговый балл - особенно предпочтительно, к улучшению устойчивости, по меньшей мере, на два, три или более рейтинговых баллов. После мутагенеза растительных клеток и последующей регенерации растений из мутагенизированных растительных клеток или мутагенеза растений, затем могут быть идентифицированы растения, которые проявляют, по меньшей мере, одну мутацию, как показано на Фигуре 1, в молекуле эндогенной нуклеиновой кислоты. В этом контексте уже упомянутое растение в соответствии с настоящим изобретением может характеризоваться тем, что устойчивость повышена, по меньшей мере, на один рейтинговый балл, предпочтительно, по меньшей мере, на два или более рейтинговых балла. Альтернативно, устойчивость растений в соответствии с настоящим изобретением может быть повышена, например, по меньшей мере, на 1, 2, 3, 4, 5 или более процентов по сравнению с контрольным растением, которое не содержит нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением. Увеличение может быть измерено путем инокуляции соответственно одного здорового листа посредством изолята патогена и определения зараженной поверхности через 15 дней. Уменьшение площади зараженной поверхности на 5% соответствует увеличению устойчивости на 5%. Дополнительные параметры для проведения измерения могут быть получены из приведенного ниже варианта осуществления настоящего изобретения "остаток устойчивости".

Дополнительным вариантом осуществления настоящего изобретения является способ получения растения, устойчивого к Церкоспоре, который может осуществляться путем трансформации растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, молекулой рекомбинантной ДНК или вектором, или кассетой экспрессии, и регенерации трансгенного растения из трансформированной растительной клетки (см. Пример 2), а также, как описано выше, посредством случайного или целенаправленного мутагенеза последовательности нуклеиновой кислоты чувствительного гена для генерирования генотипа, устойчивого к Церкоспоре, или путем скрещивания и отбора, например, с одним из вышеупомянутых *Beta vulgaris* subsp. *maritima*. Векторы или кассеты экспрессии, а также способы трансформации растений уже были описаны выше.

Способ получения растения, устойчивого к Церкоспоре, альтернативно включает, как описано выше, введение сайт-направленной нуклеазы и репарационной матрицы в клетку растения вида *Beta vulgaris*, при этом, сайт-направленная нуклеаза способна генерировать, по меньшей мере, один двухцепочечный разрыв ДНК в геноме клетки - предпочтительно, выше и/или ниже целевой области - и репарационная матрица содержит молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Способ, кроме того, включает культивирование этой клетки в условиях, которые допускают гомологично направленную репарацию или гомологичную рекомбинацию, при этом, молекула нуклеиновой кислоты инкорпорирована из репарационной матрицы в геном растения. Кроме того, предусмотрена регенерация растения из модифицированной растительной клетки (см. Пример 1).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, целевая область представляет собой аллельный вариант молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, при этом, аллельный вариант кодирует полипептид, который не придает устойчивости к Церкоспоре. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, этот аллельный вариант содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID No. 6 и/или содержит последовательность кодированной ДНК в соответствии с SEQ ID No. 5, или последовательность геномной ДНК в соответствии с SEQ ID No. 4.

Как описано в отношении молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, могут быть введены замещения, делеции, вставки, добавления и/или любые другие изменения, которые либо по отдельности, либо в комбинациях фактически изменяют нуклеотидную последовательность, но выполняют ту же функцию, что и исходная последовательность - в данном документе, в нуклеотидную последовательность аллельного варианта молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Следовательно, в дополнительном варианте осуществления, настоящее изобретение включает нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, который представляет собой производное полипептида, который кодируется аллельным вариантом молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, или который содержит аминокислотную последовательность аллельного варианта молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Производная аминокислотная последовательность, которая имеет, по меньшей мере, одно замещение, делецию, вставку или добавление, по меньшей мере, одной аминокислоты, при этом,

функциональность кодируемого полипептида/белка сохраняется, представляет собой производное полипептида. Таким образом, используя обычные способы, которые известны из предшествующего уровня техники, например, сайт-направленный мутагенез, ПЦР-опосредованный мутагенез, транспозонный мутагенез, редактирование генома и так далее, в нуклеотидную последовательность могут быть введены замещения, делеции, вставки, дополнения и/или любые другие изменения, либо по отдельности, либо в комбинациях с геном, которые фактически изменяют нуклеотидную последовательность, но выполняют ту же функцию, что и исходная последовательность.

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 имеют идентичность, по меньшей мере, приблизительно 80%, по меньшей мере, приблизительно 85%, по меньшей мере, приблизительно 90%, по меньшей мере, приблизительно 91%, по меньшей мере, приблизительно 92%, по меньшей мере, приблизительно 93%, по меньшей мере, приблизительно 94%, по меньшей мере, приблизительно 95%, по меньшей мере, приблизительно 96%, по меньшей мере, приблизительно 97%, по меньшей мере, приблизительно 98%, по меньшей мере, приблизительно 99% или, по меньшей мере, приблизительно 100% с нуклеотидной последовательностью или аминокислотной последовательностью в соответствии с настоящим изобретением, определены в данном документе как достаточно сходные. Соответственно, настоящее изобретение включает нуклеотидную последовательность, которая способна гибридизироваться при жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, которая комплементарна нуклеотидной последовательности аллельного варианта молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением или с нуклеотидной последовательностью, которая кодирует соответствующую аминокислотную последовательность.

В другом предпочтительном варианте осуществления, способ в соответствии с настоящим изобретением характеризуется тем, что разрыв двухцепочечной цепи происходит в аллельном варианте молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с вариантом осуществления [1], или что, по меньшей мере, один разрыв двухцепочечной цепи происходит в положении, которое составляет, по меньшей мере, 10 000 пар оснований выше или ниже аллельного варианта, при этом, аллельный вариант кодирует полипептид, который не придает устойчивость к Церкоспоре.

Для специалиста в данной области техники очевидно, что могут встречаться многочисленные, различные чувствительные последовательности, которые происходят из молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, но не придают устойчивости к Церкоспоре, так что следует рассматривать только последовательности, перечисленные выше (SEQ ID Nos. 4, 5 и 6), в качестве примера последовательностей, и настоящее изобретение не ограничивается вышеупомянутым аллельным вариантом молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Такой аллельный вариант может содержать нуклеотидную последовательность, которая выбрана из:

- (a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID No. 6;
- (b) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID No. 5;
- (c) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность ДНК в соответствии с SEQ ID No. 4;
- (d) нуклеотидной последовательности, которая гибридизируется с комплементарной последовательностью в соответствии с пунктами (a), (b) или (c) в жестких условиях;
- (e) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, который, посредством замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты аминокислотной последовательности, отличается от полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью в соответствии с пунктами (a), (b) или (c);
- (f) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, который имеет аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 6;
- (g) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID No. 4 или SEQ ID No. 5;

Как описано выше, при количественной наследственности QTL, в растение зачастую вносится не только желаемая устойчивость, но, скорее, также зачастую нежелательные признаки, такие как, например, снижение урожайности, из-за наследования

дополнительных генов, которые не сцеплены с положительным признаком устойчивости. Это все чаще происходит, если, как в случае с устойчивостью к Церкоспоре, устойчивость наследуется у ранее доступных сортов посредством множества генов устойчивости с небольшим эффектом. Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, введение молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, которая уже сама по себе проявляет эффект доминантной устойчивости, или вектора, или кассеты экспрессии, не связано с введением нежелательных признаков, при этом, на урожайность, предпочтительно, не оказано отрицательного влияния. Кроме того, настоящее изобретение охватывает растение, полученное таким способом.

Хотя анализы QTL, которые ранее были известны из предшествующего уровня техники, могли обнаруживать фактические QTL, лежащие в основе области генома, которые показали эффект QTL, также опосредовали недостатки, описанные выше, поэтому "сцепленный груз" также обсуждается в этом контексте. В то же время, QTL и связанные с ними эффекты не были единообразно описаны в соответствующем уровне техники и просто опосредовали слабый эффект, так что использование этих результатов в селекции устойчивых к Церкоспоре растений 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 посредством идентификации гена устойчивости, описанного в данном документе. Это обеспечивает селекцию и генерацию совершенно новых устойчивых к Церкоспоре сортов, которые демонстрируют высокую устойчивость к патогену, не оказывая негативного влияния на урожай сахара.

Настоящее изобретение также относится к способам/процессам идентификации или обнаружения и, необязательно, отбора и/или предложения растения вида *Beta vulgaris*, которое устойчиво к патогену Церкоспоре, характеризующимся тем, что способ включает этап обнаружения присутствия и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением или полипептида в соответствии с настоящим изобретением в растении или его образце/части. Присутствие и/или экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением или полипептида в соответствии с настоящим изобретением можно проверить с помощью стандартных способов, известных специалисту в данной области техники, например, с помощью ПЦР, ОТ-ПЦР или вестерн-блоттинга. Предпочтительно олигонуклеотиды или праймеры могут гибридизироваться во время ПЦР с геномной матрицей, содержащей нуклеотидную

последовательность, как определено на этапе (i) пункта [104], таким образом/на таком расстоянии, что полученный амплификат содержит до 2000 п.о., предпочтительно до 1500 п.о., более предпочтительно 1000 п.о., наиболее предпочтительно до 500 или 200, или до 100 п.о. Растение, которое должно быть идентифицировано/обнаружено и необязательно выбрано, и/или предложено, может быть растением, содержащим ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением и, кроме того, содержащим нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 182 и/или аллель устойчивости в соответствии с маркером s4p8772s01, или может быть растением, получаемым из семян, хранящихся в NCIMB, Абердин, Великобритания под номером доступа NCIMB 43646. Способы и процессы в соответствии с этим пунктом также могут быть использованы для исключения или не рассматривания растений, которые не несут ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением. Это особенно полезно, например, в селекционных программах, где некоторые, но не все потомки растений обладают устойчивостью.

Кроме того, способ идентификации в соответствии с настоящим изобретением также включает обнаружение молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением посредством обнаружения, по меньшей мере, одного полиморфизма между устойчивыми и чувствительными последовательностями, то есть, между последовательностями молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением и последовательностями аллельного варианта молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, что описано выше, с использованием молекулярных маркеров, которые обнаруживают, по меньшей мере, один полиморфизм. Как уже было описано выше, специалисту в данной области техники очевидно, что существуют многочисленные чувствительные последовательности, то есть, многочисленные последовательности, которые кодируют аллельный вариант молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Одна из них представлена в качестве примера при сравнении последовательности с нуклеотидной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением на Фигуре 1. Предпочтительный вариант осуществления способа в соответствии с настоящим изобретением, следовательно, включает обнаружение, по меньшей мере, одного полиморфизма, который представлен на Фигуре 1 с использованием молекулярных маркеров, которые обнаруживают полиморфизмы - в частности, диагностические полиморфизмы. Это 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 должны быть применены для обнаружения соответствующего полиморфизма, и как конструируют молекулярные маркеры для этого (см. Достижения в области семеноводства и технологии, том I, Ванангамуди и соавт., 2008). Кроме того, настоящее изобретение охватывает молекулярные маркеры, которые описывают или обнаруживают полиморфизм в соответствии с Фигурой 1, такие как использование молекулярного маркера для обнаружения полиморфизма в соответствии с Фигурой 1. Таким образом, также возможно использовать маркеры, которые не различают различные полиморфизмы, при условии, что маркеры способны обнаруживать такой полиморфизм, когда он встречается в молекуле нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, но не содержит чувствительного аллельного варианта.

Альтернативно или дополнительно, способ идентификации в соответствии с настоящим изобретением включает этап обнаружения, по меньшей мере, одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением или в ее косегрегирующих областях. Предпочтительно, косегрегирующая область представляет собой геномную область в *Beta vulgaris*, которая косегрегируется с устойчивостью к Церкоспоре, придаваемой полипептидом в соответствии с настоящим изобретением, или с молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, более предпочтительно, косегрегирующая область содержит и фланкирована маркерами *sxh0678s01* и *s4p0264s01*, маркерами *s4p4301s01* и *s4p2271s01*, маркерами *s4p4301s01* и *s4p4293s01* или маркерами *s4p4301s01* и *s4p4295s01*. Таким образом, обнаружение может осуществляться посредством этапа способа, на котором, по меньшей мере, один маркер или, по меньшей мере, одна пара праймеров связывается в локусе в соответствии с SEQ ID No. 74 или 75 - предпочтительно, в локусе в соответствии с SEQ ID No. 76 или 77 - и, необязательно, в результате этого генерируется сигнал, например, сигнал флуоресценции или амплификат последовательности. Таким образом, альтернативно или дополнительно косегрегирующая область может содержать последовательность в соответствии с SEQ ID No. 74 и/или 75, или SEQ ID No. 76 и/или 77. Кроме того, предыдущие способы идентификации также представляют собой способы отбора растения, которое проявляет устойчивость к Церкоспоре в соответствии с настоящим изобретением. Способ отбора включает заключительный этап отбора устойчивого растения.

В этом контексте, настоящее изобретение также включает разработку или получение молекулярных маркеров, которые подходят для обнаружения вышеупомянутых

полиморфизмов между молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением (устойчивый аллель) и чувствительным аллельным вариантом, при этом, маркеры предпочтительно подходят для обнаружения полиморфизмов, представленных на Фигуре 1, или конструирование гибридизационных зондов, которые специфически связываются с нуклеотидной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, или получение пары молекул нуклеиновой кислоты, которые подходят для амплификации в ПЦР, области, специфичной для молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, и таким образом, для обнаружения их в растении или растительной клетке.

Настоящее изобретение предпочтительно включает способ получения олигонуклеотидов 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, особенно предпочтительно, по меньшей мере, 100, 200, 300, 500 или 1000 нуклеотидов, которые специфически гибридизируются с нуклеотидной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением или молекулой нуклеиновой кислоты, которая комплементарна ей, или с парой молекул нуклеиновой кислоты - предпочтительно в форме олигонуклеотидов - которая подходит для присоединения в качестве прямого и обратного праймера для области, которая специфична для молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, и для ее амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР), или которая подходит для гибридизации в качестве прямого и обратного праймера для области в геноме *Beta vulgaris*, которая, in *Beta vulgaris* имеет косегрегацию с устойчивостью к Церкоспоре, придаваемой полипептидом в соответствии с настоящим изобретением или молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Пример подходящих праймеров для обнаружения нуклеотидной последовательности, опосредующей устойчивость в соответствии с настоящим изобретением, приведен посредством SEQ ID NO. 98 и SEQ ID NO. 99. Эти две последовательности образуют пару праймеров, которые могут быть использованы в ПЦР. Настоящее изобретение также включает набор, содержащий олигонуклеотиды или молекулярные маркеры в соответствии с настоящим изобретением.

Способ получения олигонуклеотидов первоначально включает: сравнение нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением с нуклеотидной последовательностью соответствующей молекулы нуклеиновой кислоты, которая не придает устойчивости, или чувствительного аллельного

варианта, который предпочтительно имеет нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID No. 4 или 5; идентификацию различий последовательностей между двумя нуклеотидными последовательностями; и генерацию молекул нуклеиновой кислоты – в данном случае имеются в виду олигонуклеотиды – которые специфически связываются с молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, но не с молекулой нуклеиновой кислоты, которая не опосредует устойчивость.

Кроме того, олигонуклеотид в соответствии с настоящим изобретением может быть соединен с флуоресцентным красителем для генерирования сигнала флуоресценции, например, при возбуждении светом соответствующей длины волны. Флуоресцентным красителем может быть флуорохром. Олигонуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением могут быть соединены с другими соединениями, которые подходят для генерации сигнала. Такие олигонуклеотиды не встречаются в природе и также не могут быть выделены из природы. Для получения таких меченых олигонуклеотидов выполняется следующее: ДНК может быть помечена биоортогонально. Для этого ДНК может быть помечена *in vivo* или *in vitro* аналогами нуклеозидов, которые, например, впоследствии могут быть соединены с флуорофором в результате реакции Штаудингера. В дополнение к этому, ДНК также может быть предложено химическим путем посредством флуорофоров. Олигонуклеотиды могут быть помечены с помощью синтеза фосфорамидита с флуорофорами, которые, например, используются в QPCR (количественная ПЦР), секвенировании ДНК и гибридизации *in situ*. Кроме того, ДНК может быть сгенерирована ферментативно в ходе полимеразной цепной реакции с флуоресцентными нуклеотидами или помечена лигазой, или терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой. ДНК также может быть обнаружена косвенно с помощью биотинилирования и флуоресцентного авидина. Для соединений, в качестве флуорофоров, помимо прочего, используются флуоресцеин, флуоресцентные лантаниды, наночастицы золота, углеродные нанотрубки или квантовые точки. Одним из наиболее часто используемых флуоресцентных веществ является FAM (карбоксифлуоресцеин). Следовательно, настоящее изобретение охватывает олигонуклеотиды и, в частности, праймеры, которые обладают FAM-маркированием. FAM предпочтительно присутствует в виде 6-FAM, при этом – в зависимости от желаемой длины волны излучения и возбуждения – могут, однако, также 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

остава. Среди них, среди прочего, аминок-dT, азид-dT, 2-аминопурин, 5-Br-dC, 2'-дезоксидеозин (INO), 3'-дезоксидеозин, 5-Met-dC, 5-OH-Met-dC, 6-Met-dA и другие.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к маркерному чипу ("ДНК-чип", "количественный анализ" или микрочип), который содержит, по меньшей мере, один олигонуклеотид в соответствии с настоящим изобретением, который подходит для обнаружения. Маркерный чип подходит для применения, по меньшей мере, в одном способе обнаружения в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также включает способ получения белка в соответствии с настоящим изобретением. Способ включает предложение или культивирование клеточной культуры, которая содержит SEQ ID No. 2, и последующую экспрессию белка, кодируемого SEQ ID No. 2.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к устойчивому к Церкоспоре растению или его части, которые были идентифицированы и, если применимо, отобраны с помощью способа, описанного выше. В частности, настоящее изобретение относится к популяции растений, содержащей растения, которые доступны в соответствии с одним из способов в соответствии с настоящим изобретением, как описано выше, и которые предпочтительно устойчивы к заболеванию пятнистостью листьев, вызываемому *Церкоспорой*, или к заражению Церкоспорой, и характеризуются присутствием молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. 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, в сельском хозяйстве, предпочтительно, по меньшей мере, 1000 - растений. Доля растений в популяции, которые не несут молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением и/или восприимчивы к заболеванию пятнистостью листьев, вызываемому Церкоспорой, предпочтительно составляет ниже 25% - предпочтительно ниже 20%, более предпочтительно ниже 15%, еще более предпочтительно 10%, и, в частности, предпочтительно ниже 5%, если она вообще присутствует.

С помощью тонкого картирования, описанного выше, положение гена, придающего устойчивость к Церкоспоре в геноме *Beta vulgaris* subsp. *maritima* можно было бы определить, а также идентифицировать сам ген и окружающие области последовательности. Это, в свою очередь, представляет собой основу для разработки

гибридизационных зондов ДНК или генетических маркеров в целевой области, с помощью которых можно было бы обнаружить ген, опосредующий устойчивость к Церкоспоре, или отличить его от гена, который не придает устойчивости.

Гибридизационные зонды ДНК могут быть получены из последовательности гена, придающего устойчивость к Церкоспоре, и использоваться для скрининга геномного банка и/или банка кДНК желаемого организма. Зонды могут быть использованы для амплификации идентифицированных гомологичных генов с помощью известного процесса полимеразной цепной реакции (ПЦР) и для проверки того, присутствует ли ген, придающий устойчивость к Церкоспоре, эндогенно в организме или был успешно введен в качестве гетерологичного генетического элемента.

Специалист в данной области техники может в данной ситуации прибегнуть к обычным методам гибридизации, клонирования и секвенирования, которые, например, перечислены в работе Сэмбрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001. Специалист в данной области техники может также синтезировать и использовать олигонуклеотидные праймеры для амплификации последовательностей гена, придающего устойчивость к Церкоспоре. Для достижения специфической гибридизации, такие зонды должны быть специфичными и иметь длину, по меньшей мере, 15 нуклеотидов - предпочтительно, по меньшей мере, 20 нуклеотидов. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в работе Тийссена "Лабораторные методы в биохимии и молекулярной биологии - гибридизация с зондами нуклеиновых кислот", часть 1, глава 2, "Обзор принципов гибридизации и стратегии количественных анализов зондов нуклеиновых кислот". Elsevier, Нью-Йорк (1993); и в публикации "Текущие протоколы в молекулярной биологии", главе 2, Осубель *и соавт.*, ред., Greene Publishing и Wiley Interscience, Нью-Йорк (1995).

Следовательно, молекула нуклеиновой кислоты 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, особенно предпочтительно, по меньшей мере, 100, 200, 300, 500 или 1000 - нуклеотидов, является объектом настоящего изобретения, при этом, эта молекула нуклеиновой кислоты специфически гибридизируется с ранее описанной нуклеотидной последовательностью в соответствии с настоящим изобретением, которая содержит ген, придающий устойчивость к Церкоспоре. Она также явно охватывает диапазон от 21 до 50 нуклеотидов.

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

В частности, настоящее изобретение охватывает пару молекул нуклеиновой кислоты - предпочтительно, в форме олигонуклеотидов или набора, содержащего эту пару олигонуклеотидов - которая подходит для гибридизации в качестве прямого и обратного праймера для области, которая специфична для молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, и для ее амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР), или которая подходит в качестве прямого и обратного праймера для гибридизации для области в геноме *Beta vulgaris*, который в *Beta vulgaris* проявляет косегрегацию с устойчивостью к Церкоспоре, придаваемой полипептидом в соответствии с настоящим изобретением, или с молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением.

Следующие преимущества для селекции и разработки новых устойчивых линий растений рода *Beta* также могут быть достигнуты посредством настоящего изобретения. Информация о последовательностях, а также об идентифицированных полиморфизмах, которые позволяют дифференцировать между устойчивыми и восприимчивыми аллелями раскрытого гена, то есть, между аллелями, которые придают устойчивость к Церкоспоре, и аллелями, которые не способны придавать эту устойчивость, делает возможным разработку маркера непосредственно в гене, как описано выше, а также в областях, расположенных выше и ниже, что представляет собой важное облегчение для селекционера - в частности, в отношении разработки оптимизированных элитных линий без "сцепленного груза". Более того, знания о структуре последовательностей могут быть использованы для идентификации дополнительных генов устойчивости - в частности, к Церкоспоре - которые являются гомологичными или ортологичными, например.

Следовательно, настоящее изобретение также охватывает способ идентификации дополнительных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептиды, или дополнительных белков, которые способны придавать устойчивость к Церкоспоре в растении, в котором экспрессируется полипептид. Специалист в данной области техники может, таким образом, использовать базы данных, используя 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 сам получить дополнительные последовательности ДНК, кодирующие белки устойчивости к Церкоспоре, и использовать их в рамках настоящего изобретения. Например, подходящие гибридизационные зонды могут быть получены из последовательности молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением и использоваться для скрининга геномного банка и/или банка кДНК желаемого организма. Специалист в данной области техники может в данной ситуации прибегнуть к обычным методам гибридизации, клонирования и секвенирования, которые, например, перечислены в работе Сэмбрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001. Используя известные последовательности, специалист в данной области техники может также синтезировать и использовать олигонуклеотидные праймеры для амплификации последовательностей молекул нуклеиновой кислоты, придающих устойчивость к Церкоспоре.

Таким образом, в одном варианте осуществления, настоящее изобретение охватывает способ идентификации молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, способный придавать устойчивость к Церкоспоре у растения вида *Beta vulgaris*, в котором экспрессируется полипептид. Таким образом, способ включает сравнение аминокислотной последовательности полипептида в соответствии с настоящим изобретением, который в *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, придает устойчивость к Церкоспоре аминокислотными последовательностями из базы данных последовательностей или последовательностями аллельных вариантов полипептида в соответствии с настоящим изобретением в генотипах вида *Beta vulgaris*. Кроме того, способ в соответствии с настоящим изобретением включает идентификацию аминокислотной последовательности или аллельного варианта, который, по меньшей мере, на 80% идентичен аминокислотной последовательности полипептида в соответствии с настоящим изобретением, а также введение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей идентифицированную аминокислотную последовательность, или аллельного варианта в растении вида *Beta vulgaris*; экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в растении; и, необязательно, последующую верификацию устойчивости к Церкоспоре.

Как описано ранее, дополнительные белки, придающие устойчивость к Церкоспоре, или их кодирующие гены, то есть, гомологи, аналоги и ортологи, которые идентичны, по меньшей

мере, на 70% - предпочтительно, по меньшей мере, на 80%, особенно предпочтительно, по меньшей мере, на 90%, особенно предпочтительно, по меньшей мере, на 95% или даже на 98% - аминокислотной последовательности полипептида, которая кодируется молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, могут быть идентифицированы посредством классических биоинформационных подходов (поиски в базе данных и компьютерные программы для скрининга гомологичных последовательностей).

Термин "гомолог (гомологи)", таким образом, означает, что рассматриваемые гены (из двух разных видов растений) имеют по существу одну и ту же функцию, и общего предка и, следовательно, обычно демонстрируют существенную идентичность в своей нуклеиновой кислоте или кодированных аминокислотных последовательностях. Однако существует также много генов, которые гомологичны друг другу, без белковых последовательностей, приводящих к значимому парному выравниванию. В отличие от этого, термин "аналог (аналоги)" описывает гены или белки, которые (аналогичным образом) имеют идентичную или сходную функцию, но не созданы из одной и той же структуры, то есть, не имеют общего предка. В этом случае, зачастую не удается установить никакой существенной идентичности в их нуклеиновой кислоте или кодируемой аминокислотной последовательности, или, в лучшем случае, в конкретных функциональных доменах.

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

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

Как описано выше, раскрытое в данном документе использование аллеля гена устойчивости в цис- или трансгенных подходах открывает возможность получения новых устойчивых видов рода Beta, которые, используя эффект дозы, проявляют более высокую

устойчивость, или у которых можно избежать разрыва устойчивости и выработать устойчивость, оптимизированную посредством пирамидирования раскрытого гена с другими генами устойчивости. Также возможны модификации гена посредством обработки или целенаправленной инженерии для оптимизации отбора кодонов для увеличения экспрессии или для развития новых, или модифицированных аллелей устойчивости. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, кодон-оптимизированные последовательности или модифицированные устойчивые аллели не встречаются в природе, а являются искусственными. Примером модифицированной геномной последовательности является последовательность, предложенная SEQ ID No. 94, в которой кодон в положении 16-18 модифицирован, но кодируемая аминокислотная последовательность неизменна и соответствует SEQ ID No. 3. Примером модифицированной последовательности кДНК является последовательность, предложенная SEQ ID No. 95, в которой кодон в положении 55-57 модифицирован, но кодируемая аминокислотная последовательность неизменна и соответствует SEQ ID No. 3. SEQ ID No. 94 и SEQ ID No. 95 также являются примерами гибридизирующихся последовательностей. Примером модифицированного аллеля, придающего устойчивость, является аминокислотная последовательность в соответствии с SEQ ID No. 96, в которой аминокислота валин была заменена аминокислотой лейцин в положении 209. Аминокислотная последовательность в соответствии с SEQ ID No. 96 кодируется модифицированной кДНК в соответствии с SEQ ID No. 97. Эти последовательности не встречаются в природе, а являются искусственными. При замене аминокислот, например, в последовательности, опосредующей устойчивость, в соответствии с SEQ ID No. 3, рекомендуется заменить аминокислоты в следующих группах:

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

Настоящее изобретение также относится к использованию в растении идентифицированного аллеля гена, придающего устойчивость к Церкоспоре, в генетическом или молекулярном пирамидировании с другими генетическими элементами, которые могут придавать агрономически выгодные свойства. Таким образом, экономическая ценность культивируемых растений может быть заметно повышена, поскольку, например, показатели

урожайности повышаются по сравнению с растениями, которые обладают той же генетикой, но не были снабжены нуклеиновой кислотой в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, могут быть открыты новые посевные площади для растения, которые ранее были недоступны для культивирования этого растения в силу биотических факторов, таких как сильное давление патогенов. В частности, настоящее изобретение относится к использованию идентифицированного аллеля гена, придающего устойчивость к Церкоспоре, в способах борьбы с заражением патогеном *Cercospora beticola* при сельскохозяйственном или садоводческом культивировании растений рода *Beta*, например, и охватывает идентификацию и отбор растений рода *Beta* с помощью одного из способов, описанных ранее, и/или культивирование выбранных таким образом растений или их потомков. Таким образом, настоящее изобретение включает способ культивирования растений вида *Beta vulgaris*, включая, на первом этапе, предложение устойчивых к Церкоспоре растений вида *Beta vulgaris* в соответствии с настоящим изобретением или получение растений вида *Beta vulgaris* с помощью способа получения в соответствии с настоящим изобретением, или идентификацию и отбор растений вида *Beta vulgaris* с помощью способа идентификации в соответствии с настоящим изобретением, который был описан ранее; и включая, на втором этапе, культивирование растений первого этапа, или размещение семенного материала от растения первого этапа или выращивание растений первого этапа. Таким образом, способ культивирования противодействует заражению Церкоспорой культивируемых растений. Способ культивирования может быть частью способа производства сахара. Способ производства сахара включает этапы способа культивирования и дополнительно, в качестве предпоследнего этапа, сбор урожая культивируемых растений и, в качестве последнего этапа, извлечение сахара из вышеупомянутых растений. Способы идентификации или обнаружения, маркер и олигонуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть, например, использованы на семенах, хранящихся в NCIMB, Абердин, Великобритания под номером доступа NCIMB 43646, или могут быть использованы на растении, полученном из хранящихся семян. Кроме того, они могут быть использованы а) на растении, которое является потомком хранящихся семян, или б) на растении, в которое был перенесен ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением одним из способов, описанных в данном документе (например, трансформация и так далее), или с) для дискриминации растения, которое содержит ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением и растения, лишенного гена устойчивости по настоящему изобретению.

Способ культивирования может быть частью способа производства семенного материала. Способ производства семенного материала включает этапы способа культивирования и

дополнительно, в качестве предпоследнего этапа, яровизацию культивируемых растений и, в качестве последнего этапа, извлечение семян из вышеупомянутых растений.

Извлеченные семена необязательно могут быть гранулированы, чтобы получить гранулированный семенной материал вида *Beta vulgaris*. В данном случае, речь идет о способе производства гранулированного семенного материала.

Более того, способ производства семенного материала может быть разработан как способ производства семенного материала, устойчивого к Церкоспоре. Способ производства семенного материала, устойчивого к Церкоспоре, включает этапы описанного выше способа производства семенного материала и дополнительно, в качестве последнего этапа, верификацию нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением в соответствии с описанным в данном документе способом, по меньшей мере, в одном из извлеченных семян - предпочтительно, по меньшей мере, в 0,1% или, по меньшей мере, в 1% извлеченных семян. Верификация особенно предпочтительно осуществляется таким образом, что семя сохраняет способность к проращиванию. Это означает, что извлечение ДНК, необходимое для верификации, из семени не нейтрализует способность семени к проращиванию. В этом случае, верификация нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, возможно, проходила в отношении особенно большой пропорции всех извлеченных семян. Например, верификация может проводиться, по меньшей мере, с 2% - предпочтительно, по меньшей мере, с 3%, особенно предпочтительно, по меньшей мере, с 4% - всех извлеченных семян.

Растения в соответствии с настоящим изобретением, их клетки или семена, или семенной материал в соответствии с настоящим изобретением могут обладать дополнительными, агрономически выгодными свойствами или могут быть снабжены таковыми. Одним примером является толерантность или устойчивость к гербицидам, таким как глифосат, глюфосинат или ингибиторы ALS. Предпочтительна устойчивость к глифосату или гербициду-ингибитору ALS. Конкретный вариант осуществления устойчивости к глифосату раскрыт в работе US 7,335,816 B2. Такая устойчивость к глифосату, например, доступна от семенного материала, хранящегося в NCIMB, Абердин (Шотландия, Великобритания), 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.

В контексте устойчивости к глифосату, настоящее изобретение, таким образом, также охватывает растения, их клетки или семена, или семенной материал, характеризующиеся тем, что они содержат нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением, и, кроме того, тем, что

а) фрагмент ДНК геномной ДНК растения, его частей или семян может быть амплифицирован посредством полимеразной цепной реакции первым праймером, который имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No. 81, и вторым праймером, который имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No. 82, при этом, фрагмент ДНК идентичен, по меньшей мере, на 95% - предпочтительно, на 100% - нуклеотидной последовательности SEQ ID No. 83, и/или

б) фрагмент ДНК геномной ДНК растения, его частей или семян может быть амплифицирован посредством полимеразной цепной реакции первым праймером, который имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No. 84, и вторым праймером, который имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No. 85, при этом, фрагмент ДНК, по меньшей мере, на 95% идентичен - предпочтительно, на 100% идентичен - нуклеотидной последовательности SEQ ID No. 86, и/или

с) фрагмент ДНК геномной ДНК растения, его частей или семян может быть амплифицирован посредством полимеразной цепной реакции первым праймером, который имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No. 87, и вторым праймером, который имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No. 88, при этом, фрагмент ДНК, по меньшей мере, на 95% идентичен - предпочтительно, на 100% - нуклеотидной последовательности SEQ ID No. 89.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, ерсп-синтаза *Beta vulgaris* дикого типа имеет аминокислотную последовательность, как указано в эталонной последовательности NCBI XP_010692222.1. Эта ерсп-синтаза дикого типа может быть мутированной или модифицированной (например, одним из способов мутации или модификации, как описано в данном документе) для придания устойчивости к глифосату. Такая мутация может создавать эндогенный аллель, кодирующий ерсп-синтазу, имеющую в положении 179 аминокислоту, отличную от пролина. Предпочтительно аминокислотой, отличной от пролина, является серин. Данный документ охватывает растения, содержащие мутированную ерсп-синтазу и ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением. Он включает растения, содержащие ген устойчивости по настоящему изобретению и, кроме того, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую ерсп-синтазу, имеющую в положении

179 аминокислоту, отличную от пролина, и содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из

i) последовательности SEQ ID NO: 223

ii) последовательности i), имеющей в положении 179 аминокислоту, отличную от серина и пролина, или

iii) последовательности, имеющей идентичность, по меньшей мере, 90%, более предпочтительно 95%, наиболее предпочтительно 99% с последовательностью из пунктов i) или ii)

по всей длине последовательности.

В этом контексте, мутированная EPSP-синтаза может, например, кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID No. 224.

Дополнительные технические подробности об использовании мутированной EPSP-синтазы могут быть получены из работы WO2020064687 (A1). Растение, содержащее ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением и экспрессию мутированной EPSP-синтазы, может дополнительно содержать устойчивость, по меньшей мере, к одному гербициду-ингибитору ALS, как описано в данном документе. Растение, содержащее ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением и экспрессию мутированной EPSP-синтазы, может быть нетрансгенным растением.

Мутированная EPSP-синтаза, в контексте данного изобретения, представляет собой искусственное соединение, которое не встречается в природе. В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения, растение, содержащее мутированную EPSP-синтазу и ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением, не является продуктом по существу биологического процесса.

Конкретный вариант осуществления устойчивости к гербицидам-ингибиторам ALS раскрыт в документе WO2012/049268 A1. Например, такая устойчивость к гербициду-ингибитору ALS доступна в хранилище NCIMB, Абердин, Великобритания, под номером NCIMB 41705. Кроме того, такая устойчивость к ALS-ингибитору может быть получена путем обработки или сайт-направленного мутагенеза, например, путем редактирования генов, например, посредством использования CRISPR/Cas, CRISPR/Cpf1, TALENS или цинковых пальцевых нуклеаз. Таким образом, настоящее изобретение также охватывает растения, их клетки или семена, или семенной материал, характеризующееся тем, что они содержат нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением, и, кроме того, тем, что они демонстрируют мутацию в эндогенном гене ацетолактатсинтазы, при этом, ген ацетолактатсинтазы кодирует белок ацетолактатсинтазы, который в результате мутация в

положении 569 содержит аминокислоту, отличную от триптофана. В результате мутации, аминокислота в положении 569 предпочтительно представляет собой аланин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, валин или аргинин. Положение 569 предпочтительно определяется посредством положения 569 SEQ ID No. 90. Кроме того, предпочтительной является специфическая последовательность мутированного гена ацетолактатсинтазы SEQ ID No. 91. Мутированная последовательность гена ацетолактатсинтазы или последовательность в соответствии с SEQ ID No. 91, не встречается в природе и не может быть выделена из природы. 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 проявлению устойчивости.

Специалисту в данной области техники из предшествующего уровня техники известны многочисленные дополнительные гербициды и их применимость. Он может прибегнуть к предшествующему уровню техники, чтобы получить знания о том, какие генетические элементы следует использовать каким-либо образом, чтобы обеспечить соответствующую толерантность у растений.

Более того, устойчивость к гербицидам имеет синергический эффект, заключающийся в снижении появления сорняков за счет использования гербицидов. Это является преимуществом при борьбе с Церкоспорой, поскольку известно, что конидии (бесполое споры) или псевдострома (мицелий) *Cercospora beticola* могут выживать на растительном материале до 2 лет.

Другим 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 сочетания различной устойчивости/толерантности к патогенам, поскольку генетические элементы могут проявлять аддитивные эффекты по отношению друг к другу. Например, специалисту в данной области техники известны многочисленные гены устойчивости к патогену как генетические элементы. Например, в работе US20160152999A1 раскрыт ген устойчивости RZ к заболеванию ризоманией. Это заболевание вызывается возбудителем "Вирусом некротического пожелтения жилок свеклы". Несколько средств защиты от болезней, содержащиеся в одном растении,

оказывают синергическое воздействие друг на друга. Если растение впервые заражено патогеном, его иммунная система обычно ослаблена, и эпидермис, как внешний барьер, зачастую повреждается, так что вероятность дальнейшего заражения увеличивается. Дополнительным примером агрономически выгодного свойства является холодостойкость 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 повышению урожайности. В данном документе, специалист в данной области техники может также прибегнуть 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 многочисленные модификации для защиты от патогенов. В дополнение к семействам R-генов, которые часто описываются, подход *Avr/R*, генетическая комплементация *Avr* (WO 2013/127379), самоактивация R-гена (WO 2006/128444) или подход HIGS (индуцированный хозяином сайленсинг генов) (например, WO2013/050024) могут быть выгодно использованы. В частности, самоактивация R-гена может быть важна для настоящего изобретения. Для этого необходимо создать нуклеиновую кислоту, которая кодирует самоактивированный белок устойчивости для генерирования устойчивости к патогенам у растений. Далее эта нуклеиновая кислота содержит только ограниченную часть гена устойчивости NBS-LRR, такую как *wb*-R-ген, который простирается вниз от 5'-конца кодирующей области гена устойчивости NBS-LRR до начала кодирования домена NBS гена устойчивости NBS-LRR.

В этом контексте, также охвачен способ, который содержит этап удаления той области нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, которая кодирует N-концевую область, и которая начинается с р-петли в домене NBS и простирается до конца N-концевой области.

Белки устойчивости, которые кодируются такими укороченными нуклеиновыми кислотами, обычно являются самоактивированными, в том смысле, что эти белки устойчивости запускают иммунную реакцию в растении, даже в отсутствие ассоциированного патогена, и, таким образом, повышают базовый иммунитет растения.

Кроме того, такая укороченная нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением и полипептид, который кодируется этим, охвачены.

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

В дополнение к тому, что настоящее изобретение относится к растению в соответствии с настоящим изобретением, настоящее изобретение также относится к семенам или потомкам, или к органу, части растения, ткани или к его клетке в производстве продуктов, которые обычно производятся из экологически чистого сырья, таких как пищевые продукты и корма для животных - предпочтительно, сахар или сироп (меласса), при этом, меласса также используется для промышленного применения, например, в производстве алкоголя, или в качестве питательной среды для производства биотехнологических продуктов, в производстве материалов или субстанций для химической промышленности, например, очищенных химикатов, фармацевтических препаратов или их предшественников, средств диагностики, косметики, биоэтанола или биогаза. Пример использования сахарной свеклы в качестве биогенного сырья на биогазовых заводах описан в заявке DE 10 2012 022 178 A1; см., например, пункт 10.

Следующие примеры объясняют настоящее изобретение, но без ограничения объекта изобретения. Если не указано иное, использовались стандартные методы молекулярной биологии; см., например, Сэмбрук *и соавт.*, Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, 3-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001, Фрич *и соавт.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989; Майер *и соавт.*, Иммунохимические методы в клеточной и молекулярной биологии, ред., Academic Press, Лондон, 1987, и Вейр *и соавт.*, Справочник по экспериментальной иммунологии, тома I-IV, Blackwell, ред., 1986.

Некоторые из наиболее важных последовательностей в соответствии с настоящим изобретением подробно объясняются следующим образом:

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

- SEQ ID No. 2: последовательность кДНК гена, придающего устойчивость к Церкоспоре, поскольку она не встречается в природе.
- SEQ ID No. 3: аминокислотная последовательность белка, придающего устойчивость к Церкоспоре, поскольку она кодируется SEQ ID № 1 или SEQ ID No. 2.
- SEQ ID No. 4: последовательность геномной ДНК чувствительного варианта гена, придающего устойчивость к Церкоспоре.
- SEQ ID No. 5: кДНК чувствительного варианта гена, придающего устойчивость к Церкоспоре.
- SEQ ID No. 6: аминокислотная последовательность чувствительного варианта гена, придающего устойчивость к Церкоспоре.
- SEQ ID No. 7: нативный промотор гена, придающего устойчивость к Церкоспоре, из *Beta vulgaris subsp. maritima*.
- SEQ ID No. 8: нативный терминатор гена, придающего устойчивость к Церкоспоре, из *Beta vulgaris subsp. maritima*.
- SEQ ID No. 53: последовательность локуса из *Beta vulgaris subsp. maritima*, содержащая ген, придающий устойчивость к Церкоспоре, в соответствии SEQ ID No. 1.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Введение гена, придающего устойчивость, посредством CRISPR-опосредованной гомологичной рекомбинации в *Betavulgaris subsp. vulgaris*

Конструкция и выбор крРНК:

Подходящие крРНК для Cpf1-опосредованной индукции двухцепочечных разрывов были сконструированы с помощью инструментов CRISPR RGEN (Парк Дж., Бэй С. и Ким Дж.-С. Cas-Designer: веб-инструмент для выбора сайтов-мишеней CRISPR-Cas9. *Bioinformatics* 31, 4014-4016 (2015); Бэй С., Парк Дж. и Ким Дж.-С. Cas-OFFinder: быстрый и универсальный алгоритм, который ищет потенциальные нецелевые сайты РНК-направляемых эндонуклеаз Cas9. *Bioinformatics* 30, 1473-1475 (2014)). Для этого были найдены подходящие протоспейсеры в последовательностях геномной ДНК, имеющих длину 500-1300 п.о., которые фланкируют 5'- и 3'-конец гена устойчивости к Церкоспоре из *Beta vulgaris subsp. maritima*. Для обеспечения функциональности эндонуклеазы Cpf1 из *Lachnospiraceae bacterium* ND2006 (Lb) были отобраны протоспейсеры длиной 24 nt (нуклеотидов), геномная связывающая последовательность которых на 5'-конце была фланкирована необходимым мотивом, смежным с протоспейсером (PAM), имеющим

последовательность 5'-TTTV-3' (V=G или C, или A). Подходящие протоспейсеры были отобраны в соответствии с заранее определенными критериями качества инструмента и согласованы в отношении потенциальных нецелевых объектов с эталонным геномом *B. vulgaris* subsp. *vulgaris*. Для продолжения испытаний, были отобраны исключительно крРНК, которые, в дополнение к фактической последовательности-мишени, содержат не более 15 идентичных оснований с функциональным РАМ. Поскольку первые 18 nt протоспейсера необходимы для обнаружения и вырезания последовательности-мишени, таким образом можно было бы предотвратить нежелательное вырезание в других геномных последовательностях (Тан, Х., Л. Г. Лоудер, Т. Чжан, А. А. Мальцан, Х. Чжэн, Д. Ф. Войтас, З. Чжонг, Ю. Чен, К. Рен, К. Ли, Э. Р. Киркленд, Ю. Чжан и Ю. Ци (2017), "Система CRISPR-Cpf1 для эффективного редактирования генома и транскрипционной репрессии в растениях". *Nat Plants* 3: 17018). Таким образом, можно было идентифицировать четыре потенциальные крРНК в 5'-фланкирующей области (5'крРНК №1-4) и три крРНК в 3'-фланкирующей области (3'крРНК №1-3) гена устойчивости (см. таблицу А).

Таблица А: Выбранные последовательности-мишени в пределах 5'- и 3'-фланкирующих последовательностях ДНК гена устойчивости в *B. vulgaris*. РАМ (мотив, смежный с протоспейсером) подчеркнут.

Название крРНК	Геномная последовательность-мишень с 5'-фланкирующим РАМ (подчеркнуто)	Связывание на +/- цепи
5'крРНК № 1	<u>TTT</u> ATTTTCGATTTTCGATTCTTGGATTAT (SEQ ID No. 16)	-
5'крРНК № 2	<u>TTT</u> CAACCCAGTATCCTTATCCGTCACCT (SEQ ID No. 17)	-
5'крРНК № 3	<u>TTT</u> ATTTAAACATGATACGTATCATATT (SEQ ID No. 18)	+
5'крРНК № 4	<u>TTT</u> AAACATGATACGTATCATATTGAGT (SEQ ID No. 19)	+
3'крРНК № 1	<u>TTT</u> GTGGGTGGGTGGTTTTTCACGTGTGT (SEQ ID No. 20)	-
3'крРНК № 2	<u>TTT</u> CCCTCCCTTTGCCGCTGCGAAGTT (SEQ ID No. 21)	-
3'крРНК № 3	<u>TTT</u> CTTCTTCTTGCTTCCACCATAACAC (SEQ ID No. 22)	-

Клонирование генетических элементов: Для клонирования кассеты экспрессии *cpfl* и кассеты экспрессии крРНК сначала из вектора-мишени pZFNnptII путем введения точечной мутации (от Т до G) была удалена последовательность обнаружения фермента рестрикции BbsI, который предотвращает клонирование. Мутагенез проводили с помощью набора для мутагенеза в соответствии со спецификацией производителя, используя два мутагенезных праймера (см. Таблицу В).

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

Название	Последовательность 5' → 3'
Мутагенезный праймер 1	TCAGTGCAGCCGTCG <u>T</u> CTGAAAACGACA (SEQ ID No. 23)
Мутагенезный праймер 2	TGTCGTTTTCAGAC <u>G</u> ACGGCTGCACTGA (SEQ ID No. 24)

Для экспрессии гена *Lbcpl* в *B. vulgaris*, последовательность ДНК, кодон-оптимизированная для *A. thaliana*, с 5'-фланкирующей промоторной последовательностью PcUbi из *Petroselinum crispum* (SEQ ID No. 79) и 3'-фланкирующей терминаторной последовательностью 3A из *Pea sp.* в качестве фрагмента ДНК, была получена синтетическим путем. Интерфейс рестрикции (HindIII), который имеет отношение к клонированию в *Lbcpl*-кодирующей последовательности (CDS) [SEQ ID No. 78], был удален путем введения молчащей мутации (обмен оснований без модификации аминокислотной последовательности), чтобы избежать непреднамеренного вырезания в кодирующей области. Оптимизация кодона была выполнена с помощью алгоритма GeneArt от Invitrogene/ThermoScientific. Чтобы обеспечить транспорт Cpfl в ядро клетки, кодирующая последовательность клеточного сигнала внутриядерной локализации (NLS) SV40 была интегрирована в *cpfl* CDS на 5'-конце, а NLS нуклеоплазмина был интегрирован на 3'-конце. Для лигирования в бинарном векторе-мишени pZFNnptII (Фигура 2), кассету экспрессии фланкировали двумя интерфейсами рестрикции HindIII и впоследствии лигировали до pZFNnptII_LbCpfl. Успешная вставка кассеты экспрессии PcUbi::Cpfl::TPea была верифицирована с помощью секвенирования, при этом, области связывания праймеров, использованных для секвенирования, были расположены как в областях фланкирующего вектора, так и внутри кассеты экспрессии (см. таблицу С).

Таблица С: Праймер, используемый для секвенирования кассеты экспрессии PcUbi::Cpf1::Tpea, интегрированной в pZFNnptII

Название	Последовательность 5'→3'
pSeq_CRBM_F1	SEQ ID No. 25
pSeq_CRBM_R1	SEQ ID No. 26
pSeq_CRBM_F2	SEQ ID No. 27
pSeq_CRBM_R2	SEQ ID No. 28
pSeq_CRBM_F3	SEQ ID No. 29
pSeq_CRBM_R3	SEQ ID No. 30
pSeq_CRBM_F4	SEQ ID No. 31
pSeq_CRBM_R4	(SEQ ID No. 32)

После транскрипции в растительную клетку крРНК должна быть вырезана с помощью двух фланкирующих рибозимов. Для этого предшественник крРНК был фланкирован кодирующими последовательностями рибозима в виде головки молотка и рибозима HDV (вирус гепатита дельта) (Тан, Х., Л. Г. Лоудер, Т. Чжан, А. А. Мальцан, Х. Чжэн, Д. Ф. Войтас, З. Чжонг, Ю. Чен, К. Рен, К. Ли, Э. Р. Киркленд, Ю. Чжан и Ю. Ци (2017), "Система CRISPR-Cpf1 для эффективного редактирования генома и транскрипционной репрессии в растениях". Nat Plants 3: 17018).

Для идеального лигирования отдельных протоспейсеров в кодирующей последовательности повтора крРНК, две последовательности обнаружения *BbsI* были интегрированы между повтором крРНК и рибозимом HDV, при этом липкие концы ДНК, которые использовались для клонирования, были соответствующим образом адаптированы. Чтобы обеспечить идентичную силу экспрессии *cpf1* и крРНК, кассета рибозима крРНК была ограничена на 5'-конце промоторной последовательностью PcUbi, а на 3'-конце терминаторной последовательностью [последовательностями] 3A. Для последующего лигирования в векторе-мишени pZFNnptII_Cpf1, кассета экспрессии крРНК была фланкирована двумя интерфейсами *PstI* и упорядочена как фрагмент синтетической ДНК. Протоспейсеры синтезировали в виде комплементарных олигонуклеотидов и отжигали в соответствии со стандартным протоколом. Фрагмент ДНК длиной 24 п.о., который был сгенерирован таким образом, был фланкирован липкими концами ДНК длиной 4 nt, которые имеют отношение к лигированию (см. Таблицу D).

Таблица D: Последовательность олигонуклеотидов, которые были использованы для генерации коротких протоспейсеров длиной 24 п.о. Липкие концы ДНК длиной 4 нт, которые используются для лигирования, представляют собой соответствующие четыре первых нуклеотида каждой из перечисленных последовательностей.

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

Эффективность четырех крРНК была испытана с помощью опосредованного агробактериями переноса генов в листьях *B. vulgaris*. Плазмиду pZFNtDTnptII совместно трансформировали с целью проверки эффективности трансформации. Трансформация эксплантата листа происходила путем вакуумной инфильтрации в соответствии со стандартным протоколом. Флуоресценцию tDT проверяли через шесть дней с помощью флуоресцентной микроскопии, и эксплантаты листа с гетерогенной флуоресценцией отбрасывали. Через десять дней после инфильтрации эксплантаты листа быстро замораживали в жидком азоте, обрабатывали пестиком и выделяли геномную ДНК с помощью метода СТАВ (цетилтриметиламмония бромид) (Кларк, Джозеф Д., «Минипреп ДНК для выделения ДНК растений с использованием цетилтриметиламмония бромида (СТАВ)». Протоколы Колд-Спринг-Харбор 2009.3 (2009): pdb-prot5177). Эффективность отдельных крРНК определялась внешним поставщиком услуг, используя частоту вставленных редакций (например, вставок, делеций или обмена оснований) в сравнении с

неотредактированными последовательностями в геномной ДНК с помощью NGS (секвенирование нового поколения).

В качестве синтетической конструкции ДНК, наиболее эффективные крРНК - 5'крРНК №3 и 3'крРНК №1 - с ранее описанными рибозимами, промоторными и терминаторными последовательностями, были упорядочены в виде кассет экспрессии с обратной ориентацией. Вся конструкция ДНК была фланкирована двумя интерфейсами рестрикции PstI для клонирования в векторе-мишени pZFNnptII_LbCpfI. После того, как произошла вставка крРНК, *LbCpfI* и кассеты экспрессии крРНК были лигированы из вектора pZFNnptII_LbCpfI_крРНК в вектор pUbitDTnptII с помощью HindIII.

В качестве репарационной матрицы, которая должна быть интегрирована в геном *B. vulgaris* посредством гомологичной рекомбинации, кассета экспрессии гена устойчивости была фланкирована на 5'-конце с помощью 5'крРНК №3 и на 3'-конце с помощью связывающей последовательности 3'крРНК №1. Это позволило вырезать кассету экспрессии гена устойчивости из плазмиды с помощью CpfI. Вся ДНК-матрица была синтезирована в виде фрагмента синтетической ДНК длиной 87 326 п.о. (SEQ ID No. 80) и использована непосредственно в остове вектора для трансформации. Плазмиду гена устойчивости и плазмиду pUbitDTnptII_LbCpfI_крРНК вводили в каллусные культуры *B. vulgaris* с помощью генной пушки.

Эффективность трансформации определяли с использованием транзientной флуоресценции tDT, через день после трансформации, с помощью флуоресцентной микроскопии. Культуры каллуса культивировали на среде для индукции побегов без давления отбора (без канамицина), и регенерированные побеги впоследствии проверяли на сайт-направленную интеграцию кассеты гена устойчивости, придающего устойчивость. Для этого геномная ДНК была выделена с помощью СТАВ. Интеграцию гена, придающего устойчивость, амплифицировали посредством ПЦР с использованием праймеров pCRBM_F1 в соответствии с SEQ ID No. 47 и pCRBM_R1 в соответствии с SEQ ID No. 48 (см. Таблицу E), и продукты ПЦР впоследствии секвенировали с использованием обоих праймеров. Побеги, в которых таким образом можно было проверить успешную вставку кассеты экспрессии, были идентифицированы в ходе следующих анализов сайта интеграции гена устойчивости. Чтобы верифицировать вставку в желаемую последовательность-мишень в геноме, фланкирующие области кассеты экспрессии гена устойчивости были амплифицированы с помощью ПЦР. Связывание праймера в данном

случае происходило внутри последовательности ДНК гена устойчивости; связывание второго праймера происходило за пределами 5'- или 3'-фланкирующей гомологичной области вставленной кассеты экспрессии (см. Таблицу E). Амплифицированные последовательности ДНК были секвенированы с использованием одних и тех же праймеров, и таким образом была подтверждена интеграция в желаемом месте. Чтобы исключить связывание праймеров pCRBM_F1 (SEQ ID No. 47), pCRBM_R1 (SEQ ID No. 48), pCRBM_R2 (SEQ ID No. 50) и pCRBM_F3 (SEQ ID No. 51) в областях генома, сходных по последовательностям, все последовательности праймеров предварительно сравнивали с геномом *B. vulgaris*. Для праймера pCRBM_F3 (SEQ ID No. 51) было невозможно отобразить нуклеотидную последовательность таким образом, чтобы можно было исключить связывание с последовательностью дикого типа. Следовательно, 3'-фланкирующая область была амплифицирована во всех побеггах, которые были испытаны на ген устойчивости с положительным результатом, и сайт-специфичная вставка была верифицирована исключительно с помощью последующего секвенирования. Таким образом, сгенерированный продукт ПЦР отличается 18 п.о. от последовательности дикого типа. Чтобы обеспечить полное секвенирование амплифицированных последовательностей, продукты ПЦР дополнительно секвенировали с помощью третьего праймера с местоположением связывания внутри амплифицированной последовательности (pCRBM_S2, pCRBM_S3; см. Таблицу E). Чтобы исключить неспецифическое связывание праймеров pCRBM_F1 (SEQ ID No. 47), pCRBM_R1 (SEQ ID No. 48) и pCRBM_R2 (SEQ ID No. 50) в геноме дикого типа, нуклеотидные последовательности сравнивали с внутренним эталонным геномом *B. vulgaris*. Праймеры были дополнительно испытаны с помощью ПЦР на связывание с геномными последовательностями растений дикого типа *B. vulgaris*.

Чтобы исключить интеграцию гена резистентности в другие области генома, была проведена целенаправленная амплификация целевого местоположения (Целенаправленная амплификация локуса, TLA).

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

Название	Последовательность 5'→3'	Размер продукта ПЦР	Связывание
pCRBM_F1	SEQ ID No. 47	450 п.о.	в пределах кассеты экспрессии генов устойчивости
pCRBM_R1	SEQ ID No. 48		в пределах кассеты экспрессии генов устойчивости
pCRBM_F2	SEQ ID No. 49	1,140 п.о.	с верхней цепью 5' - фланкирующей гомологичной областью
pCRBM_R2	SEQ ID No. 50		в пределах промоторной последовательности генов устойчивости
pCRBM_S2	SEQ ID No. 66		
pCRBM_F3	SEQ ID No. 51	1,280	в пределах терминирующей последовательности генов устойчивости
pCRBM_R3	SEQ ID No. 52		с нижней цепью 3' - фланкирующей гомологичной областью
pCRBM_S3	SEQ ID No. 67		

В дополнение к верификации и успешному вставлению кассеты экспрессии гена устойчивости в геном *B. vulgaris* также была проверена нежелательная интеграция плазмидной ДНК. Для этого геномную ДНК, в которой верификация уже привела к успешной вставке гена устойчивости в желаемом сайте-мишени, проверяли на присутствие плазмидной ДНК с помощью ПЦР. Области последовательности в *cpfl*, кассета рибозима крРНК и *iDT*, таким образом, были амплифицированы с использованием праймеров, перечисленных в Таблице F, и впоследствии секвенированы.

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

Название	Последовательность 5'→3'	Размер продукта ПЦР	Связывание
pSeq_LbCpf1_F4	SEQ ID No. 68	214	Cpf1
pSeq_LbCpf1_R3	SEQ ID No. 69		
pSeq_Ribozyme_F	SEQ ID No. 70	172	Рибозимная кассета крРНК
pSeq_Ribozyme_R	SEQ ID No. 71		
pSeq_tDT_F	SEQ ID No. 72	400	<i>tDT</i>
pSeq_tDT_R	SEQ ID No. 73		

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

Трансгенный подход к производству растений, устойчивых к *Церкоспоре*, послужил не только для альтернативной валидации гена LRR в качестве гена, придающего устойчивость, но и как средство получения трансгенных событий устойчивости, которые придают новую устойчивость к *Церкоспоре* или улучшают уже существующую устойчивость к *Церкоспоре*.

Бинарный вектор pZFN-nptII-LRR был сгенерирован с помощью следующих стандартных процедур клонирования: в пределах Т-ДНК этого вектора была клонирована кДНК гена устойчивости в соответствии с SEQ ID NO. 2 вместе с его нативной промоторной последовательностью. Кроме того, Т-ДНК включала ген неомицинофосфотрансферазы II (*nptII*), который придает устойчивость к ряду аминокликозидных антибиотиков, таких как канамицин или паромомицин. Эти показатели устойчивости к антибиотикам были использованы для отбора трансгенных растительных клеток и тканей. Промотор *NOS* и терминатор *pAG7* фланкировали ген *nptII*. Остов бинарного вектора, кроме того, содержал источник *ColE1* и *pVS1* для репликации плазмиды в *Escherichia coli* или *Agrobacterium tumefaciens*. Ген *aadA* придает устойчивость к стрептомицину/спектиномицину для отбора бактерий. Плазмиду pZFN-nptII-LRR трансформировали в штамме агробактерии AGL-1 с помощью стандартной процедуры.

Трансформация сахарной свеклы происходила в соответствии с работой Линдси и Галлуа (1990), "Трансформация сахарной свеклы (*Beta vulgaris*) посредством *Agrobacterium*

tumefaciens". Journal of experimental botany 41.5 (1990): 529-536.). Для этого, в качестве исходного материала использовали "побеги, размножающиеся вегетативным способом" генотипа 04E05B1DH5, которые не несли ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением. Побеги размножали на соответствующей среде в соответствии с работой Линдси и Галлуа (1990). Чтобы индуцировать как можно больше меристем, "ростки" переносили в другую среду (см. Линдси и Галлуа (1990)) и инкубировали в темноте в течение нескольких недель при температуре приблизительно 30 °С. Штамм Agrobacterium AGL-1 с вектором pZFN-nptII-LRR (Фигура 3) культивировали в дополнительной среде (см. Линдси и Галлуа (1990)), дополнительно снабженной соответствующими антибиотиками для отбора. Срезы меристематической ткани на основе подлежащего обработке побега инкубировали с agrobacterium в течение нескольких часов в дополнительной среде (см. Линдси и Галлуа (1990)). Эксплантаты растения и агробактерии совместно культивировали в темноте в течение, по меньшей мере, 2 дней в среде (см. Линдси и Галлуа (1990)), а инокулированные эксплантаты впоследствии инкубировали в темноте в течение приблизительно 2 недель в дополнительной среде (см. Линдси и Галлуа (1990)). После этого эксплантаты дополнительно размножали в дополнительной среде (см. Линдси и Галлуа (1990)) и подвергали субкультивированию, чтобы обеспечить возможность отбора трансгенной ткани. Чтобы завершить фазу отбора и уменьшить степень образования химер, зеленые "побеги" переносили в среду H, и все они размножались в течение 2 недель. Затем листовую материал извлекали из зеленых, растущих "побегов" и исследовали с помощью ПЦР на наличие трансгена. Подходящие "побеги" укореняли в среде I и впоследствии переносили в теплицу для производства семенного материала T1. Кроме того, листовую материал, полученный из этих "побегов", был использован для анализа экспрессии трансформированного гена устойчивости.

Анализ уровня экспрессии

РНК выделяли из листьев "побегов" *in vitro* и использовали в рамках qRT-ПЦР. qRT-ПЦР проводили в соответствии с работой Вельтмейери соавт. 2011 (см. Предпосылки создания изобретения). Измеренные значения были нормализованы по отношению к эталонному гену PLT3_075_F09 (см. Вельтмейер и соавт., 2011) Экспрессию определяли с использованием следующих последовательностей праймеров:

Последовательность	Размер [Количество нуклеотидов]	T _m [С°] (температура плавления)	Размер продукта амплификации [количество нуклеотидов]
SEQ ID No. 92	21	59,8	170
SEQ ID No. 93	21	58,9	170

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

Чистую культуру *Cercospora beticola* с известной высокой вирулентностью размножали на агаре из овощного сока в чашках Петри (диаметром 9 см) при температуре 20° С в ближней ультрафиолетовой области спектра (NUV). Через 14 дней поверхность агара, на котором выращивали плесень, заливали 10 мл стерильной воды на чашку Петри, и фрагменты конидий и мицелия тщательно соскребали с помощью предметного носителя. Для инокуляции растений использовали плотность инокулята 20 000 фрагментов конидий/мицелия на мл, плюс 0,1% TWEEN 20. На момент инокуляции, растения культивировались в течение 8-9 недель в тепличных условиях. Верхняя сторона и нижняя сторона листьев были обработаны инокулятом. Затем растения инкубировали в течение 5-7 дней при температуре 25° С в условиях 18 ч/6 ч света/темноты и влажности приблизительно 100%. Первые симптомы Церкоспоры на листьях сахарной свеклы появились через 12-14 часов. Оценка симптомов отдельных растений проводилась регулярно с помощью оценки рейтинговых баллов, приведенных в Таблице 1А. Результаты приведены ниже.

Таблица G: Результаты трансгенной верификации функции гена устойчивости в соответствии с настоящим изобретением в трансформированных растениях; LSD = наименее значимое различие; dpi = дни после заражения

Испытуемая группа	Количество индивидуальных уюмов	Средний рейтинговый балл				Функция	Уровень экспрессии гена устойчивости в соответствии с настоящим изобретением
		8 dpi	11 dpi	13 dpi	15 dpi		
1	57	1,60	3,82	5,24	6,46	отрицательный контроль	0,0
2	38	1,28	3,07	4,42	6,04	трансгенная валидация	4,6
3	60	1,26	2,83	4,38	6,20	трансгенная валидация	12,5
4	45	1,50	3,40	4,62	6,18	отсутствие валидированной экспрессии <i>in vitro</i>	0,0
5	60	1,44	3,62	5,29	6,38	трансгенная валидация	2,6
6	57	1,68	3,69	5,30	6,52	трансгенная валидация	3,3
7	66	1,58	3,84	5,43	6,57	трансгенная валидация	2,9
8	60	1,31	2,81	4,19	5,48	трансгенная валидация	11,3
9	72	1,25	3,07	4,61	5,97	трансгенная валидация	26,8
10	60	1,44	3,26	4,77	6,00	трансгенная валидация	10,7
11	57	1,60	3,83	5,48	6,64	трансгенная валидация	4,4
12	72	1,34	2,62	3,75	5,19	устойчивое растение-источник	не определено
среднее значение	704	1,44	3,32	4,8	6,13		
Значение LSD	-	0,17	0,47	0,48	0,4		

Результаты трансгенной валидации гена устойчивости в соответствии с настоящим изобретением (см. Таблицу G):

Испытуемая группа 1 представляет собой отрицательный контроль. Генотип такой же, как и для испытуемых групп с 2 по 11, но никакой трансформации не произошло. Следовательно, никакой экспрессии обнаружить не удалось. Испытуемая группа 4 была трансформирована, но никакой экспрессии обнаружить не удалось. Испытуемые группы 2, 3 и с 5 по 11 представляют трансформанты, которые несут ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением только благодаря трансформации. Испытуемая группа 12 представляет селекционную линию, содержащую ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением в нетрансгенной версии. Рейтинговые баллы всех линий были установлены после инокуляции растительного материала с *Cercospora beticola*, как описано выше. Испытуемая группа 12 показывает самую высокую устойчивость, на которое указывает конечное значение 5,19.

Трансгенные линии показали рейтинговую балл в соответствии со следующей таблицей:

Таблица Н: Рейтинговые баллы трансгенных линий из Таблицы G

	8 dpi	11 dpi	13 dpi	15 dpi
среднее значение трансгенная валидация	1,42	3,33	4,87	6,2
среднее значение трансгенной валидации для линий, имеющих уровень экспрессии >10	1,315	2,9914,33	4,48	5,91

Таблица Н показывает, что рейтинговые баллы только для трансгенных валидационных групп. Сначала показано среднее значение для всех трансгенных испытуемых групп (исключая группу 4). Ниже приведены рейтинговые баллы только для тех трансгенных линий, которые показали уровень экспрессии, по меньшей мере, 10 (группы 3, 8, 9, 10; см. Таблицу G). В данном случае, итоговый рейтинговый балл составляет 5,91. Это значительно более высокая устойчивость, чем отрицательный контроль группы 1, которая имеет рейтинговый балл всего 6,46 (наименее значимое различие = 0,4; см. Таблицу G). Лучшая трансгенная испытуемая группа (группа 8) демонстрирует еще лучшую устойчивость благодаря рейтинговому баллу 5,48 (см. Таблицу G).

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

Статистическая оценка результатов трансгенной валидации

Таблица I: Статистический кластерный анализ

Испытуемая группа	Кластер 8 dpi	Кластер 11 dpi	Кластер 13 dpi	Кластер 15 dpi
1	ab	a	a	ab
2	e	de	bc	cd
3	e	ef	c	bcd
4	bc	bcd	bc	bcd
5	cd	abc	a	abc

6	a	ab	a	ab
7	ab	a	a	a
8	de	ef	c	e
9	e	de	bc	d
10	cd	cd	b	d
11	ab	a	a	a
12	de	f	d	e

В Таблице I приведена статистическая оценка рейтинговых баллов, содержащихся в Таблице G. Каждая буква символизирует отнесение к статистической группе. Например, очевидно, что после окончательной оценки (15 dpi) испытываемая группа 8 (трансгенная верификация) находится в том же кластере, что и испытываемая группа 12 (источник устойчивости), но в кластере, отличном от испытываемой группы 1 (отрицательный контроль). В соответствии с этим, испытываемая группа 8 существенно отличается от испытываемой группы 1, но не существенно отличается от испытываемой группы 12.

Кроме того, был проведен анализ блок-схемы. Иллюстрация блок-схем приведена на Фигурах 4 – 7.

Пример 3: Производство устойчивого растения сахарной свеклы в соответствии с настоящим изобретением на основе генетического материала, полученного из *Beta vulgaris* subsp. *maritima*

Процесс, описанный ниже, был основан на объединении материала дикой свеклы для генерирования генного пула устойчивости к Церкоспоре. Образцы *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, используемые в качестве исходного материала для селекционной программы, перечислены в следующей таблице.

Таблица 2: Образцы *Beta vulgaris* subsp. *maritima* и рейтинговые баллы их устойчивости к *Cercospora*, используемые в селекционной программе; в первых 4 столбцах справа указаны номера образцов, при этом определенный образец может иметь разные номера образцов в зависимости от места хранения (USDA GRIN = Информационная сеть по ресурсам зародышевой плазмы Министерства сельского хозяйства США; IDBBNR = Международная база данных для бета-тестирования ; DEU001 = Коллекция генетических ресурсов растений ; IPK = Лейбниц-Институт генетики и культуры)

показал балл 1 в одном исследовании и балл 9 в другом исследовании. Поскольку эти общедоступные данные казались ненадежными, был посажен семенной материал из образцов, и полученные растения были подвергнуты фенотипическому скринингу на устойчивость к Церкоспоре. Было отобрано примерно 150 частично устойчивых растений. Однако, поскольку наблюдаемая устойчивость у каждого растения могла быть результатом большого количества генов, каждый из которых внес небольшой вклад, то шансы идентифицировать единственный ген, подходящий для установления устойчивости или повышения уровня устойчивости измеримым образом, были ограничены. Было решено скрестить примерно 150 устойчивых растений друг с другом, используя сценарий открытого опыления. Этот подход также позволял генерировать рекомбинации внутри генетического материала. Скрещивание и отбор повторялись в течение нескольких поколений для повышения уровня устойчивости. Лучшие потомки были клонированы и подготовлены для подхода генетического картирования. Картирование описанной в данном документе резистентности было связано с интенсивным фенотипированием. С помощью создания популяции из более чем 4000 делящихся потомков и разработки специальных рекомбинантных экранов целевая область была уменьшена и, таким образом, еще более выделена посредством анализа информативных рекомбинантов (генотипических и фенотипических) в серии испытаний на устойчивость. Это генетическое картирование, а также создание физических карт, сопровождаемых секвенированием WHG ("секвенирование всего генома"), сравнительным секвенированием ВАС (Вас-by-Вас) и биоинформационными анализами, привело к идентификации трех рекомбинантных генотипов, которые подтвердили наличие гена устойчивости (1 рекомбинант в соседнем гене, с одной стороны, и 2 рекомбинанты в соседнем гене, с другой стороны). В свете особых требований, авторы изобретения поместили структуру с очень высокими повторами в целевую область, которая, среди прочего, содержит *тандемные повторы* с очень высокой гомологией последовательностей, что значительно затруднило разработку маркера и, следовательно, идентификацию информативных рекомбинантов. Следующие этапы были особенно решающими для локации генетической структуры гена устойчивости:

- разработка маркеров s4p0264s01, s4p2271s01, sxh0678s01, s4p4293s01, s4p4295s01, s4p4301s01 (см. Таблицу 1B).
- Тонкое картирование в сочетании с интенсивным фенотипированием. Фенотипы были верифицированы с расчетом 90-180 потомков на растение в испытании в

теплице и с использованием интенсивных статистических методов (например, t-критерий, анализ мощности и так далее).

- Идентификация и секвенирование клонов ВАС из пулов ВАС устойчивого генотипа.
- Оценка последовательности, а также сравнение последовательности и белка между RR (то есть, устойчивым) и ss (то есть, чувствительным) генотипами; таким образом, недвусмысленная сборка данных о последовательностях RR и ss не всегда была возможна из-за сложности последовательностей.

В рамках селекционной программы полученная устойчивость *Beta vulgaris* subsp. *Maritima* была скрещена с элитной линией сахарной свеклы. Несколько обратных скрещиваний с помощью маркерной селекции позволили перенести ген устойчивости в сформировавшуюся зародышевую плазму сахарной свеклы. Удивительно, но никаких нежелательных эффектов в отношении выхода сахара и тому подобное не наблюдалось. Впоследствии было получено подтверждение концепции гена устойчивости в сахарной свекле путем трансформации и генерирования сахарной свеклы, которая была трансгенной по гену устойчивости (см. выше). После этого успешного подтверждения концепции, сгенерированная зародышевая плазма сахарной свеклы, содержащая ген устойчивости, может быть использована для генерирования сорта сахарной свеклы, устойчивого к Церкоспоре.

Пример 4: Скрининг исходных образцов на наличие идентифицированного гена устойчивости

После того, как ген устойчивости был идентифицирован, был проведен скрининг генетического исходного материала (образцы в соответствии с Таблицей 2) с помощью маркеров для идентификации образца, который нес ген устойчивости. Количество проанализированных растений на образец зависело от наличия семян и приведено в таблице ниже.

Таблица 3 Количество растений на образец, проанализированный на присутствие идентифицированного гена устойчивости

Наименование образца				Растения [№]
USDA GRIN	IDBBNR	DEU001	IPK	
PI 120704	5191			40
PI 169020	5265			40
PI 169023	5268			18
PI 169030	5274			18

PI 546536	9703			50
PI 546539	9706			34
PI 518303	5797			2
PI 518303	5797			16
PI 546534	9701			40
PI 590763	4587			12
PI 590766	4591			28
PI 109038	5160			23
		28894	BETA 1521	40
	2195	32375	BETA 1429	40
	3555	48819		14
		64088	BETA 2157	12
	8535	58260	BETA 1987	40
	3358	36542	BETA 1228	40
	3744	51437	BETA 1083	31
	6071	54762	BETA 1655	40
	2649	54832	BETA 992	12
	7103	57737	BETA 1127	40
	8634	62120	BETA 1057	18
	8635	62121	BETA 1447	40
	8636	62122	BETA 1014	40
	8637	62123	BETA 1432	37
	8638	62124	BETA 1090	11
	8640	62126	BETA 1377	40
	8642	62128	BETA 1558	40
	8643	62130	BETA 1348	40
	8644	62131	BETA 1610	40
	2212	28931	BETA 1666	36
	3546	48810	BETA 1304	40
PI 504196				37
PI 546409				
	3401	45516	BETA 2174	40
PI 504245	5726			40

Каждое из приведенных растений каждого образца было подвергнуто скринингу с использованием 572 SNP-маркеров, которые были расположены в положении 5', а также 3' к гену устойчивости. Благодаря большому количеству маркеров можно было

бы получить образец гаплотипа. Однако ни один из образцов, использованных в качестве исходного материала, не показал гаплотипа линии CRBM, которая несла идентифицированный ген устойчивости. Наибольшее сходство было обнаружено с образцом 48819 (обозначение DEU001) / 3555 (IDBBNR) (см. Таблицы 2 и 3). В следующей таблице приведена выдержка из анализа всех маркеров, включая положения 5' и 3' гена устойчивости. **Таблица 4 Сравнение устойчивой линии в соответствии с настоящим изобретением и 14 растений из образца 48819 с помощью маркерного SNP-анализа (del = делеция, ins = вставка, Pos start = начальное положение молекулярного маркера на генетической цепи, * = Положение гена устойчивости в соответствии с SEQ ID NO 1)**

Маркер	s4e5 628s 03	s4e5 628s 02	s4p2 272s 01	s4p2 273s 01	s4p 42 91s 01	s4p 42 93s 01	sxh6 264s 01	sxh 31 16s 01	s4p429 5s01	s4p8 772s 01			s4p8 783s 01	s4p4 301s 01	sxh0 678s 01	s4p2 276s 01	s4p4 305d 01	s4p4 306s 01	s4e9 714s 01	s4e7 895s 01	s4p4 307s 01	s4p4 309s 01
Pos start	62,81	62,82	62,83	62,83	62,84	62,84	62,84	62,84	62,85	62,86			62,94	62,94	62,97	62,97	62,98	62,98	62,98	62,98	62,99	63,01
CRBM, содержащий SEQ ID NO:1	A	A	A	A	A	A	G	C	A	T	*		C/T	A	A	G	del	G	G	C	C	T
48819_1	A	G	T	C	G	G	G	C	T	A			C	A	A	G	ins	G	G	C	C	T
48819_2	A	G	T	C	G	G	G	C	T	A			C	A	A	G	ins	G	G	C	C	T
48819_3	A	G	T	C	G	G	G	C	A/T	A/T			C	A/T	A/C	A/G	ins	A/G	C/G	C/G	C/T	C/T
48819_4	A	G	T	C	G	G	G	C	A/T	A/T			C	A/T	A/C	A/G	ins	A/G	C/G	C/G	C/T	C/T
48819_5	A	G	T	C	G	G	G	C	A/T	T			C	T	A/C	A	ins	A	C/G	G	C/T	C
48819_6	A	G	T	A/C	G	A	G	C	A/T	A/T			C	A/T	C	G	ins	G	G	C	C	C/T
48819_7	A	G	T	C	G	G	A/G	A/C	Не применяется	A			C	T	C	G	ins	G	G	C	C	C/T
48819_8	A	G	T	A/C	G	G	G	A/C	Не применяется	A			C	A/T	A/C	G	ins	G	G	Не применяется	C	C
48819_9	A	G	T	C	G	G	G	A/C	A	A/T			C	T	C	A/G	ins	A/G	C/G	G	C/T	C
48819_10	A	G	T	C	G	G	G	C	A	T			C	T	C	A	ins	A	C	G	T	C
48819_11	A	G	T	C	G	G	G	C	A	T			C	T	C	A	ins	A	C	G	T	C
48819_12	A	G	T	C	G	G	G	C	A/T	T			C	T	A/C	A	ins	A	C/G	G	C/T	C
48819_13	A	G	T	A/C	G	A	G	C	A/T	A/T			C	A/T	C	A/G	ins	A/G	C/G	C/G	C/T	C/T
48819_14	A	G	A/T	A/C	G	G	G	C	T	A			C	A/T	A/C	G	ins	A/G	C/G	C/G	C/T	C/T

Результаты маркерного анализа (как показано на примере данных, приведенных в Таблице 4) показывают, что ген устойчивости в соответствии с настоящим изобретением не может быть прослежен до одного из образцов в соответствии с

Таблицей 2. Даже растения образца 48819, которые имели самое сильное маркерное перекрытие с устойчивой линией в соответствии с настоящим изобретением, имели существенные различия. Примечательным было обнаружение делеции в пределах устойчивой линии, тогда как образец 48819 показал делецию в том же положении. Это может быть показателем того, что существенное генетическое реструктурирование в этом локусе произошло во время генерации гена устойчивости в соответствии с настоящим изобретением. Это предположение также объяснило бы, почему не удалось отследить ген устойчивости до исходного материала селекционной программы.

Пример 5: Создание семенного материала, устойчивого к Церкоспоре

Сгенерированная зародышевая плазма сахарной свеклы, содержащая ген устойчивости (результат Примера 3), могла бы быть использована для генерирования сорта сахарной свеклы, устойчивого к Церкоспоре. Для этой цели ген был передан путем скрещивания с родительской линией ДН, которая была скрещена с родительской линией ДН, происходящей из другого гибридного селекционного пула. В результате был получен гибридный сорт, обладающий устойчивостью к Церкоспоре в соответствии с настоящим изобретением. Семена сорта были отделены друг от друга (сингуляризованы), очищены и отполированы. После этого семена были подвергнуты праймингу и гранулированию, как описано в работе EP2002702A1. Полученный семенной материал был помещен в упаковку из картона, которая содержала промежуточный слой в качестве пароизоляции. Полученный семенной материал подходил для посева, выращивания, сбора урожая и последующего промышленного производства сахара.

Формула изобретения

1. Способ идентификации растения, которое является устойчивым или толерантным к *Церкоспоре*, отличающийся тем, что он включает следующие этапы:

(i) обнаружение присутствия или отсутствия нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

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

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

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

(d) нуклеотидной последовательности, которая гибридизируется с комплементарной последовательностью нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктами (a), (b) или (c) в 4 x SSC при температуре 65 °C, и последующей повторной промывке в 0,1 x SSC при температуре 65 °C в течение приблизительно 1 часа в общей сложности;

(e) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 3;

(f) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 90% идентична последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 2

(ii) обнаружение присутствия или отсутствия полипептида, который кодируется нуклеотидной последовательностью, как определено на этапе (i), в растении или части растения; и/или

(iii) обнаружение, по меньшей мере, одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности, как определено на этапе (1) или в косегрегирующей области,

при этом, косегрегирующая область представляет собой геномную область, которая косегрегируется с устойчивостью к *Церкоспоре*, придаваемой полипептидом, или с нуклеотидной последовательностью, и, при этом, косегрегирующая область содержит и фланкирована маркером s4p1395s01 и s4p0421s01.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что он включает следующий этап:

(iv) выбор растения, устойчивого к *Церкоспоре*.

3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что обнаружение на этапе (i) или (iii) основано, по меньшей мере, на одном полиморфизме или однонуклеотидном полиморфизме.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что

a) указанный, по меньшей мере, один полиморфизм или однонуклеотидный полиморфизм генетически сцеплен с нуклеотидной последовательностью или имеет частоту рекомбинации 10% или менее по отношению к нуклеотидной последовательности,

b) указанный, по меньшей мере, один полиморфизм или однонуклеотидный полиморфизм расположен в пределах 2562 т.п.о., 2300 т.п.о., 2100 т.п.о., 1900 т.п.о., 1700 т.п.о., 1500 т.п.о., 1300 т.п.о., 1100 т.п.о., 900 т.п.о., 700 т.п.о., 500 т.п.о., 300 т.п.о., 100 т.п.о., 50 т.п.о., 25 т.п.о., 10 т.п.о., 5 т.п.о. или 1 т.п.о. или менее от нуклеотидной последовательности,

c) указанный, по меньшей мере, один полиморфизм или однонуклеотидный полиморфизм обнаруживается в семенах, хранимых в NCIMB, Абердин, Великобритания под номером доступа NCIMB 43646

или

d) указанный, по меньшей мере, один полиморфизм или однонуклеотидный полиморфизм является частью косегрегирующей области,

при этом, нуклеотидная последовательность представляет собой нуклеотидную последовательность, определенную на этапе (i) пункта 1, и, при этом, косегрегирующая область представляет собой косегрегирующую область, определенную на этапе (iii) пункта 1.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что этап (i) и/или этап (iii), содержит следующие этапы, которые завершаются обнаружением следующего:

a) предложение растения, его ткани, семени или его клетки и

b) извлечение ДНК, предпочтительно геномной ДНК, из растения, его ткани, семени или из его клетки.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что включает использование, по меньшей мере, двух олигонуклеотидов.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что олигонуклеотиды подходят для использования в качестве праймера в ПЦР и способны гибридизироваться с геномным интервалом, который содержит и фланкирован маркерами s4p1395s01 и s4p0421s01.

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что растение представляет собой растение рода *Beta* или растение рода *Spinacia*.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, включающий ПЦР на этапе (i) и/или (iii), отличающийся тем, что ПЦР включает два аллель-специфичных прямых праймера и, при этом, этап обнаружения включает метод резонансного переноса энергии флуоресценции, и, при этом, присутствие, отсутствие или вид флуоресценции определяется датчиком.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что включает один общий обратный праймер.

11. Растение рода *Beta* или *Spinacia*, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, который способен придавать устойчивость к *Церкоспоре* растению, в котором экспрессируется полипептид, отличающееся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из:

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

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

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

(d) нуклеотидной последовательности, которая гибридизируется с комплементарной последовательностью нуклеотидной последовательности в соответствии с пунктами (a), (b) или (c) в 4 x SSC при температуре 65 °C, и последующей повторной промывке в 0,1 x SSC при температуре 65 °C в течение приблизительно 1 часа в общей сложности;

(e) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 3;

(f) нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 90% идентична последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID No. 1 или SEQ ID No. 2

при этом, растение рода *Beta* или *Spinacia* содержит эндогенный аллель, кодирующий *ersp*-синтазу, имеющую в положении 179 аминокислоту, отличную от пролина.

12. Растение по п. 11, дополнительно отличающееся тем, что признак или комбинация признаков выбраны из списка, состоящего из следующего: растение является гибридным и/или двойным гаплоидным растением, устойчивость к *Церкоспоре* является доминантной, молекула нуклеиновой кислоты или нуклеотидная последовательность

представлена в виде интрогрессии или представлена гомозиготной, и/или растение обладает толерантностью к глифосату.

13. Орган хранения или лист растения по п. 11 или п. 12.

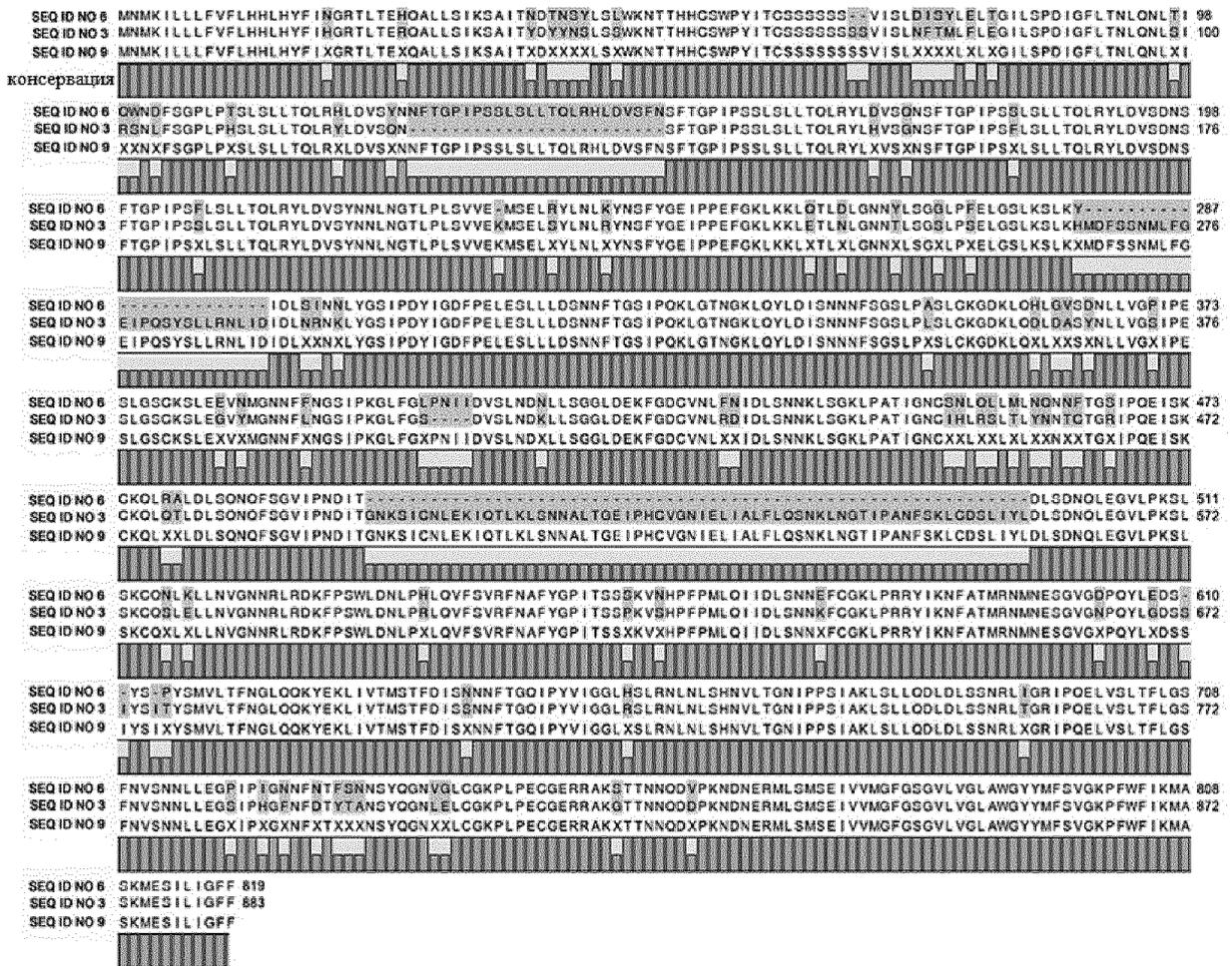
14. Гранулированное семя растения по п. 11 или п. 12, отличающееся тем, что семя содержит молекулу нуклеиновой кислоты и эндогенный аллель.

15. Растение по п. 11 или п. 12, орган хранения или лист по п. 13, или гранулированное семя по п. 14, отличающееся тем, что epsp-синтаза, имеющая в положении 179 аминокислоту, отличную от пролина, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из

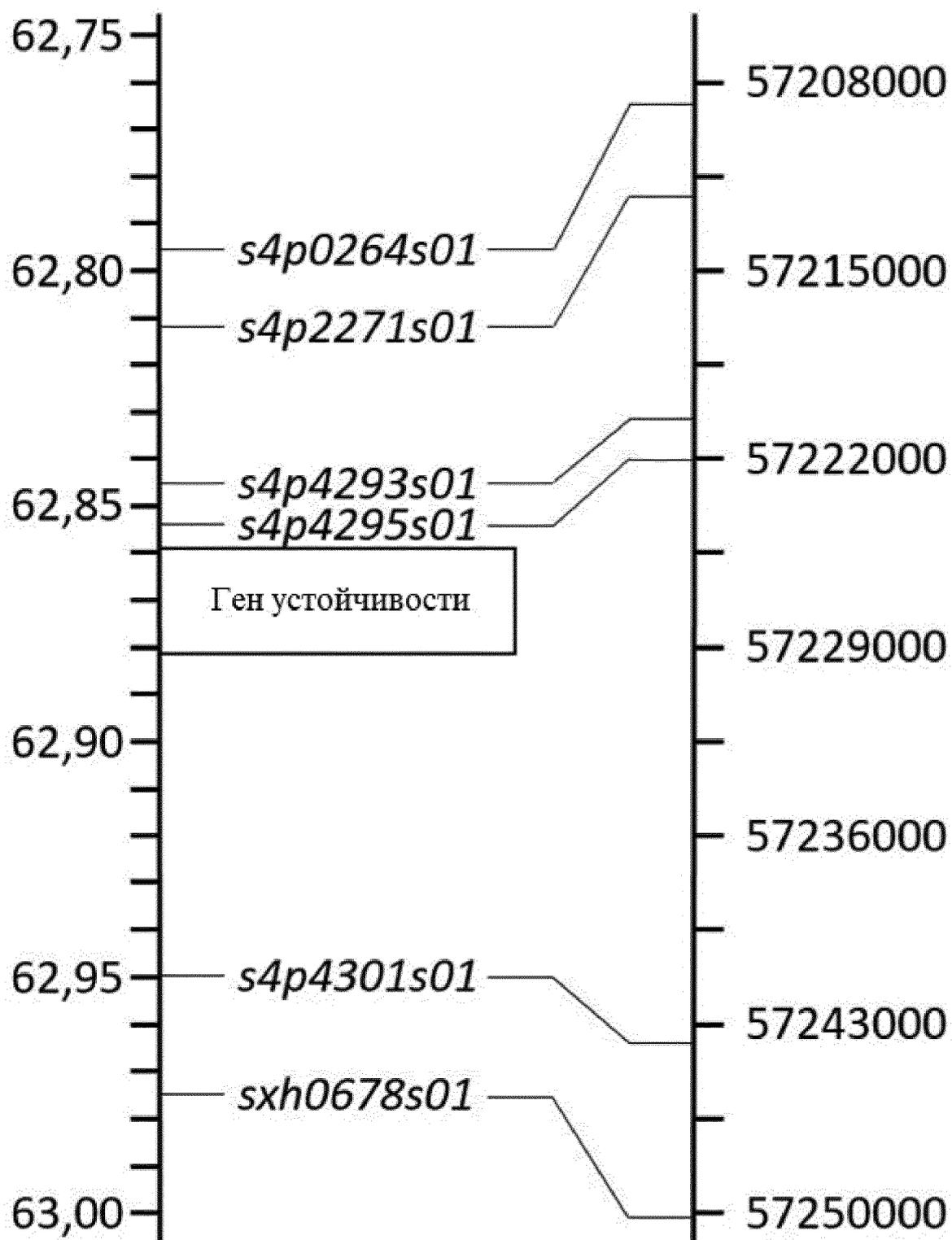
i) последовательности SEQ ID NO: 223

ii) последовательности i), имеющей в положении 179 аминокислоту, отличную от серина и пролина, или

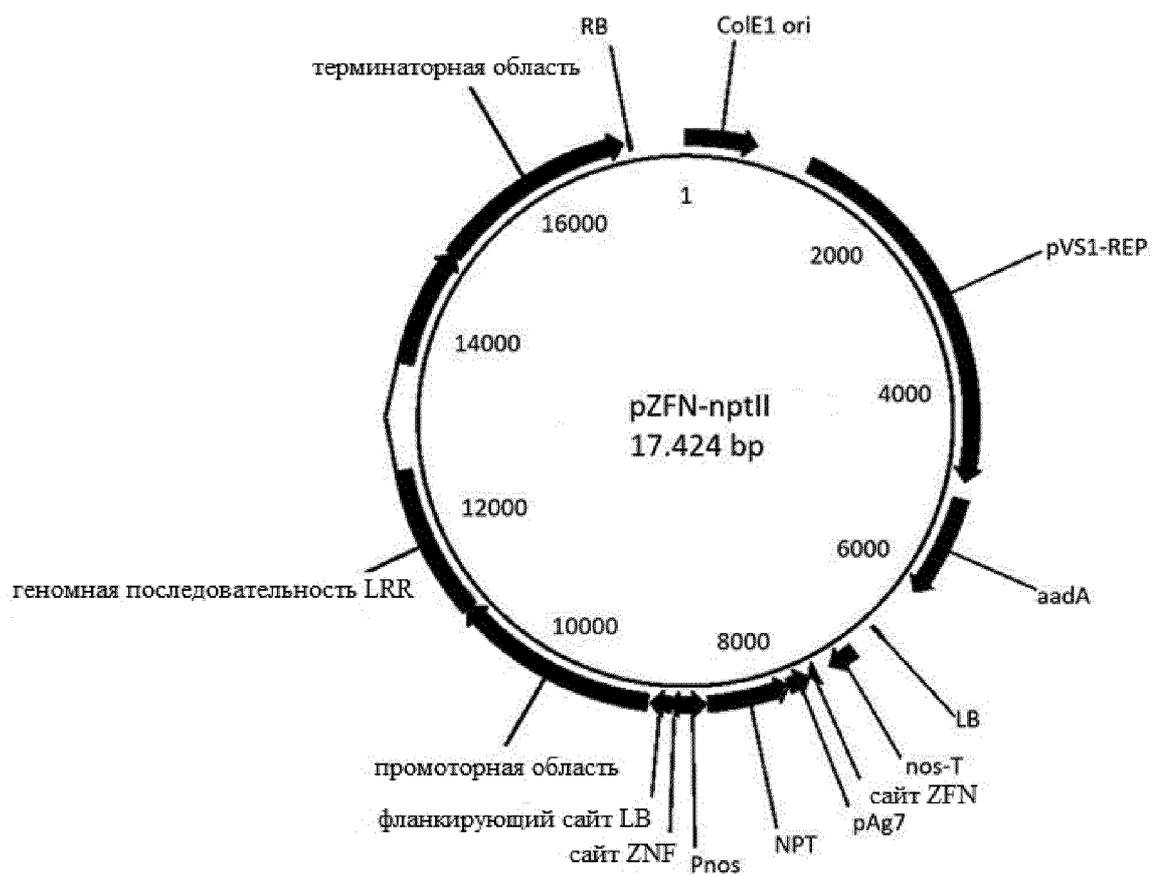
iii) последовательности, имеющей идентичность, по меньшей мере, 90% с последовательностью i) или ii) по всей длине последовательности.



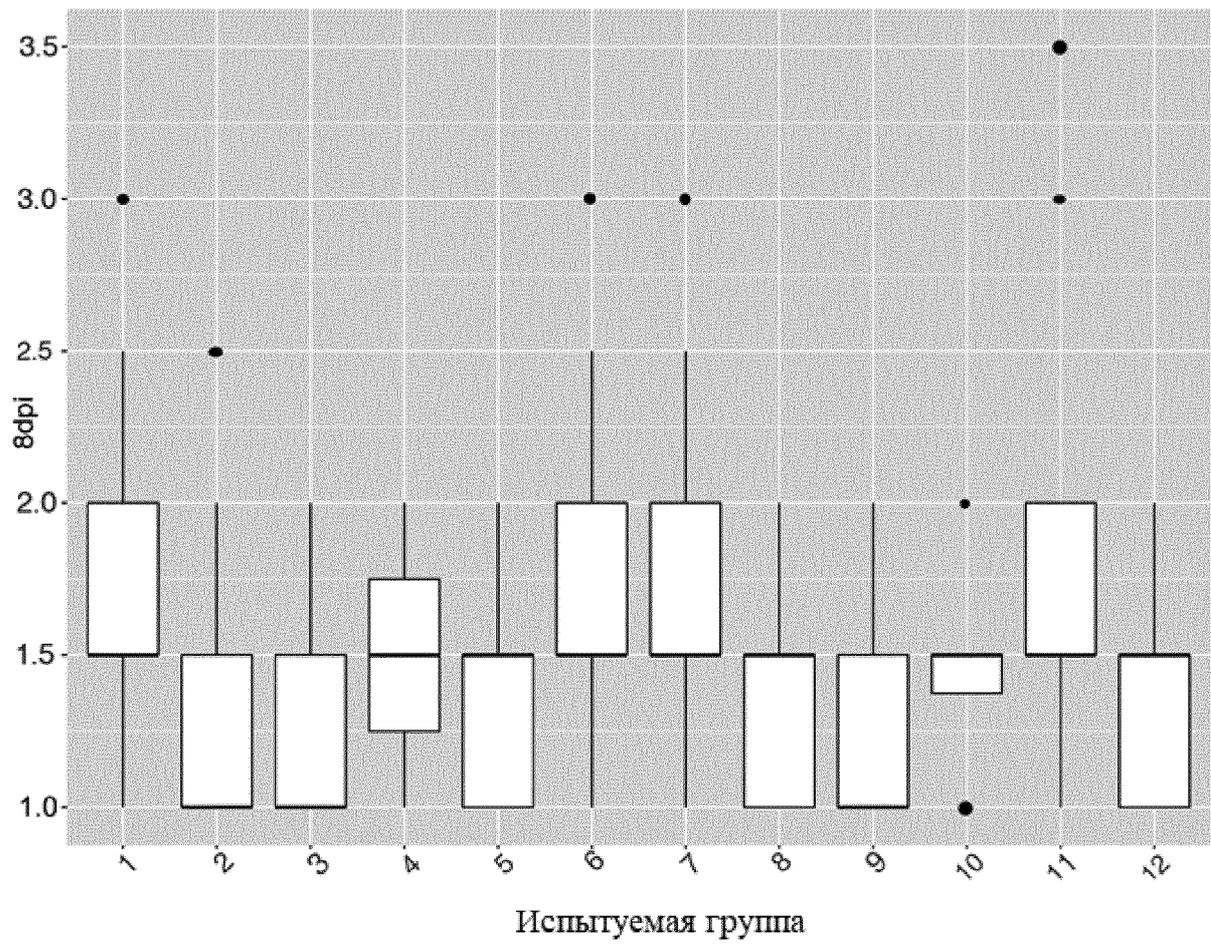
Фиг.1



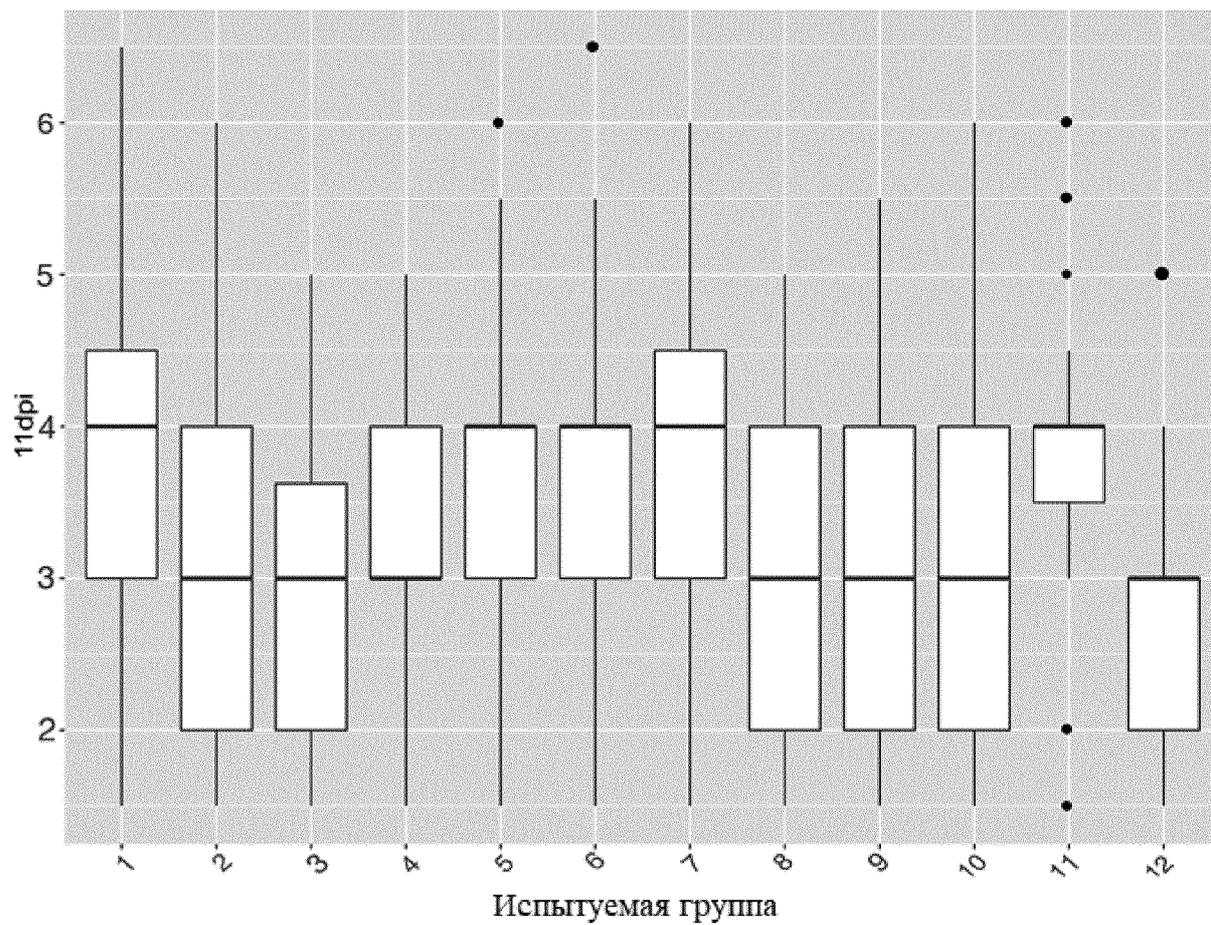
Фиг. 2



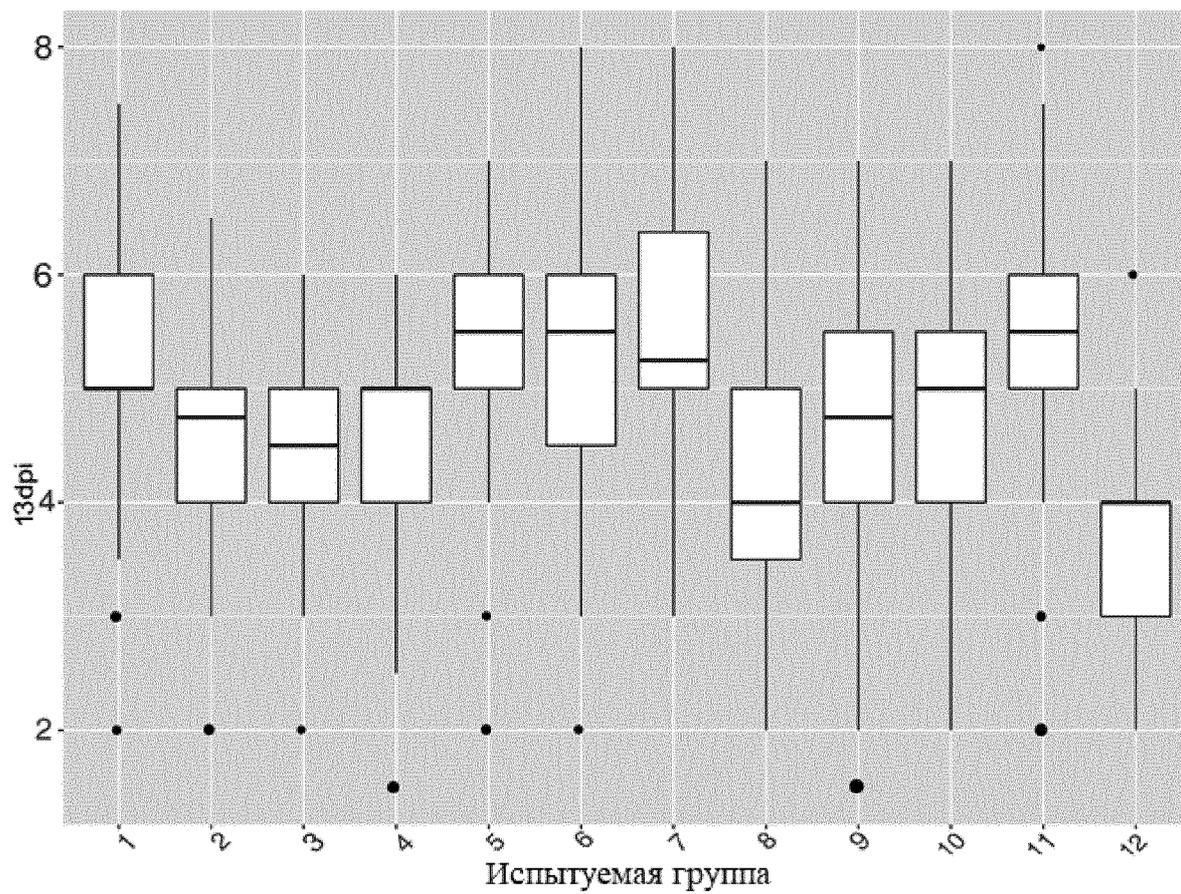
Фиг. 3



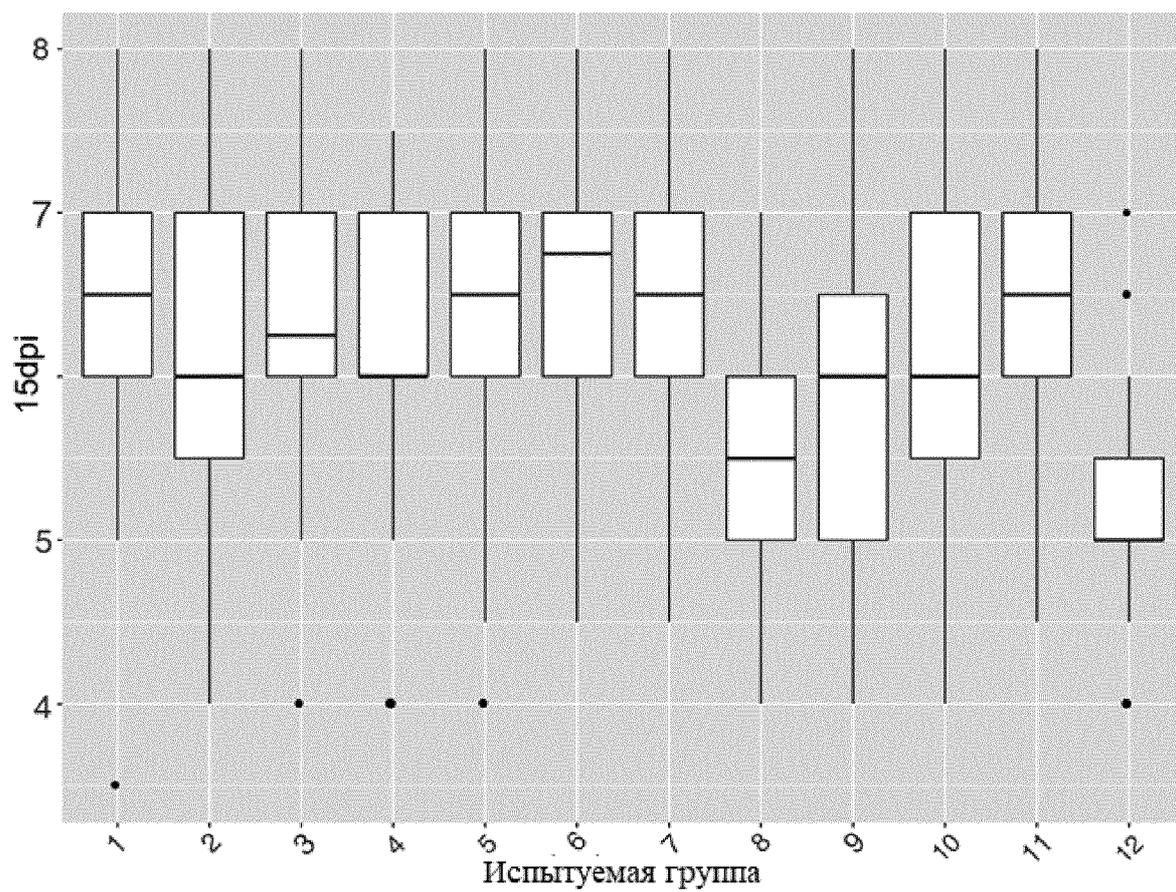
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7