

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390673 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.03

(51) Int. Cl. C12N 15/82 (2006.01)
A01G 22/40 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.08.30

(54) ПОВЫШЕНИЕ УРОЖАЙНОСТИ

(31) 63/072,742

(32) 2020.08.31

(33) US

(86) PCT/EP2021/073904

(87) WO 2022/043559 2022.03.03

(88) 2022.05.27

(71) Заявитель:
БАСФ СЕ (DE)

(72) Изобретатель:

Куи Юнксинг Кори, Дейоунг Броди
Джон (US), Шультайсс Хольгер (DE)

(74) Представитель:

Беляева Е.Н. (BY)

(57) Изобретение относится к растениеводству и ведению сельского хозяйства. В частности, изобретение относится к материалам и способам повышения урожайности растений. Указанное повышение урожайности предпочтительно проявляется в условиях стресса, вызванного грибковым патогеном.

A1

202390673

202390673

A1

ПОВЫШЕНИЕ УРОЖАЙНОСТИ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к растениеводству и ведению сельского хозяйства. В частности, изобретение относится к материалам и способам повышения урожайности растений. Указанное повышение урожайности предпочтительно проявляется в условиях стресса, вызванного грибковым патогеном.

ИЗВЕСТНЫЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В прошлом наличие организмов, которые являются патогенными для растений, и, в частности, грибов приводило к значительному снижению урожайности, а в худших случаях – к голоду. Монокультуры, в частности, очень восприимчивы к эпидемическому распространению болезней. На сегодняшний день патогенные организмы контролируются в основном при помощи пестицидов. В настоящее время человек также обладает возможностью прямого изменения генетической предрасположенности растения или патогена. Альтернативно, природные фунгициды, вырабатываемые растениями после перенесенной грибковой инфекции, могут быть синтезированы и нанесены на растения.

Термин «устойчивость», используемый по тексту настоящей заявки, имеет отношение к отсутствию или уменьшению одного или более симптомов заболевания у растения, вызванного растительным патогеном. Устойчивость обычно описывает способность растения предотвращать или, по меньшей мере, ограничивать заражение и колонизацию вредоносным патогеном. В рамках природной устойчивости, которая позволяет растениям противодействовать колонизации фитопатогенными организмами, выявлены различные механизмы. (Schopfer and Brennicke (1999) Pflanzenphysiologie, Издательство Springer, Берлин-Гейдельберг, Германия).

Что касается устойчивости, то различают совместимые и несовместимые взаимодействия. При совместимом взаимодействии наблюдается взаимодействие между вирулентным патогеном и восприимчивым растением. Патоген выживает и может создавать репродуктивные структуры, в то время развитие хозяина существенно тормозится, либо хозяин отмирает. С другой стороны, несовместимое

взаимодействие имеет место, когда патоген заражает растение, но его рост подавляется до или после слабого развития симптомов (в основном благодаря присутствию генов устойчивости (R) семейства NBS-LRR, см. ниже). В последнем случае растение демонстрирует устойчивость к соответствующему патогену. (Schopfer and Brennicke, смотрите выше). Тем не менее, данный вид устойчивости чаще всего специфичен для определенного штамма или патогена.

Как при совместимых, так и при несовместимых взаимодействиях возникает защитная и специфическая реакция хозяина на патоген. Однако, в природе такая устойчивость часто преодолевается благодаря быстрому эволюционному развитию новых вирулентных рас патогенов. (Neu et al. (2003) *American Cytopathol. Society, MPMI* 16 № 7: 626-633).

Большинство патогенов являются видоспецифичными для растений. Это означает, что патоген может вызывать заболевание у определенного вида растений, но не у других видов растений. (Heath (2002) *Can. J. Plant Pathol.* 24: 259-264). Устойчивость к патогену у некоторых видов растений называется устойчивостью нехозяина. Устойчивость нехозяина обеспечивает эффективную, обширную и постоянную защиту от фитопатогенов. Гены, обеспечивающие устойчивость нехозяина, обеспечивают возможность эффективной, обширной и постоянной защиты от некоторых болезней у растений, не являющихся хозяевами. В частности, такая устойчивость работает для разных штаммов патогена.

Грибы встречаются во всех регионах мира. На сегодняшний день известно порядка 100 000 различных видов грибов. Из них наиболее значимыми являются ржавчинные грибы. Они могут иметь сложный цикл развития с пятью различными споровыми стадиями (сперматий, эцидиоспора, уредоспора, телеутоспора и базидиоспора).

При заражении растений патогенными грибами обычно наблюдаются различные этапы. Первые этапы взаимодействия фитопатогенных грибов с их потенциальными растениями-хозяевами являются решающими для колонизации растения грибом. На первом этапе заражения споры прикрепляются к поверхности растений, прорастают, а гриб проникает в растение. Грибы могут проникать в растение через существующие отверстия, такие как устьица, поры, гидатоды и места повреждения, либо они проникают непосредственно в эпидермис растения в

результате механического воздействия с помощью ферментов, переваривающих клеточную оболочку. Для проникновения в растение сформированы специфические инфекционные структуры. Для противодействия такому воздействию, у растений сформировались физические барьеры, такие как слои воска, а также химические соединения, обладающие противогрибковым действием для подавления прорастания спор, роста или проникновения гиф.

Ржавчина сои *Phakopsora pachyrhizi* проникает непосредственно в эпидермис растений. После прорастания через эпидермальную клетку, гриб достигает межклеточного пространства мезофилла, где начинает распространяться по листу. Для получения питательных веществ гриб проникает в клетки мезофилла и внутри клеток мезофилла формирует гаустории. В процессе проникновения плазматическая мембрана клетки мезофилла, в которую выполняется проникновение, остается целой. Особенностью ржавчинных грибов *Phakopsora*, которая вызывает наибольшее беспокойство, является то, что данный патоген демонстрирует огромную изменчивость, таким образом преодолевая новые механизмы устойчивости растений и воудействие новых фунгицидов в течение нескольких лет, а иногда в течение одного сезона созревания в Бразилии.

Грибы рода *Fusarium* являются важными патогенами растений, которые поражают широкий спектр видов растений, включая многие значимые сельскохозяйственные культуры, такие как кукуруза и пшеница. Они вызывают гниль семян и увядание всходов, а также корневую гниль, гниль стеблей и гниль початков. Патогены рода *Fusarium* заражают растения через корни, шелковицы или ранее зараженные семена, либо проникают в растение через поврежденные места или естественные отверстия и трещины. После весьма непродолжительной фазы укоренения грибы *Fusarium* начинают выделять микотоксины в инфицированные ткани хозяина, такие как трихотецены, зеараленон и фузариновая кислота, что приводит к гибели клеток и мацерации инфицированной ткани. Питаясь мертвыми тканями, гриб впоследствии начинает распространяться по зараженному растению, что приводит к серьезному снижению урожайности и качества собираемого зерна.

Питание биотрофных фитопатогенных грибов зависит от метаболизма живых растительных клеток. Данный тип грибов относится к группе биотрофных грибов, как и многие ржавчинные грибы, мучнистая роса или оомицеты-патогены, такие как род *Phytophthora* или *Peronospora*. Некротрофные фитопатогенные грибы

питаются отмершими клетками растений, например, виды рода *Fusarium*, *Rhizoctonia* или *Mycosphaerella*. Соевая ржавчина занимает промежуточное положение. Она проникает непосредственно в эпидермис, после чего клетка, в которую она проникла, становится некротической. Тем не менее, после проникновения гриб переходит на облигатно-биотрофный образ жизни. Подгруппа биотрофных грибковых патогенов, которая по сути использует указанную стратегию заражения, является геминекротрофной.

На урожайность влияют различные факторы, например, количество и размер органов растения, строение растения (например, количество ветвей), количество наполненных семян или зерен, мощность растения, скорость роста, развитие корневой системы, использование воды и питательных веществ и устойчивость к стрессу. В прошлом предпринимались попытки вывести растения, которые обладают устойчивостью к грибковым патогенам.

С некоторым удивлением и разочарованием специалисты выяснили, что повышение устойчивости к грибам не коррелирует с повышением урожайности. В частности, даже гены, которые стабильно обеспечивают высокую устойчивость к грибу, могут не только не увеличивать, но и даже снижать урожайность. Вопреки здравому смыслу, а также предположениям и утверждениям, изложенным в литературе, признаки устойчивости к грибу и урожайности в лучшем случае не зависят друг от друга, а часто даже нейтрализуют друг друга (данный вопрос рассматривается в работе Ning et al. *Balancing Immunity and Yield in Crop Plants Trends in Plant Science* (Нинг и др. Обеспечение баланса динамики иммунитета и урожайности культур в растениеводстве) 22 (12), 1069-1079). Тем не менее, фермеры преимущественно заинтересованы в урожайности, степень отсутствия влияния на растения со стороны грибковых инфекций не имеет значения, за исключением случаев, когда это сказывается на урожайности.

Таким образом, целью изобретения было обеспечить наличие материалов и способов повышения урожайности растений, в частности, сельскохозяйственных культур, и предпочтительно обеспечить повышение урожайности, несмотря на потенциальный стресс от воздействия грибковых патогенов. В частности, предпочтительной целью изобретения было создание материалов и способов, позволяющих получать растительный материал с наследственно улучшенной урожайностью даже в условиях заражения грибковым патогеном, предпочтительно

ржавчинным грибом и, наиболее предпочтительно, ржавчинным грибом рода *Phakopsora*, а также в условиях без значительного риска инфекции.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

По состоянию на текущий момент времени установлено, что определенные гены обеспечивают повышение урожайности растений, в частности, сельскохозяйственных культур. Таким образом, в настоящей заявке изложены следующие аспекты изобретения:

Изобретение предусматривает способ повышения урожайности растения по сравнению с контрольным растением, включающий

- i) предоставление растения, содержащего кассету гетерологичной экспрессии, содержащую ген, выбранный из Pti5, SAR8.2 и RLK2, а также
- ii) выращивание растения.

Соответственно изобретение обеспечивает возможность использования гена, выбранного из Pti5, SAR8.2 и RLK2, для повышения урожайности растений.

Изобретение также относится к сельскохозяйственному способу повышения урожайности растения по сравнению с контрольным растением, включающему выращивание растения, содержащего кассету гетерологичной экспрессии, содержащую ген, выбранный из Pti5, SAR8.2 и RLK2, причем во время выращивания растения количество обработок пестицидами за вегетационный период уменьшается, по меньшей мере, на одну по сравнению с контрольным растением, предпочтительно, по меньшей мере, на две.

Более того, изобретение предусматривает способ получения гибридного растения с улучшенной урожайностью по сравнению с контрольным растением, включающий

- i) предоставление первого растительного материала, содержащего кассету гетерологичной экспрессии, содержащую ген, выбранный из Pti5, SAR8.2 и RLK2, и второго растительного материала, не содержащего указанную кассету гетерологичной экспрессии,
- ii) получение поколения F1 в результате скрещивания первого и второго растительного материала, и

- iii) выбор одного или более представителей поколения F1, которые содержат указанную кассету гетерологичной экспрессии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На Фигуре 1 показано сравнение урожайности сои (определено на основании Примера 4) с относительной устойчивостью к грибам (определено на основании Примера 3).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID. описание нуклеотида/аминокислоты

- 1 ак искусственная Pti5-подобная последовательность
- 2 ак искусственная CaSAR8.2A-подобная последовательность
- 3 ак искусственная RLK2-подобная последовательность

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Техническая идея изобретения выражена в тексте настоящей заявки с использованием терминологии, в частности, научной и технической терминологии. Тем не менее, квалифицированный специалист понимает, что терминология, какой бы детальной и точной она ни была, может лишь приблизительно передать техническую идею хотя бы потому, что существует множество способов выражения идеи, каждый из которых неизбежно оказывается не в состоянии отразить все концептуальные связи, поскольку каждое выражение обязательно должно являться законченным. Учитывая вышесказанное, специалист в данной области техники понимает, что предмет изобретения представляет собой сумму отдельных технических концепций, изложенных или обозначенных по тексту настоящей заявки, обязательно в виде части вместо целого, с учетом ограничений письменного описания. В частности, специалисту в данной области техники будет понятно, что значение отдельных технических понятий приведено по тексту настоящей заявки в форме сокращенного разъяснения каждой возможной комбинации понятий, насколько это технически целесообразно, таим образом, чтобы, например, раскрытие трех понятий или вариантов осуществления A, B и C – это сокращенное обозначение понятий A+B, A+C, B+C, A+B+C. В частности, альтернативные позиции для признаков описываются по тексту настоящей заявки в виде списков, которые служат схожей цели. За исключением случаев, когда

указано иное, описанное в настоящей заявке изобретение включает в себя любую комбинацию указанных альтернатив. Выбор более или менее предпочтительных элементов из указанных списков является частью изобретения и обусловлен предпочтением специалиста в данной области техники в части минимальной степени осуществления преимущества или преимуществ, передаваемых соответствующими признаками. Такие множественные комбинированные варианты осуществления представляют адекватно предпочтительную(ые) форму(ы) изобретения.

Ввиду того, что по тексту настоящей заявки используются записи в общедоступных базах данных, например, Uniprot или PFAM, содержание таких записей актуально по состоянию на 20 мая 2020 года. За исключением случаев, когда указано иное, если запись содержит информацию о последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислоты, такая информация о последовательности включена в состав настоящей заявки.

За исключением случаев, когда из контекста следует иное, при использовании по тексту настоящего документа термины в единственном числе и формах единственного числа, таких как «а», «an» и «the», включают в себя множественное число. Таким образом, например, использование термина «нуклеиновая кислота» необязательно включает в себя, в практическом плане, множество копий такой молекулы нуклеиновой кислоты; аналогично, термин «зонд» необязательно (и обычно) включает в себя множество сходных или идентичных тест-молекул. Также, при использовании по тексту настоящего документа, слово «содержание» или его вариации, такие, как «содержит» или «содержащий» подразумевает включение указанного элемента, целого числа или этапа, или группы элементов, целых чисел или этапов, но не исключение какого-либо другого элемента, целого числа или этапа или группы элементов, целых чисел или этапов.

По тексту настоящего документа термин «и/или» относится ко всем возможным комбинациям одного или более связанных перечисленных элементов, а также к отсутствию комбинаций при толковании в качестве альтернативы («или»). Термин «включающий в себя» также включает в себя термин «состоящий из».

Термин «порядка», в случае его использования в отношении измеряемой величины, например, показателя массы, дозы, времени, температуры, идентичности последовательности и т.п., относится к вариации $\pm 0,1\%$, $0,25\%$, $0,5\%$, $0,75\%$, 1% , 2% , 3% , 4% , 5% , 6% , 7% , 8% , 9% , 10% , 15% или даже 20% от указанного значения, а также к указанному значению. Таким образом, если для данной композиции указано, что она содержит «порядка $50\% X$ », следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления композиция содержит $50\% X$, в то время как в других вариантах осуществления она может содержать от 40% до $60\% X$ (т.е. $50\% \pm 10\%$).

По тексту настоящего документа термин «ген» обозначает биохимическую информацию, которая при материализации в нуклеиновой кислоте может быть транскрибирована в продукт гена, то есть в дополнительную нуклеиновую кислоту, предпочтительно в РНК, и предпочтительно также может быть преобразована в пептид или полипептид. Таким образом, данный термин также используется для обозначения участка нуклеиновой кислоты, напоминающего указанную информацию, а также последовательности такой нуклеиновой кислоты (в данном документе также именуемой «последовательностью гена»).

Также по тексту настоящего документа термин «аллель» относится к вариации гена, характеризующегося одним или более специфическими отличиями в последовательности гена по сравнению с последовательностью гена дикого типа, независимо от наличия других отличий в последовательности. Аллели или варианты нуклеотидной последовательности по изобретению включают в себя по меньшей мере, в порядке возрастания предпочтения, 30% , 40% , 50% , 60% , 70% , 71% , 72% , 73% , 74% , 75% , 76% , 77% , 78% , 79% , 80% , $81\%-84\%$, 85% , 86% , 87% , 88% , 89% , 90% , 91% , 92% , 93% , 94% , 95% , 96% , 97% , 98% или 99% нуклеотидной «идентичности последовательности» нуклеотидной последовательности гена дикого типа. Соответственно, если «аллель» относится к биохимической информации, используемой при экспрессии пептида или полипептида, соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты аллеля имеет по меньшей мере, в порядке возрастания предпочтения, 30% , 40% , 50% , 60% , 70% , 71% , 72% , 73% , 74% , 75% , 76% , 77% , 78% , 79% , 80% , $81\%-84\%$, 85% , 86% , 87% , 88% , 89% , 90% , 91% , 92% , 93% , 94% , 95% , 96% , 97% , 98% или 99%

аминокислотной «идентичности последовательности» соответствующему пептиду или полипептиду дикого типа.

Варианты белка или нуклеиновой кислоты определяются по идентичности их последовательностей по сравнению с исходным белком или нуклеиновой кислотой. Степень идентичности последовательностей обычно указывается как «процент идентичности последовательности» или «процент идентичности». Для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей на первом этапе производится попарное выравнивание этих двух последовательностей, при этом две последовательности выравниваются по их полной длине (то есть попарное глобальное выравнивание). Выравнивание осуществляется с помощью программы, реализующей алгоритм Нидлмана-Вунша (J. Mol. Biol. (1979) 48, стр. 443-453), предпочтительно с помощью программы "NEEDLE" (The European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS)) с параметрами программы по умолчанию (штраф на внесение гэпа = 10,0, штраф за продолжение гэпа = 0,5 и матрица=EBLOSUM62). Для целей настоящего изобретения предпочтительным выравниванием является такое выравнивание, при котором может быть определена наибольшая идентичность последовательностей.

В следующем примере для иллюстрации приводятся две нуклеотидных последовательности, но те же вычисления применимы и к белковым последовательностям:

Seq A: AAGATACTG длина: 9 оснований

Seq B: GATCTGA длина: 7 оснований

Таким образом, более короткая последовательность — это последовательность B.

Попарное глобальное выравнивание обеих последовательностей по полной длине дает следующее:

```
Seq A: AAGATACTG-
      ||| |||
Seq B: --GAT-CTGA
```

Символ «I» в выравнивании указывает на идентичные остатки (основания для ДНК или аминокислоты для белков). Количество идентичных остатков — 6.

Символ «-» в выравнивании указывает на гэпы. Количество гэпов, вносимых при выравнивании в последовательность В, составляет 1. Количество гэпов, вносимых при выравнивании в пограничный район последовательности В, составляет 2, а в пограничный район последовательности А – 1.

Длина участка выравнивания, показывающая выравненные последовательности по всей их длине, составляет 10.

Получение участка попарного выравнивания, который показывает более короткую последовательность по всей его длине в соответствии с изобретением, следовательно, приводит к:

```
Seq A: GATACTG-
      ||| |||
Seq B: GAT-CTGA
```

Получение участка попарного выравнивания, который показывает последовательность А по всей его длине в соответствии с изобретением, следовательно, приводит к:

```
Seq A: AAGATACTG
      ||| |||
Seq B: --GAT-CTG
```

Получение участка попарного выравнивания, который показывает последовательность В по всей его длине в соответствии с изобретением, следовательно, приводит к:

```
Seq A: GATACTG-
      ||| |||
Seq B: GAT-CTGA
```

Длина выравнивания, показывающая более короткую последовательность по всей ее длине, равна 8 (присутствует один гэп, который учитывается в длине выравнивания более короткой последовательности).

Соответственно, длина выравнивания, показывающая последовательность А по всей длине, равна 9 (что означает, что последовательность А является последовательностью по изобретению), длина выравнивания, показывающая последовательность В по всей длине, равна 8 (что означает, что последовательность В является последовательностью по изобретению).

После выравнивания двух последовательностей на втором этапе из полученного выравнивания определяется значение процента идентичности. Следовательно, в соответствии с настоящим описанием применяется следующий расчет процента идентичности:

процент идентичности = (идентичные остатки/длина области выравнивания, которая показывает соответствующую последовательность данного изобретения по всей ее длине) *100. Таким образом, в соответствии с изобретением идентичность последовательности при сравнении двух аминокислотных последовательностей вычисляется путем деления количества идентичных остатков на длину области выравнивания, которая показывает соответствующую последовательность данного изобретения по всей ее длине. Для получения процента идентичности это значение умножается на 100. Согласно приведенному выше примеру, процент идентичность составляет: для последовательности А, являющейся последовательностью по изобретению $(6/9) * 100 = 66,7 \%$; для последовательности В, являющейся последовательностью по изобретению $(6/8) * 100 = 75\%$.

Термин «гибридизация» согласно определению в настоящем документе означает процесс, при котором в значительной степени комплементарные нуклеотидные последовательности гибридизируют друг с другом. Процесс гибридизации может происходить полностью в растворе, т.е. обе взаимодействующие нуклеиновые кислоты находятся в растворе. Также процесс может проходить с участием одной из комплементарных нуклеиновых кислот, иммобилизованных в матрице, такой как магнитные гранулы, гранулы сефарозы или любой другой смолы. Процесс гибридизации, кроме того, может быть осуществлен с одной из комплементарных нуклеиновых кислот, иммобилизованной в твердой подложке, такой как нитроцеллюлоза или нейлоновая мембрана, или иммобилизованной, например, путем фотолитографии, например, на кремнийсодержащей стеклянной подложке (последние известны как нуклеиновокислотные матрицы или микроматрицы или как нуклеиновокислотные чипы). Для того чтобы осуществить возможную гибридизацию, молекулы нуклеиновой кислоты обычно термически или химически денатурируют, чтобы перевести двойную цепь в две единичные цепи и/или удалить «шпильки» или другие вторичные структуры из единичных цепных нуклеиновых кислот.

Термин «жесткость» относится к условиям, в которых протекает гибридизация. К таким условиям относятся температура, концентрация соли, ионная сила или состав буфера гибридизации. Обычно выбирают следующие условия с низкой жесткостью: 30°C ниже точки плавления (T_m) для определенной последовательности при определенной ионной силе и pH. Условия средней жесткости – 20°C ниже T_m , высокой жесткости – 10°C ниже T_m . Жесткие условия гибридизации обычно используют для выделения гибридизирующих последовательностей, которые имеют высокую степень идентичности с целевыми нуклеотидными последовательностями. Тем не менее, аминокислоты могут отклоняться в последовательности и все еще кодировать в значительной степени подобный полипептид вследствие вырожденности генетического кода. Поэтому для определения таких молекул аминокислот иногда могут быть необходимы условия средней жесткости.

T_m – это температура (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% целевой последовательности гибридизует с подобранным зондом. T_m зависит от состояния раствора, состава оснований и длины зонда. Например, более длинные последовательности гибридизуют при более высоких температурах. С наибольшей скоростью гибридизация происходит при температуре приблизительно от 16°C до 32°C ниже T_m . Наличие одновалентных катионов в растворе гибридизации уменьшает электростатическое отталкивание между двумя цепочками аминокислот, тем самым способствуя гибриднему образованию; данный эффект наблюдается при концентрациях натрия до 0,4 М (при более высоких концентрациях им можно пренебречь). Формамид уменьшает температуру плавления двойных спиралей ДНК-ДНК и ДНК-РНК на 0,6 - 0,7°C на каждый процент формамида, а добавление 50% формамида позволяет осуществить гибридизацию при 30 - 45°C, хотя скорость гибридизации будет ниже. Несоответствия пар оснований снижают скорость гибридизации и термальную стабильность двойных спиралей. В среднем и для больших зондов, T_m снижается на приблизительно 1°C на % несоответствия основания. T_m можно рассчитать по следующим формулам, в зависимости от типа гибрида:

- ДНК-ДНК гибриды (Meinkoth and Wahl, Anal. Biochem., 138: 267-284, 1984):

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 \times \log([Na^+]\{a\}) + 0.41 \times \%[G/C\{b\}] - 500 \times [L\{c\}]^{-1} - 0.61 \times \% \text{формамид}$$

- ДНК-РНК или РНК-РНК гибриды:

$$T_m = 79.8 + 18.5 (\log_{10}[\text{Na}^+]\{a\}) + 0.58 (\%G/C\{b\}) + 11.8 (\%G/C\{b\})^2 - 820/L\{c\}$$

- олиго-ДНК или олиго-РНКd гибриды:

для <20 нуклеотидов: $T_m = 2 (\{ln\})$

для 20–35 нуклеотидов: $T_m = 22 + 1.46 (\{ln\})$

причем:

{a} либо для другого однозарядного катиона, но только в диапазоне 0,01–0,4 М

{b} только для % GC в диапазоне 30% - 75%

{c} L = длина двойных спиралей в парах оснований

{d} олиго, олигонуклеотиды

{ln} эффективная длина праймера = $2 \times (N_G G/C) + (N_A A/T)$

Неспецифическое связывание может контролироваться с помощью известных технологий, например, таких как блокирование мембраны путем растворов с содержанием белка, добавление гетерологичных РНК, ДНК и SDS (додецилсульфата натрия) в буфер гибридизации, обработка рибонуклеазой. Для неродственных зондов может осуществляться серия гибридизаций путем сильного понижения температуры гибридизации (например, с 68°C до 42°C) или уменьшения концентрации формамида (например, с 50% до 0%). Специалисту известны различные параметры, которые могут изменяться во время гибридизации и которые помогут сохранить или изменить условия жесткости.

Помимо условий гибридизации, специфичность гибридизации зависит также от функции промывки после гибридизации. Чтобы убрать фон после неспецифичной гибридизации, образцы промывают в разбавленных соляных растворах. Решающие факторы промывки включают ионическую силу и температуру последнего раствора: чем более низкая концентрация соли и более высокая температура, тем выше жесткость условий промывки. Промывка обычно проводится при условиях той же жесткости, что и условия гибридизации, либо при условиях более низкой жесткости. Положительная гибридизация дает сигнал, который, по меньшей мере, в два раза превосходит фон. Обычно соответствующие жесткие условия для анализа гибридизации нуклеиновых кислот или процедур по определению амплификации генов такие же, как изложены выше. Могут быть также выбраны более или менее жесткие условия. Хорошему специалисту

известны различные параметры, которые можно изменить во время промывки и которые помогут сохранить или изменить условия напряженности.

Например, условия высокой жесткости гибридизации для гибридов ДНК, длиной более 50 нуклеотидов, включают гибридизацию при 65°C в 1 x SSC или при 42°C в 1x SSC и 50% формамида, затем промывка при 65°C в 0,3x SSC. Условия гибридизации средней жесткости для гибридов ДНК длиной более 50 нуклеотидов, включают гибридизацию при температуре 50° C в 4x SSC или при 40° C в 6 x SSC и 50% формамида, затем промывку при 50° C в 2x SSC. Длина гибрида – это предполагаемая длина гибридизируемой нуклеиновой кислоты. Когда нуклеиновые кислоты известной последовательности гибридизируются, длина гибрида определяется путем выравнивания последовательностей и определения консервативных областей, описание которых приводится в настоящем документе. 1 × SSC - 0,15 M NaCl, 15 mM цитрат тринатрия, растворы гибридизации и промывки могут также включать 5 × раствор Денхардта, 0,5 - 1,0 % SDS, 100 мкг/мл денатурированной фрагментированной ДНК-носителя, 0,5% пиррофосфат натрия. Еще один пример условий высокой жесткости – гибридизация при 65°C в растворе 0,1x SSC, содержащем 0,1 SDS и, в некоторых случаях, 5x раствора Денхардта, 100 мкг/мл денатурированной, фрагментированной ДНК из молок лососёвых, 0,5% пиррофосфата натрия, с последующей промывкой при 65°C в 0,3x SSC.

Для определения уровня жесткости условий, можно обратиться к работе Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3-е Издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, Нью-Йорк или к *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989 и ежегодные обновления).

Термин «конструкция нуклеиновой кислоты», используемый в настоящем документе, относится к одноцепочечной или двухцепочечной молекуле нуклеиновой кислоты, которая выделена из встречающегося в природе гена или модифицирована таким образом, чтобы содержать сегменты нуклеиновых кислот, которые иначе не существовали бы в природе, либо являются синтетическими.

Термин «конструкция нуклеиновой кислоты» является синонимом термина «кассета экспрессии» в случаях, когда конструкция нуклеиновой кислоты включает в себя контрольные последовательности, необходимые для экспрессии полинуклеотида.

Термин «контрольная последовательность» или «генетический контрольный элемент» определяется по тексту настоящего документа как включающие в себя все последовательности, влияющие на экспрессию полинуклеотида, включая, помимо прочего, экспрессию полинуклеотида, кодирующего полипептид. Каждая контрольная последовательность может быть нативной или чужеродной для полинуклеотида или нативной или чужеродной друг для друга. Такие контрольные последовательности включают в себя, помимо прочего, промоторную последовательность, 5'-UTR (также называемую лидерной последовательностью), сайт связывания рибосомы (RBS), 3'-UTR и сайты инициации и остановки транскрипции.

Термины «функциональная связь» или «функционально связанный» применительно к регуляторным элементам означают последовательное расположение регуляторного элемента (включая, помимо прочего, промотор) с нуклеотидной последовательностью, которая экспрессируется, и, при необходимости, дополнительных регуляторных элементов (включая, помимо прочего, терминатор) таким образом, чтобы каждый из регуляторных элементов мог выполнять соответствующую функцию, для экспрессии, модификации экспрессии, стимуляции экспрессии или влияния иным образом на экспрессию указанной нуклеотидной последовательности. Например, контрольную последовательность помещают в подходящее положение относительно кодирующей последовательности полинуклеотидной последовательности, таким образом, чтобы контрольная последовательность регулировала экспрессию кодирующей последовательности полипептида.

«Промотор» или «промоторная последовательность» представляет собой нуклеотидную последовательность, расположенную выше гена на той же цепи, что и ген, который обеспечивает транскрипцию указанного гена. За промотором, как правило, идет сайт начала транскрипции гена. Промотор распознается РНК-полимеразой (вместе с любыми необходимыми факторами транскрипции), которая иницирует транскрипцию. Функциональный фрагмент или функциональный вариант промотора представляет собой нуклеотидную последовательность, распознаваемую РНК-полимеразой и способную иницировать транскрипцию.

По тексту настоящего документа термин «изолированная молекула ДНК» обозначает молекулу ДНК, которая, по меньшей мере, частично отделена от других

молекул, обычно связанных с ней в нативном или естественном состоянии. Термин «изолированная» предпочтительно обозначает молекулу, которая, по меньшей мере, частично отделена от некоторых нуклеиновых кислот, которые обычно расположенные на концах молекулы ДНК в нативном или естественном состоянии. Таким образом, молекулы ДНК, спаянные с регуляторными или кодирующими последовательностями, с которыми они обычно не связаны, например, в результате рекомбинантных методов, по тексту настоящего документа считаются изолированными. Такие молекулы считаются изолированными, когда они интегрированы в хромосому клетки-хозяина или присутствуют в растворе нуклеиновой кислоты с другими молекулами ДНК, поскольку не находятся в своем нативном состоянии.

Как указано по тексту настоящего документа для манипулирования полинуклеотидом или его фрагментом или его отделения может быть использовано любое количество способов, известных специалистам в данной области. Например, для амплификации конкретной исходной полинуклеотидной молекулы и/или для получения вариантов исходной молекулы может быть использована технология полимеразной цепной реакции (ПЦР). Молекулы полинуклеотидов или их фрагменты также могут быть получены другими методами, такими как прямой синтез фрагмента химическими средствами, которые обычно предполагают использование автоматического синтезатора олигонуклеотидов. Полинуклеотид может быть одноцепочечным (оц) или двухцепочечным (дц). «Двухцепочечный» относится к спариванию оснований, которое происходит между достаточно комплементарными антипараллельными цепями нуклеиновой кислоты с образованием структуры двухцепочечной нуклеиновой кислоты, как правило, в физиологически значимых условиях. Варианты осуществления способа включают в себя варианты, которые отличаются тем, что полинуклеотид представляет собой, по меньшей мере, один полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из смысловой одноцепочечной ДНК (оцДНК), смысловой одноцепочечной РНК (оцРНК), двухцепочечной РНК (дцРНК), двухцепочечной ДНК (дцДНК), гибрид двухцепочечной ДНК/РНК, антисмысловая оцДНК или антисмысловая оцРНК; также может использоваться смесь полинуклеотидов любого из указанных типов.

По тексту настоящего документа термин «рекомбинантный» в отношении нуклеиновой кислоты или полипептида обозначает, что такой материал был

изменен в результате применения человеком технологии рекомбинации, например, рестрикции и лигирования полинуклеотидов, перекрывающегося расширения полинуклеотидов или геномной вставки или трансформации. Открытая рамка считывания последовательности гена является рекомбинантной, если (а) данная нуклеотидная последовательность присутствует в контексте, отличном от естественного, например, в силу того, что она (i) клонирована в любой тип искусственного вектора нуклеиновой кислоты или (ii) перемещена или скопирована в другое место исходного генома, либо если (b) нуклеотидная последовательность подвергается мутагенезу таким образом, что она отличается от последовательности дикого типа. Термин «рекомбинантный» может также относиться к организму, содержащему рекомбинантный материал, например, растение, содержащее рекомбинантную нуклеиновую кислоту, является рекомбинантным растением.

Термин «трансгенный» относится к организму, предпочтительно растению или его части, или нуклеиновой кислоте, которая содержит гетерологичный полинуклеотид. Предпочтительно, гетерологичный полинуклеотид стабильно встроен в геном, таким образом, полинуклеотид передается последующим поколениям. Гетерологичный полинуклеотид может быть встроен в геном отдельно или как часть рекомбинантной кассеты экспрессии. При использовании по тексту настоящего документа термин «трансгенный» относится к любой клетке, клеточной линии, каллусу, ткани, части растения или растению, генотип которых был изменен в результате присутствия гетерологичной нуклеиновой кислоты, включая трансгенные организмы или клетки изначально измененные таким образом, а также трансгенные организмы или клетки, созданные путем скрещивания или бесполого размножения из исходного трансгенного организма или клетки. «Рекомбинантный» организм предпочтительно означает «трансгенный» организм. При использовании по тексту настоящего документа термин «трансгенный» не включает изменения генома (хромосомные или экстрахромосомные) в результате использования обычных методов разведения растений (например, скрещивания) или в результате происходящих в природе явлений, таких как, например, самооплодотворение, случайное перекрёстное опыление, нерекомбинантная вирусная инфекция, нерекомбинантная

бактериальная трансформация, нерекомбинантная транспозиция или спонтанная мутация.

В соответствии с данным документом, понятие «мутировавший» относится к организму или нуклеиновой кислоте с изменением(-ями) в биомолекулярной последовательности его нативного генетического материала по сравнению с последовательностью генетического материала соответствующего организма или нуклеиновой кислоты дикого типа, в котором изменение(-я) генетического материала были вызваны и/или выведены человеком. К примерам действий человека для получения мутировавшего организма или ДНК относятся, помимо прочего, обработка химическим мутагеном, таким как EMS, и последующая селекция с использованием гербицидов; или обработка клеток растения рентгеновским излучением и последующая селекция с использованием гербицидов. Любой способ, известный в данной области, может использоваться для получения мутации. Способы получения мутаций могут вызывать мутации в случайных позициях в генетическом материале, либо на определенных участках генетического материала (т.е. могут использоваться техники направленного мутагенеза), такие как использование метода генопластики. В дополнение к неспецифическим мутациям согласно изобретению нуклеиновая кислота также может подвергаться мутагенезу с использованием средств мутагенеза с предпочтением или даже специфичностью в отношении конкретного сайта, тем самым создавая искусственно индуцированный наследуемый аллель по настоящему изобретению. Такие средства, например, сайт-специфические нуклеазы, включая, например, цинк-пальцевые нуклеазы (ЦПН), мегануклеазы, эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN) (Malzahn et al., Cell Biosci, 2017, 7:21), а также сгруппированные регулярно расположенные короткие интервалы палиндромные повторы/CRISPR-ассоциированная нуклеаза (CRISPR/Cas) со сконструированной crPHK/tracrPHK (например, в виде одиночной направляющей РНК или в виде модифицированных молекул крРНК и тракрРНК, которые образуют двойную направляющую молекулу), и способы использования этих нуклеаз для нацеливания на известные точки в геноме, хорошо известны в данной области (см. работы Bortesi and Fischer, 2015, Biotechnology Advances 33: 41-52; Chen and Gao, 2014, Plant Cell Rep 33: 575-583, а также ссылки, приведенные в составе указанных документов).

При использовании по тексту настоящего документа «генетически модифицированный организм» (ГМО) – это организм, генетические характеристики которого изменены действиями человека, которые привели к трансфекции, в результате которой произошла трансформация целевого организма с использованием генетического материала из другого организма или организма-источника или с использованием синтетического или модифицированного природного генетического материала или организма, являющегося его потомком, сохраняющего введенный генетический материал. Организмом-источником может быть другой тип организма (например, растение ГМО может содержать бактериальный генетический материал) или тот же тип организма (например, растение ГМО может содержать генетический материал другого растения).

По тексту настоящего документа термин «дикий тип» или «соответствующее растение дикого типа» обозначает типичную форму организма или его генетический материал в обычном виде, в отличие, например, от мутировавших и/или рекомбинантных форм. Аналогичным образом, под «контрольной клеткой», «диким типом» или «контрольным растением, тканью растения, клеткой растения или клеткой-хозяином дикого типа» подразумевается растение, ткань растения, клетка растения или клетка-хозяин, соответственно, у которых отсутствует особый нуклеотид по настоящему изобретению, описанный в настоящем документе. Понятие «дикий тип», таким образом, не подразумевает, что растение, ткань растения, клетка растения или другая клетка-хозяин не имеет рекомбинантную ДНК в геноме, и/или не имеет характеристик устойчивости к грибам, отличных от тех, которые описаны в настоящем документе.

При использовании по тексту настоящего документа термин «потомок» относится к растению любого поколения. Потомство или потомок растения может быть из любого дочернего поколения, например, F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 и т.д. В некоторых вариантах осуществления потомком является растение первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого или десятого поколения.

По тексту настоящего документа понятие «растение» используется в широком смысле, так как оно подразумевает органический материал и включает в себя эукариотические организмы, которые принадлежат к таксономической группе – царству растений, примеры которых включают в себя, помимо прочего,

однодольные и двудольные растения, сосудистые растения, овощи, хлебные злаки, цветы, деревья, травы, кусты, дерн, виноградную лозу, папоротники, мхи, грибы и водоросли и т.д., а также клоны, отростки и части растений, используемые для вегетативного размножения (например, побеги, стебли, побеги, корневища, подземные корни, группы побегов, венчики, луковицы, клубнелуковицы, клубни, растения/ткани, полученные при культивировании ткани и т.д.). За исключением случаев, когда указано иное термин «растение» относится к целому растению, любой его части или культуре клеток или тканей, полученной из растения, включая целые растения, компоненты или органы растения (например, листья, стебли, корни, и т.д.), ткани растений, семена, клетки растений и/или их потомство. Растительная клетка представляет собой биологическую клетку растения, взятую из растения или полученную путем выращивания из клетки, взятой из растения.

Растения, особенно пригодные для использования в способах согласно изобретению, включают все растения, принадлежащие царству Viridiplantae (Зеленые растения), в частности, однодольные и двудольные растения, включая кормовые бобовые культуры, декоративные растения, продовольственные культуры, деревья или кустарники, выбранные из перечня, включающего в себя *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Abelmoschus* spp., *Agave sisalana*, *Agropyron* spp., *Agrostis stolonifera*, *Allium* spp., *Amaranthus* spp., *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium graveolens*, *Arachis* spp., *Artocarpus* spp., *Asparagus officinalis*, *Avena* spp. (например, *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa* sp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsa*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (например, *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [канола, рапс масличный, репа масличная]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum* spp., *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya* spp., *Carthamus tinctorius*, *Castanea* spp., *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum* spp., *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Colocasia esculenta*, *Cola* spp., *Corchorus* sp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp., *Crocus sativus*, *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp., *Cynara* spp., *Daucus carota*, *Desmodium* spp., *Dimocarpus longan*, *Dioscorea* spp., *Diospyros* spp., *Echinochloa* spp., *Elaeis* (например, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus* sp., *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus* sp., *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp., *Fagus* spp., *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella* spp.,

Fragaria spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp. (например, *Glycine max*, *Soja hispida* или *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus* spp. (например, *Helianthus annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp. (например, *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp., *Lactuca sativa*, *Lathyrus* spp., *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus* spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus* spp., *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon* spp. (например, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), *Macrotyloma* spp., *Malus* spp., *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus* spp., *Mentha* spp., *Miscanthus sinensis*, *Momordica* spp., *Morus nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp. (например, *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus* spp., *Phleum pratense*, *Phoenix* spp., *Phragmites australis*, *Physalis* spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp., *Solanum* spp. (например, *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium* или *Solanum lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Tagetes* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale rimpau*, *Triticum* spp. (например, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum*, *Triticum monococcum* или *Triticum vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp., амарант, артишок, спаржа, брокколи, брюссельская капуста, капуста, канولا, морковь, цветная капуста, сельдерей, листовая капуста, лен, капуста кормовая, чечевица, масличный рапс, окра, лук, картофель, рис, соя, клубника, сахарная свекла, сахарный тростник, подсолнечник, томат, тыква, чай и, помимо прочего, морские водоросли. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, растение является сельскохозяйственной культурой. Примеры сельскохозяйственных культур включают сою, подсолнечник, канолу, люцерну, семена рапса, хлопок, томат, картофель обыкновенный или табак.

По настоящему изобретению целью культивации растения является получение урожая растительного материала. Условия культивации выбираются с учетом растения и могут включать в себя, например, выращивание в теплице, выращивание в поле, выращивание в гидрокультуре и выращивание на гидропонике.

Растение, далее по тексту также именуемое «растением с повышенной урожайностью», содержит ген, выбранный из Pti5, SAR8.2 и RLK2. Неожиданно было обнаружено, что указанные гены могут обеспечивать повышенную урожайность как в стандартных условиях роста, сложившихся в соответствующем районе выращивания, так и в условиях роста под воздействием патогенов, в частности, при преобладании грибковых патогенов в общем регионе, в котором выращивают растения.

Растения, содержащие ген Pti5, SAR8.2 или RLK2, помимо прочего, описаны выше в WO2013001435, WO2014076614 и WO2014024102. Тем не менее, документы не свидетельствуют о каком-либо повышении урожайности. Вместо этого основной упор в них делается на обеспечении устойчивости к грибам. Тем не менее, как видно из настоящего документа, устойчивость к грибам не является гарантией повышения урожайности. Таким образом, указанные документы содержат лишь общие технические сведения о некоторых растениях, содержащих вышеупомянутые гены, но при этом не подразумевают и даже не делают вероятной возможность повышения урожайности, как это предусмотрено настоящим изобретением.

Для целей настоящего изобретения ген Pti5 кодирует белок, который содержит, помимо прочего, домен apetala 2, как описано в PFAM PF00847, и связан с Pti5 GCC боксом, как описано в Gu et al 2002 The Plant Cell, том 14, 817–831. Предпочтительно ген Pti5 кодирует белок, аминокислотная последовательность которого имеет, по меньшей мере, 40 %, более предпочтительно, по меньшей мере, 43 %, более предпочтительно, по меньшей мере, 50 %, более предпочтительно, по меньшей мере, 58 %, более предпочтительно, по меньшей мере, 67 %, более предпочтительно, по меньшей мере, 70%, более предпочтительно, по меньшей мере, 71% идентичности последовательности с SEQ ID NO. 1, причем последовательность предпочтительно идентична SEQ ID NO. 1 составляет не более 80%, более предпочтительно не более 79%. Таким образом,

особенно предпочтительными являются растения, экспрессирующие ген Pti5, соответствующая полипептидная последовательность которого на 58-80% идентична последовательности SEQ ID NO. 1, более предпочтительно 67-79% идентичности последовательности с SEQ ID NO. 1. Необходимо понимать, что SEQ ID NO. 1 представляет собой искусственную аминокислотную последовательность, специально сконструированную в качестве матрицы для ренатурации аминокислотной последовательности. Таким образом, последовательность можно использовать для идентификации генов Pti5 независимо от того факта, что в настоящем документе не показана активность Pti5 полипептида SEQ ID NO. 1. Особенно предпочтительным геном Pti5 в способе или растении по настоящему изобретению является любая из аминокислотных последовательностей, определенных следующими идентификаторами Uniprot: PTI5_SOLLC, M1AQ94_SOLTU, A0A2G3A6U8_CAPAN, A0A2G2XEI7_CAPBA, A0A2G3D5K5_CAPCH, A0A1S4BF73_TOBAC, A0A1U7WC00_NICSY, A0A1S4A5G9_TOBAC, A0A1J6J1M1_NICAT, A0A1S2X9U7_CICAR, G7IFJ0_MEDTR, A0A2K3KXT4_TRIPR, V7BQ20_PHAVU, A0A1S3VIX3_VIGRR, A0A0L9VF85_PHAAN, A0A445GQU3_GLYSO, A0A0R0G4Q5_SOYBN, A0A061GM02_THECC, A0A445I8U7_GLYSO, A0A0D2S2G5_GOSRA, A0A4P1QVV4_LUPAN, A0A151SAR8.21_CAJCA, A0A2J6MBZ7_LACSA, A0A2K3LDZ4_TRIPR, A0A2U1QDE9_ARTAN, A0A444WYK6_ARAHY. Особенно предпочтительными по настоящему изобретению являются гены Pti5 и экспрессирующие их растения, которые кодируют полипептид, содержащий, по меньшей мере, 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, 71%, более предпочтительно, по меньшей мере, 75%, более предпочтительно, по меньшей мере, 79%, более предпочтительно не менее, по меньшей мере, 82%, более предпочтительно, по меньшей мере, 90% идентичности аминокислотной последовательности, заданной идентификатором Uniprot PTI5_SOLLC.

Для целей настоящего изобретения ген SAR8.2 кодирует белок, который содержит, помимо прочего, домен SAR8.2, как описано в PFAM PF03058. Ген SAR8.2 предпочтительно кодирует белок, аминокислотная последовательность которого имеет, по меньшей мере, 35%, более предпочтительно, по меньшей мере, 45%, более предпочтительно, по меньшей мере, 55%, более предпочтительно, по меньшей мере, 72%, более предпочтительно, по меньшей мере, 77%, более

предпочтительно, по меньшей мере, 82%, более предпочтительно, по меньшей мере, 84%, более предпочтительно, по меньшей мере, 86%, более предпочтительно, по меньшей мере, 88%, более предпочтительно, по меньшей мере, 89% идентичности последовательности с SEQ ID NO. 2, причем последовательность предпочтительно идентична SEQ ID NO. 2 составляет не более, чем на 98%, более предпочтительно не более чем на 95%. Таким образом, особенно предпочтительными являются растения, экспрессирующие ген SAR8.2, соответствующая полипептидная последовательность которого на 72-98% идентична последовательности SEQ ID NO. 1, более предпочтительно на 74-92% идентична последовательности SEQ ID NO. 2. Необходимо понимать, что SEQ ID NO. 2 представляет собой искусственную аминокислотную последовательность, специально сконструированную в качестве матрицы для ренатурации аминокислотной последовательности. Таким образом, последовательность можно использовать для идентификации генов SAR8.2 независимо от того факта, что в настоящем документе не показана активность SAR8.2 полипептида SEQ ID NO.2. Особенно предпочтительным геном SAR8.2 в способе или растении по настоящему изобретению является любая из аминокислотных последовательностей, определенных следующими идентификаторами Uniprot: Q8W2C1_CAPAN, Q9SEM2_CAPAN, A0A2G2X990_CAPBA, Q947G6_CAPAN, Q947G5_CAPAN, A0A2G2X9U8_CAPBA, A0A2G3CEJ1_CAPCH, A0A2G2X931_CAPBA, M1BEK3_SOLTU, A0A3Q7J4M2_SOLLC, A0A2G2ZTB6_CAPAN, A0A2G3CRF6_CAPCH, A0A2G2W296_CAPBA, A0A2G2WZ87_CAPBA, M1BIQ9_SOLTU, M1D489_SOLTU, M1D488_SOLTU, A0A2G2ZQ02_CAPAN, A0A1S4AM24_TOBAC, A0A1U7XJ42_NICSY, A0A1S4CJX7_TOBAC. Особенно предпочтительными по настоящему изобретению являются гены SAR8.2 и экспрессирующие их растения, которые кодируют полипептид, содержащий, по меньшей мере, 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, 68%, более предпочтительно, по меньшей мере, 88%, более предпочтительно, по меньшей мере, 91%, более предпочтительно не менее, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности, заданной идентификатором Uniprot Q8W2C1_CAPAN.

Для целей настоящего изобретения ген RLK2 кодирует белок, который содержит домен протеинтирозинкиназы, как указано в PFAM PF07714.

Предпочтительно ген RLK2 кодирует белок, аминокислотная последовательность которого имеет, по меньшей мере, 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, 65%, более предпочтительно, по меньшей мере, 69%, более предпочтительно, по меньшей мере, 72%, более предпочтительно не менее, по меньшей мере, 77%, более предпочтительно, по меньшей мере, 81% идентичности последовательности с SEQ ID NO. 3, отличающейся тем, что последовательность предпочтительно идентична SEQ ID NO. 3 не более, чем на 90%, более предпочтительно не более чем на 85%. Таким образом, особенно предпочтительными являются растения, экспрессирующие ген RLK2, соответствующая полипептидная последовательность которого на 66-90% идентична последовательности SEQ ID NO. 1, более предпочтительно на 72-85% идентична последовательности SEQ ID NO. 3. Необходимо понимать, что SEQ ID NO. 3 представляет собой искусственную аминокислотную последовательность, специально сконструированную в качестве матрицы для ренатурации аминокислотной последовательности. Таким образом, последовательность можно использовать для идентификации генов RLK2 независимо от того факта, что в настоящем документе не показана активность RLK2 полипептида SEQ ID NO.3. Особенно предпочтительным геном RLK2 в способе или растении по настоящему изобретению является любая из аминокислотных последовательностей, определенных следующими идентификаторами Uniprot: Q9FLL2_ARATH, D7MIX9_ARALL, R0H5G6_9BRAS, V4LSN6_EUTSA, A0A0D3CT78_BRAOL, A0A397YSZ3_BRACM, A0A078JM18_BRANA, M4EI74_BRARP, A0A2J6M2D4_LACSA, A0A2U1NZW7_ARTAN, A0A251SV29_HELAN, A0A251T6I8_HELAN, A0A444ZXR1_ARAHY, I1K6K6_SOYBN, A0A445KRF2_GLYSO, A0A0S3T624_PHAAN, V7CJW2_PHAVU, A0A1S3VSF7_VIGRR, A0A061G564_THECC, A0A1R3IAA5_COCAP, A0A1R3GKT2_9ROSI, A0A0D2S045_GOSRA, A0A1U8LSG2_GOSHI, A0A1S3Z3A6_TOBAC, A0A1J6KIE1_NICAT, A0A1S4API7_TOBAC, A0A1U7VRW3_NICSY, A0A3Q7HTK8_SOLLC, A0A2G2XL26_CAPBA, A0A2G3AE00_CAPAN, M1AWD0_SOLTU, A0A2G3B3F6_CAPCH, M1A1Q9_SOLTU. Особенно предпочтительными по настоящему изобретению являются гены RLK2 и экспрессирующие их растения, которые кодируют полипептид, содержащий, по меньшей мере, 55%, более предпочтительно, по меньшей мере, 72%, более предпочтительно, по меньшей мере, 80%, более предпочтительно, по меньшей

мере, 87%, более предпочтительно не менее, по меньшей мере, 92% идентичности аминокислотной последовательности, заданной идентификатором Uniprot Q9FLL2_ARATH.

Согласно настоящему изобретению растение содержит кассету экспрессии, при этом кассета экспрессии содержит указанный ген, выбранный из Pti5, SAR8.2 и RLK2. Согласно изобретению кассета экспрессии содержит соответствующий ген и контрольные последовательности, необходимые для экспрессии гена. Кассета экспрессии предпочтительно содержит, по меньшей мере, промотор и функционально связанный с ним ген, выбранный из Pti5, SAR8.2 и RLK2. Более предпочтительно кассета экспрессии также содержит терминатор в 3'-направлении ниже соответствующего гена. Примеры кассет экспрессии приведены, например, в указанных выше документах WO2013001435, WO2014076614 и WO2014024102, в частности, речь идет о примерах, которые содержат последовательности SEQ ID NO. 6, 3 и соответственно 10. Указанные кассеты экспрессии и соответствующие описания включены в текст настоящего документа посредством ссылки.

Кассета экспрессии представляет собой кассету гетерологичной экспрессии. Согласно изобретению кассета экспрессии является «гетерологичной», если выполняется любое из следующих условий: (1) Ген кодирует полипептид (Pti5, SAR8.2, RLK2 соответственно) с последовательностью, отличной от последовательности растения дикого типа; (2) ген контролируется промотором, который отсутствует в растении дикого типа или не связан с геном в растении дикого типа; (3) кассета экспрессии интегрирована в другом локусе генома растения по сравнению с растением дикого типа. Таким образом, в качестве растений с повышенной урожайностью по настоящему изобретению предпочтительно выступают трансгенные растения. Кроме того, способы по настоящему изобретению предпочтительно исключают растения, полученные исключительно при помощи существенно биологического процесса, т.е. скрещивания встречающихся в природе гамет. Это предпочтительное исключение не имеет технических причин, а сделано исключительно для того, чтобы успокоить законодателей и активные НПО. Тем не менее, предпочтительно не исключаются растения, полученные скрещиванием и отбором, по меньшей мере, одного трансгенного растения и другого растения, при условии, что потомство содержит гетерологичную кассету экспрессии.

Растения выращивают в соответствующих условиях. Выращивание растений по настоящему изобретению приводит к повышению урожайности, при этом выращивание предпочтительно осуществляется при низком воздействии патогенов. Для целей описания настоящего изобретения термин «низкое воздействие патогенов» означает нормальное воздействие патогенов в средний сезон выращивания в соответствующем месте, более предпочтительно среднее воздействие патогенов в средний сезон выращивания в Мату-Гросу. В случаях, когда воздействие патогенов превышает указанное низкое воздействие патогенов, предпочтительно обрабатывать растения фунгицидом, что позволяет поддерживать количество видимых повреждений ниже половины того, что наблюдается у контрольного растения, которое не обработано фунгицидом. Тем не менее, преимуществом настоящего изобретения является то, что урожайность может быть также увеличена при более высоком воздействии патогенов, как видно из приведенных ниже примеров. Особым преимуществом настоящего изобретения является то, что растения можно культивировать с использованием любой из общепризнанных применимых технологий выращивания, разработанных в данной области. Таким образом, изобретение преимущественно обеспечивает наличие способа, применимого в самых разнообразных условиях выращивания, включая выращивание в поле и в теплице. Таким образом, использование каждого из генов Pti5, SAR8.2 и RLK2 для повышения урожайности в любых условиях воздействия патогенов является неожиданно универсальным.

Согласно настоящему изобретению урожайность предпочтительно представляет собой один или более из следующих показателей:

- количество биомассы на единицу площади,
- количество зерна на единицу площади,
- количество семян на единицу площади.

По тексту настоящего документа термин «урожайность» обозначает количество сельскохозяйственной продукции, собранной с единицы земли. Урожайность может представлять собой совокупную биомассу, собранную с определенной площади, совокупное количество зерна, собранное с определенной площади, совокупное количество семян, собранное с определенной площади. Урожайность может измеряться в любых единицах, например, в метрических тоннах на гектар или в бушелях на акр. Урожайность корректируется с учетом

влажности собранного материала, при этом влажность измеряется в момент сбора урожая в собранной биомассе, зерне или, соответственно, семенах. Например, влажность семян сои предпочтительно составляет 15%.

Как указано выше, повышение урожайности измеряется относительно урожайности, полученной в случае с контрольным растением. Контрольное растение представляет собой растение, которое не имеет указанное выше кассеты экспрессии, но в остальном выращивается в идентичных условиях. Повышение урожайности определяют по урожайности «растения повышенной урожайности», содержащего указанные кассеты гетерологичной экспрессии, по сравнению с контрольным растением того же вида или, в соответствующих случаях, сорта, где контрольное растение не содержит указанную кассету гетерологичной экспрессии.

Следует понимать, что в случаях, когда делается ссылка на урожайность или обработку «растения», предпочтительно не определять урожайность и не выполнять обработку на одном растении по сравнению с одним контрольным растением. Вместо этого урожайность определяется на основе урожайности группы растений, предпочтительно группы из, по меньшей мере, 1000 растений, предпочтительно при выращивании растений на поле или в теплице. Наиболее предпочтительно урожайность определяют для поля монокультуры, по меньшей мере, 1 га растения и, соответственно, поля монокультуры, по меньшей мере, 1 га контрольного растения. Соответственно, обработку предпочтительно выполняют в отношении данной группы растений.

С учетом приведенных выше преимуществ, изобретение также относится к сельскохозяйственному способу повышения урожайности растения по сравнению с контрольным растением, включающему выращивание растения, содержащего кассету гетерологичной экспрессии, содержащую ген, выбранный из Pti5, SAR8.2 и RLK2, при этом во время выращивания растения количество обработок пестицидами за вегетационный период уменьшается, по меньшей мере, на одну по сравнению с контрольным растением, предпочтительно, по меньшей мере, на две. Стандартная сельхозпрактика предусматривает формирование схем обработки пестицидами для каждого региона произрастания растений. Например, в Бразилии общепринятая практика может предусматривать проведение первой обработки растений сои фунгицидами на 8-й день после посева, а второй – на 16-й день после посева. В других регионах может использоваться схема, которая не зависит

исключительно от времени роста, а, например, учитывает первичное выявление вредителя или превышение порога встречаемости вредителя. Отдельным и неожиданным преимуществом настоящего изобретения является то, что количество обработок пестицидами за сезон выращивания по сравнению с контрольным растением может быть уменьшено. Особенно неожиданным оказался тот факт, что сокращение количества обработок не только может не приводить к сокращению урожайности, а и наоборот, агротехнический способ в соответствии с изобретением преимущественно позволяет сохранять урожайность на прежнем уровне или даже повышать ее несмотря на сокращение количества обработок. Это существенно повышает экономическую эффективность выращивания растений в соответствии с настоящим изобретением. Конечно, пестицид предпочтительно применяют в пестицидно эффективных количествах.

Способы по настоящему изобретению предпочтительно обеспечивают повышенную урожайность по сравнению с контрольным растением в отсутствие или, что более предпочтительно, в присутствии патогена (также именуемого по текст настоящего документа «вредителем»). Особым преимуществом является то, что повышение урожайности согласно изобретению обеспечивается не только в различных климатических условиях, благоприятных для выращивания растений, повышение урожайности согласно изобретению также последовательно фиксируется в большинстве условий. Таким образом, признак «повышение урожайности» согласно изобретению является удивительно устойчивым в условиях стресса, возникающего под действием вредителей. Согласно изобретению, факторы стресса, за исключением стресса, возникающего под действием вредителей, предпочтительно нейтрализуются при помощи традиционных методов выращивания. Например, стресс от азотного голодания предпочтительно устраняется за счет внесения удобрений, а стресс от нехватки воды предпочтительно минимизируется поливом.

Согласно изобретению вредитель предпочтительно представляет собой или содержит, по меньшей мере, один грибковый вредитель, предпочтительно биотрофный или геминекротрофный грибок, более предпочтительно ржавчинный грибок. Если в процессе выращивания растение также находится под угрозой стресса, возникающего под воздействием других патогенов, напр., нематод или насекомых, с такими другими вредителями предпочтительно бороться за счет

обработки соответствующими пестицидами. Таким образом, согласно изобретению, как указано выше, количество обработок фунгицидами предпочтительно уменьшается, независимо от других обработок пестицидами. Фунгицид предпочтительно применяют в фунгицидно эффективных количествах. Фунгицид можно смешивать с другими пестицидами и ингредиентами, предпочтительно выбранными из инсектицидов, нематоцидов и акарицидов, гербицидов, регуляторов роста растений и удобрений. В качестве предпочтительных компонентов для смешивания выступают инсектициды, нематоциды и фунгициды. Особенно предпочтительно во время выращивания растения уменьшить количество обработок фунгицидами за вегетационный период, по меньшей мере, на одну обработку по сравнению с контрольным растением, предпочтительно, по меньшей мере, на две. Фунгициды могут включать в себя 2-(тиоцианатометилтио)-бензотиазол, 2-фенилфенол, сульфат 8-гидроксихинолина, аметоктрадин, амисульбром, антимицин, *Ampelomyces quisqualis*, азаконазол, азоксистробин, *Bacillus subtilis*, штамм QST713 *Bacillus subtilis*, беналаксил, беномил, бентиаваликарб-изопропил, бензилам. инобензол - сульфонатная (BABS) соль, бикарбонаты, бифенил, бисмертиазол, битертанол, биксафен, бластицидин-S, бура, бордоская жидкость, боскалид, бромуконазол, бупиримат, полисульфид кальция, каптафол, каптан, карбендазим, карбоксин, карпропамид, карвон, хлазафенон, хлоронеб, хлороталонил, хлоролинат, *Coniothyrium minitans*, гидроксид меди, октаноат меди, оксихлорид меди, сульфат меди, сульфат меди (трехосновный), оксид меди, циазофамид, цифлуфенамид, цимоксанил, ципроконазол, ципродинил, дазомет, дебакарб, диаммоний этиленбис-(дитиокарбамат), дихлофлуанид, дихлорофен, диклоцимет, дикломезин, дихлоран, диетофэнкарб, дифеноконазол, дифензокват-ион, дифлуметорим, диметоморф, димоксистробин, диниконазол, диниконазол-М, динобутон, динокап, дифениламин, дитианон, додеморф, додеморф ацетат, додин, додина свободное основание, эдифенфос, энестробин, энестробурин, эпоксиконазол, этабоксам, этоксихин, этридиазол, фамоксадон, фенамидон, фенаримол, фенбуконазол, фенфурам, фенгексамид, феноксанил, фенпиклонил, фенпропидин, фенпропиморф, фенпиразамин, фентин, фентина ацетат, фентина гидроксид, фербам, феримзон, флуазилам, флудиоксонил, флуиндапир, флуморф, флуопиколид, флуопирам, фторимид, флуоксастробин, флухинконазол, флусилазол, флусульфамид, флутианил, флутоланил, флутриафол,

флуксапироксад, фолпет, формальдегид, фосетил, фосетил-алюминий, фуберидазол, фуралаксил, фураметпир, гуазатин, ацетаты гуазатина, GY-81, гексахлорбензол, гексаконазол, химексазол, имазалил, имазалил сульфат, имибенконазол, иминоктадин, иминоктадин триацетат, иминоктадин трис (альбесилат), йодокарб, ипконазол, ипфенпиразолон, ипробенфос, ипродион, ипроваликарб, изопротиолан, изофетамид, изопиразам, изотианил, касугамицин, касугамицин гидрохлорид гидрат, крезоксим-метил, ламинарин, манкоппер, манкоцеб, мандипропамид, манеб, мефеноксам, мепанипирим, мепронил, мептилдинокап, хлорид ртути, оксид ртути, хлорид ртути, металаксил, металаксил-М, метам, метам-аммоний, метам-калий, метам-натрий, метконазол, метасульфоккарб, метилйодид, метилизотиоцианат, метирам, метоминостробин, метрафенон, милдиомицин, миклобутанил, набам, нитротал-изопропил, нуаримол, октилинон, офураце, олеиновая кислота (жирные кислоты), оризастробин, оксадиксил, оксатиапипролин, оксин-медь, окспоконазола фумарат, оксикарбоксин, пефуразоат, пенконазол, пенцикурон, пенфлуфен, пентахлорфенол, пентахлорфенил лаурат, пентиопирад, ацетат фенилртути, фосфоновая кислота, фталид, пикоксистробин, полиоксин В, полиоксины, полиоксорим, бикарбонат калия, гидроксифинолинсульфат калия, пробеназол, прохлораз, процимидон, пропамокарб, гидрохлорид пропамокарба, пропиконазол, пропинеб, прохиназид, пидифлуметофен, протиокконазол, пиракlostробин, пираметостробин, пираоксистробин, пиразифлюмид, пиразофос, пирибенкарб, пирибутикарб, пирифенокс, пириметанил, пириофенон, пирохилон, хинокламин, хиноксифен, квинтозен, экстракт *Reynoutria sachalinensis*, седаксан, силтиофам, симеконазол, 2-фенилфеноксид натрия, бикарбонат натрия, пентахлорфеноксид натрия, спироksamин, сера, SYP-Z048, дегтярные масла, тебуконазол, тебуфлохин, текназен, тетраконазол, тиабендазол, тифлузамид, тиофанат-метил, тирам, тиадинил, толклофос- метил, толилфлуанид, триадимефон, триадименол, триазоксид, трициклазол, тридеморф, трифлуксистробин, трифлумизол, трифорин, тритиконазол, валидамицин, валифеналат, валифенал, винклозолин, цинеб, зирам, зоксамид, *Candida oleophila*, *Fusarium oxysporum*, *Gliocladium* spp., *Phlebiopsis* гигантская, стрептомицеты *griseoviridis*, *Trichoderma* spp., (RS)-N-(3,5-дихлорфенил)-2-(метоксиметил)сукцинимид, 1,2-дихлорпропан, 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетрафторацетона гидрат, 1-хлор-2,4-динитронафталин, 1-хлор-2-нитропропан, 2-(2-гептадецил-2-имидазолин-1-ил)этанол, 2,3-дигидро-5-фенил-

1,4-дитиин 1,1,4,4-тетраоксид, 2-метоксиэтилацетат ртути, 2-метоксиэтилртутьхлорид, 2-метоксиэтилсиликат ртути, 3-(4-хлорфенил)-5-метилроданин, 4-(2-нитропроп-1-енил)фенилтиоцианатом, аминопирифен, ампропилфос, анилазин, азитирам, полисульфид бария, Bayer 32394, беноданил, бенхинокс, бенталурон, бензамакрил; бензамакрил-изобутил, бензаморф, бензовиндифлупир, бинапакрил, бис(метилртуть)сульфат, бис(трибутилолово)-оксид, бутиобат, кадмий, кальций, медь, цинк, хромат сульфат, карбаморф, СЕСА, хлобентиазон, хлораниформетан, хлорфеназол, хлорхинокс, климбазол, бис(3-фенилсалицилат), хромат меди цинка, кумоксистробин, куфранеб, сульфат гидразиния меди, купробам, циклофурамид, ципендазол, ципрофурам, декафентин, дихлобентиазокс, дихлон, дихлозолин, диклобутразол, диметиримол, диноктон, диносульфен, динотербон, дипиметитрон, дипиритион, диталимфос, додидин, дразоксолон, ЕВР, эноккастробин, ЕSBP, этаконазол, этем, этирим, фенаминосульф, фенаминстробин, фенапанил, фенитропан, фенпиоксамид, флуиндапир, флуопимомид, флуотримазол, флуфеноксистробин, фуркарбанил, фурконазол, фурконазол-цис, фурмециклокс, фуранфанат, глиодин, гризеофульвин, галакринат, Hercules 3944, гексилтиофос, ICIA0858, инпирфлюксам, ипфентрифлуконазол, ипфлуфенохин, изофетамид, изофлуципрам, изопамфос, изоваледион, мандестробин, мебенит, мекарбинзид, мефентрифлуконазол, метацоксолон, метфуроксам, метилртуть дициандиамид, метсульфовакс, метилтетрапрол, милнеб, мукохлорангидрид, миклозолин, Н-3, 5-дихлорфенилсукцинимид, N-3-нитрофениллитаконимид, натамицин, N-этилмеркурио-4-толуолсульфанилид, бис(диметилдитиокарбамат) никеля, ОСН, оксатиапипролин, диметилдитиокарбамат фенилртути, нитрат фенилртути, фосфифен, пикарбутразокс, протиокарб; протиокарба гидрохлорид, пидифлуметофен, пиракарболид, пирапропоин, пиразирумид, пиридахлометил, пиридинитрил, пиризоксазол, пироксихлор, пироксифур, хинацетол, хинацетолсульфат, хиназамид, хинконазол, хинофумелин, рабензазол, салициланилид, SSF-109, сультропен, текорам, тиадифлю или тициофен, тиохлорфенфим, тиофанат, тиохинокс, тиоксимид, триамифос, триаримол, триазбутил, трихламид, триклопирикарб, трифлумезопирим, урбацид, зариламид, а также их любые комбинации.

Патоген согласно изобретению предпочтительно представляет собой гриб или грибоподобный организм типа Ascomycota, Basidiomycota или Oomycota, более предпочтительно типа Basidiomycota, еще более предпочтительно подтипа Pucciniomycotina, еще более предпочтительно класса Pucciniomycetes, еще более предпочтительно подкласса Pucciniales, еще более предпочтительно из семейства Chaconiaceae, Coleosporiaceae, Cronartiaceae, Melampsoraceae, Mikronegeriaceae, Phakopsoraceae, Phragmidiaceae, Pileolariaceae, Pucciniaceae, Pucciniastraceae, Pucciniosiraceae, Raveneliaceae, Sphaerophragmiaceae или Uropyxidaceae,

еще более предпочтительно рода Rhizoctonia, Maravalia, Ochropsora, Olivea, Chrysomyxa, Coleosporium, Diaphanopellis, Cronartium, Endocronartium, Peridermium, Melampsora, Chrysocelis, Mikronegeria, Arthuria, Batistopsora, Cerotelium, Dasturella, Phakopsora, Prospodium, Arthuriomyces, Catenulopsora, Gerwasia, Gymnoconia, Hamaspora, Kuehneola, Phragmidium, Trachyspora, Triphragmium, Atelocauda, Pileolaria, Racospermyces, Uromycladium, Allodus, Ceratocoma, Chrysocyclus, Cumminsiella, Cystopsora, Endophyllum, Gymnosporangium, Miyagia, Puccinia, Puccorchidium, Roestelia, Sphenorchidium, Stereostratum, Uromyces, Hyalopsora, Melampsorella, Melampsoridium, Milesia, Milesina, Naohidemycus, Pucciniastrum, Thekopsora, Uredinopsis, Chardonella, Dietelia, Pucciniosira, Diorchidium, Endoraecium, Kernkampella, Ravenelia, Sphenospora, Austropuccinia, Nyssopsora, Sphaerophragmium, Dasyspora, Leucotelium, Macruropyxis, Porotenus, Tranzschelia или Uropyxis,

еще более предпочтительно видов Rhizoctonia alpina, Rhizoctonia bicornis, Rhizoctonia butinii, Rhizoctonia callae, Rhizoctonia carotae, Rhizoctonia endophytica, Rhizoctonia floccosa, Rhizoctonia fragariae, Rhizoctonia fraxini, Rhizoctonia fusispora, Rhizoctonia globularis, Rhizoctonia gossypii, Rhizoctonia muneratii, Rhizoctonia papayae, Rhizoctonia quercus, Rhizoctonia repens, Rhizoctonia rubi, Rhizoctonia silvestris, Rhizoctonia solani,

Phakopsora ampelopsidis, Phakopsora apoda, Phakopsora argentinensis, Phakopsora cherimoliae, Phakopsora cingens, Phakopsora coca, Phakopsora crotonis, Phakopsora euvitis, Phakopsora gossypii, Phakopsora hornotina, Phakopsora jatrophiicola, Phakopsora meibomia, Phakopsora meliosmae, Phakopsora meliosmaemyrianthae, Phakopsora montana, Phakopsora muscadinae, Phakopsora myrtacearum, Phakopsora nishidana, Phakopsora orientalis, Phakopsora pachyrhizi, Phakopsora

phyllanthi, *Phakopsora tecta*, *Phakopsora uva*, *Phakopsora vitis*, *Phakopsora ziziphi-vulgaris*,

Puccinia abrupta, *Puccinia acetosae*, *Puccinia achnatheri-sibirici*, *Puccinia acroptili*, *Puccinia actaeae-agropyri*, *Puccinia actaeae-elymi*, *Puccinia antirrhini*, *Puccinia argentata*, *Puccinia arrhenatheri*, *Puccinia arrhenathericola*, *Puccinia artemisiae-keiskeanae*, *Puccinia arthrocnemi*, *Puccinia asteris*, *Puccinia atra*, *Puccinia aucta*, *Puccinia ballotiflora*, *Puccinia bartholomaei*, *Puccinia bistortae*, *Puccinia cacabata*, *Puccinia calcitrapae*, *Puccinia calthae*, *Puccinia calthicola*, *Puccinia calystegiae-soldanellae*, *Puccinia canaliculata*, *Puccinia caricis-montanae*, *Puccinia caricis-stipatae*, *Puccinia carthami*, *Puccinia cerinthes-agropyrina*, *Puccinia cesatii*, *Puccinia chrysanthemi*, *Puccinia circumdata*, *Puccinia clavata*, *Puccinia coleataeniae*, *Puccinia coronata*, *Puccinia coronati-agrostidis*, *Puccinia coronati-brevispora*, *Puccinia coronati-calamagrostidis*, *Puccinia coronati-hordei*, *Puccinia coronati-japonica*, *Puccinia coronati-longispora*, *Puccinia crotonopsidis*, *Puccinia cynodontis*, *Puccinia dactylidina*, *Puccinia dietelii*, *Puccinia digitata*, *Puccinia distincta*, *Puccinia duthiae*, *Puccinia emaculata*, *Puccinia erianthi*, *Puccinia eupatorii-columbiani*, *Puccinia flavenscentis*, *Puccinia gastrolobii*, *Puccinia geitonoplesii*, *Puccinia gigantea*, *Puccinia glechomatis*, *Puccinia helianthi*, *Puccinia heterogenea*, *Puccinia heterospora*, *Puccinia hydrocotyles*, *Puccinia hystereum*, *Puccinia impatientis*, *Puccinia impedita*, *Puccinia imposita*, *Puccinia infra-aequatorialis*, *Puccinia insolita*, *Puccinia justiciae*, *Puccinia klugkistiana*, *Puccinia knersvlaktensis*, *Puccinia lantanae*, *Puccinia lateritia*, *Puccinia latimamma*, *Puccinia liberta*, *Puccinia littoralis*, *Puccinia lobata*, *Puccinia lophatheri*, *Puccinia loranthicola*, *Puccinia menthae*, *Puccinia mesembryanthemi*, *Puccinia meyeri-albertii*, *Puccinia miscanthi*, *Puccinia miscanthidii*, *Puccinia mixta*, *Puccinia montanensis*, *Puccinia morata*, *Puccinia morthieri*, *Puccinia nitida*, *Puccinia oenantes-stoloniferae*, *Puccinia operta*, *Puccinia otzeniani*, *Puccinia patriniae*, *Puccinia pentstemonis*, *Puccinia persistens*, *Puccinia phyllostachydis*, *Puccinia pittieriana*, *Puccinia platyspora*, *Puccinia pritzeliana*, *Puccinia prostii*, *Puccinia pseudodigitata*, *Puccinia pseudostriiformis*, *Puccinia psychotriae*, *Puccinia punctata*, *Puccinia punctiformis*, *Puccinia recondita*, *Puccinia rhei-undulati*, *Puccinia rupestris*, *Puccinia senecionis-acutiformis*, *Puccinia septentrionalis*, *Puccinia setariae*, *Puccinia silvatica*, *Puccinia stipina*, *Puccinia stobaeae*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia striiformoides*, *Puccinia stylidii*, *Puccinia substriata*, *Puccinia suzutake*, *Puccinia taeniatheri*, *Puccinia tageticola*, *Puccinia tanacetii*, *Puccinia tatarinovii*, *Puccinia tetragoniae*, *Puccinia thaliae*, *Puccinia thlaspeos*, *Puccinia tillandsiae*, *Puccinia*

tiritea, *Puccinia tokyensis*, *Puccinia trebouxii*, *Puccinia triticina*, *Puccinia tubulosa*, *Puccinia tulipae*, *Puccinia tumidipes*, *Puccinia turgida*, *Puccinia urticae-acutae*, *Puccinia urticae-acutiformis*, *Puccinia urticae-caricis*, *Puccinia urticae-hirtae*, *Puccinia urticae-inflatae*, *Puccinia urticata*, *Puccinia vaginatae*, *Puccinia virgata*, *Puccinia xanthii*, *Puccinia xanthosiae*, *Puccinia zoysiae*,

более предпочтительно видов *Phakopsora pachyrhizi*, *Puccinia graminis*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia hordei* или *Puccinia recondita*, более предпочтительно рода *Phakopsora* и наиболее предпочтительно *Phakopsora pachyrhizi*. Как указано выше, грибы данных таксонов приводят к существенному снижению урожайности сельскохозяйственных культур. То же, в частности, относится к ржавчинным грибам рода *Phakopsora*. Таким образом, преимуществом настоящего изобретения является то, что способ позволяет сократить количество обработок фунгицидами для *Phrakopsora pachyrhizi*, как указано в тексте настоящего документа.

Согласно изобретению предпочтительно, чтобы растение было культурным растением, предпочтительно двудольным, более предпочтительно растением подкласса *Fabales*, более предпочтительно растением семейства *Fabaceae*, более предпочтительно растением триба *Phaseoleae*, более предпочтительно рода *Amphicarpeae*, *Cajanus*, *Canavalia*, *Dioclea*, *Erythrina*, *Glycine*, *Arachis*, *Lathyrus*, *Lens*, *Pisum*, *Vicia*, *Vigna*, *Phaseolus* или *Psophocarpus*, еще более предпочтительно видов *Amphicarpeae bracteata*, *Cajanus cajan*, *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia ensiformis*, *Canavalia gladiata*, *Dioclea grandiflora*, *Erythrina latissima*, *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus maculatus*, *Psophocarpus tetragonolobus*, *Vigna angularis*, *Vigna mungo*, *Vigna unguiculata*, *Glycine albicans*, *Glycine aphyonota*, *Glycine arenaria*, *Glycine argyrea*, *Glycine canescens*, *Glycine clandestina*, *Glycine curvata*, *Glycine cyrtoloba*, *Glycine dolichocarpa*, *Glycine falcata*, *Glycine gracei*, *Glycine hirticaulis*, *Glycine lactovirens*, *Glycine latifolia*, *Glycine latrobeana*, *Glycine microphylla*, *Glycine peratosa*, *Glycine pindanica*, *Glycine pullenii*, *Glycine rubiginosa*, *Glycine stenophita*, *Glycine syndetika*, *Glycine tabacina*, *Glycine tomentella*, *Glycine gracilis*, *Glycine max*, *Glycine max* x *Glycine soja*, *Glycine soja*, более предпочтительно видов *Glycine gracilis*, *Glycine max*, *Glycine max* x *Glycine soja*, *Glycine soja*, наиболее предпочтительно видов *Glycine max*. Как указано в тексте настоящего документа, особенно хорошее повышение урожайности наблюдается в случае с соей.

В дополнение к кассете гетерологичной экспрессии культура может содержать один или несколько дополнительных гетерологичных элементов. Например, трансгенные объекты сои, содержащие гены устойчивости к гербицидам, например, помимо прочего, включают в себя GTS 40-3-2, MON87705, MON87708, MON87712, MON87769, MON89788, A2704-12, A2704-21, A5547-127, A5547-35, DP356043, DAS44406-6, DAS68416-4, DAS-81419-2, GU262, SYHT0H2, W62, W98, FG72 и CV127; трансгенные объекты сои, содержащие гены инсектицидных белков, включают в себя, например, помимо прочего, MON87701, MON87751 и DAS-81419. С использованием трансгенов были получены культурные растения с содержанием модифицированного масла: gm-fad2-1, Pj.D6D, Nc.Fad3, fad2-1A и fatb1-A. Примерами событий сои, содержащих, по меньшей мере, один из указанных генов, являются: 260-05, MON87705 и MON87769. Растения, обладающие указанными отдельными признаками или более сочетающимися признаками, а также гены и события, обеспечивающие наличие этих признаков, известны специалистам. Например, подробная информация о мутагенизированных или интегрированных генах и соответствующих объектах доступна на веб-сайтах Международной службы по сбору сведений о применении биотехнологий в сельском хозяйстве (International Service for the Acquisition of Agri. biotech Applications) (ISAAA) (<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase>) и Центра оценки риска для окружающей среды (the Center for Environmental Risk Assessment) (CERA) (<http://cera-qmc.org/GMCropDatabase>). Дополнительную информацию о конкретных объектах и способах их обнаружения можно найти для объектов сои H7-1, MON89788, A2704-12, A5547-127, DP305423, DP356043, MON87701, MON87769, CV127, MON87705, DAS68416-4, MON87708, MON87712, SYHT0H2, DAS81419, DAS81419 x DAS44406-6, MON87751 in WO04/074492, WO06/130436, WO06/108674, WO06/108675, WO08/054747, WO08/002872, WO09/064652, WO09/102873, WO10/080829, WO10/037016, WO11/066384, WO11/034704, WO12/051199, WO12/082548, WO13/016527, WO13/016516, WO14/201235.

Кассета гетерологичной экспрессии согласно изобретению предпочтительно содержит ген, выбранный из Pti5, SAR8.2 и RLK2 и функционально связанный с любым из

- а) конститутивно активного промотора,

- b) тканеспецифического или тканепредпочтительного промотора,
- c) промотора, индуцируемого воздействием на растение вредителем, предпочтительно грибковым вредителем.

Конститутивно активный промотор обеспечивает в растении базовую экспрессию гена Pti5, SAR8.2 или RLK2 соответственно. Тканеспецифический или тканепредпочтительный промотор обеспечивает такую базальную экспрессию исключительно или преимущественно в соответствующей ткани. А индуцируемый промотор обеспечивает быструю активацию экспрессии при воздействии вредителя на растение, тем самым обеспечивая быструю реакцию. Наиболее предпочтительно, когда в рамках способа по настоящему изобретению растение содержит ген, выбранный из Pti5, SAR8.2 и RLK2, в двух копиях, где одна копия контролируется конститутивно активным промотором, тканеспецифическим или тканепредпочтительным промотором, а другая копия контролируется индуцируемым промотором, предпочтительно промотором, индуцируемым воздействием грибкового патогена, наиболее предпочтительно *Phakopsora pachyrhizi*. Таким образом, реализуется относительно низкая базальная экспрессия гена, с сохранением метаболических ресурсов, в то время как, при необходимости, защита от значительного воздействия вредителей повышается, в результате чего задействуются метаболические ресурсы для экспрессии гена, главным образом при значительном уровне стресса.

Изобретение также предусматривает способ получения гибридного растения с улучшенной урожайностью по сравнению с контрольным растением, включающий

- i) предоставление первого растительного материала, содержащего кассету гетерологичной экспрессии, содержащую ген, выбранный из Pti5, SAR8.2 и RLK2, и второго растительного материала, не содержащего указанную кассету гетерологичной экспрессии,
- ii) получение поколения F1 в результате скрещивания первого и второго растительного материала, и
- iii) выбор одного или более представителей поколения F1, которые содержат указанную кассету гетерологичной экспрессии.

Особым преимуществом настоящего изобретения является то, что способы по настоящему изобретению не предусматривают необходимость наличия

гомозиготных растений, экспрессирующих ген, выбранный из Pti5, SAR8.2 и RLK2, но при этом также применимы к гемизиготным или гетерозиготным растениям. Соответственно, способ получения гибридов по настоящему изобретению предпочтительно позволяет получить гибридные растения, содержащие как предпочтительную кассету гетерологичной экспрессии по настоящему изобретению, так и предпочтительные признаки второго растительного материала. Таким образом, способ получения гибридов согласно настоящему изобретению позволяет с минимальными усилиями получать гибриды, адаптированные к ожидаемым условиям выращивания в течение следующего сезона выращивания.

Далее по тексту настоящего документа изобретение характеризуется примерами и выбранными предпочтительными вариантами осуществления. Ни примеры, ни выбранные варианты осуществления не ставят целью ограничить предмет формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение трансформированных растений сои

Все этапы, ведущие к получению и первой оценке трансформированных растений сои, описаны в тексте настоящего документа:

- Выделение или синтез соответствующих генов
- Генерация векторов для трансформации растений
- Трансформация соответствующих векторов в растениях сои
- Оценка устойчивости трансформированных растений к ржавчинному

грибу сои

описаны в

WO2014118018 (ген устойчивости: EIN2), Примеры 2, 3 и 6

WO2013149804 (ген устойчивости: ACD), Примеры 2, 3 и 6

WO2013001435 (ген устойчивости: Pti5), Примеры 2, 3 и 6

WO2014076614 (ген устойчивости: SAR8.2), Примеры 2, 3 и 6

WO2014024079 (ген устойчивости: RLK2), Примеры 2, 3 и 6.

Если перечисленные выше документы относятся к нескольким способам трансформации в Примере 3, результаты по урожайности и устойчивости к

Phakopsora pachyrhizi были получены независимо от используемого способа трансформации.

По результатам оценки устойчивости к ржавчине сои в поколениях T0 и/или T1 для дальнейшего анализа были отобраны наиболее резистентные и фенотипически наиболее привлекательные 3-5 объектов.

Для полевых испытаний использовали гомозиготные семена T2 или T3. Для получения гомозиготных семян, высаживали семена I, расщепляющие T1, из выбранных 3-5 объектов на конструктор. Отдельные растения, которые являлись гомозиготными по трансгену, отбирали с использованием ПЦР-теста TaqMan®, как описано производителем теста (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США 02451).

10-30 гомозиготных растений на объект выращивали в стандартных условиях (12-часовой световой день, 25°C) с самоопылением (инбридинг). Созревшие гомозиготные семена собирали приблизительно через 120 суток после посева. Собранные семена всех 10-30 гомозиготных растений на объект объединяли в одну партию.

Пример 2: Полевые испытания

Гомозиготные семена по 3-5 объектов на конструкцию испытывали в полевых условиях на резистивность к ржавчине сои, урожайность и агрономическую эффективность.

Полевые испытания выполнялись в Бразилии на трех участках в штатах Сан-Паулу, Минас-Жерайс и Мату-Гросу. Полевые испытания проводили в зависимости от погодных условий в ноябре или начале декабря (сезон сафра) или в начале февраля (сезон сафринья) для получения инокулята азиатской ржавчины сои.

Материал испытывали на разделенных делянках (2 м длиной, 4 ряда на делянке), с 3-4-кратным повторением на объект и место проведения испытания. Полевые испытания для проверки характеристик признаков выращивали с использованием стандартной агротехники, т.е. предпринимали меры для борьбы с сорняками и насекомыми и внесения удобрений, но не выполняли обработку фунгицидами для борьбы с грибковыми заболеваниями.

В качестве контрольных использовали порядка 10% делянок. В зависимости от порядка проведения испытания в качестве контрольной использовали нетрансформированную материнскую линию дикого типа или партию семян, собранных от нуль-сегрегантов, выращенных параллельно с трансгенными материнскими растениями (см. выше).

Пример 3: Оценка на предмет острой реакции на инфекцию

Оценку инфекции на предмет острой реакции на заболевание выполняли специалисты на основе схемы, Godoy et al (Годой и др.) (2006) (цитата Godoy, C., Koga, L., Canteri, M. (Годой, С., Кога, Л., Кантери, М.) (2006) Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity, Fitopatologia (Схематическая шкала оценки степени поражения ржавчиной сои, Fitopatologia) Brasileira 31(1)). Brasileira 31(1)).

Оценку трех уровней растительного покрова (нижний, средний и верхний) выполняли независимо, и среднее значение заражения всех трех уровней растительного покрова считалось инфекцией. Всего проводили 4-7 оценок, начиная с раннего начала болезни и повторяя преимущественно каждые 6-8 дней. Если погода не способствовала развитию болезни, промежуток между 2 оценками увеличивался.

Для устранения эффектов вставки трансгена, которые зависят исключительно от локуса интеграции, на каждое полевое испытание высаживали от 3 до 5 независимых трансгенных объектов.

Для сравнения хода заболевания для различных объектов в течение сезона, мы рассчитали кривую зависимости развития заболевания от площади (КЗРЗП) (для справки см.: М. Дж. Джегер и С.Л.Х. Вильянен-Роллинсон (M.J. Jeger and S.L.H. Viljanen-Rollinson) (2001 г.) Использование кривой зависимости развития заболевания от площади (КЗРЗП) для количественной оценки устойчивости сортов сельскохозяйственных культур к болезням, The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars Theor Appl Genet 102:32–40.)

Для расчета относительной устойчивости к болезням использовали следующую формулу:

Относительная устойчивость к болезням = $(\text{КЗРЗП(контрольн.)} / \text{КЗРЗП(объект)} - 1) * 100\%$

Относительную устойчивость к болезням на уровне гена (конструкции) рассчитывали путем усреднения относительной устойчивости к болезням (на основе приведенной выше формулы) 3-5 объектов, экспрессирующих один и тот же ген (= одна и та же конструкция).

Поскольку заболеваемость и тяжесть поражения ржавчиной сои в значительной степени зависят от условий окружающей среды, полевые испытания проводили в 2-3 разных местах и в течение до 5 сезонов. Значимость результатов определяли на основе среднего эффекта для разных участков и сезонов.

Средняя относительная устойчивость к болезням на уровне гена/конструкции на разных участках и по годам приведена в таблице ниже.

	Участок 1 Сезон 1	Участок 2 Сезон 1	Участок 1 Сезон 2	Участок 1 Сезон 3	Участок 2 Сезон 3	Участок 1 Сезон 4	Участок 2 Сезон 4	Участок 1 Сезон 5	Участок 2 Сезон 5	Участок 3 Сезон 5	Средн. значение
CaSAR	2,9%	-3,6%	13,9%			0,7%	5,1%				3,78%
Pti5				86,0%	13,7%	31,6%	5,7%				34,22%
RLK2			-3,0%	3,0%	-3,5%	0,1%	-0,1%	-1,3%	8,9%	-7,0%	-0,36%
EIN2						11,8%	16,9%				14,3%
ACD				5,0%	2,9%						3,9%

Все гены, за исключением RLK2, обеспечивали, по меньшей мере, незначительное повышение устойчивости в полевых условиях на соответствующих участках в соответствующие сезоны.

Пример 4: Определение урожайности

Для определения урожайности урожай собирался только с 2 средних рядов на делянке (см. выше), что позволило снизить чрезмерное завышение показателей из-за краевых эффектов. Использовался комбайн, способный фиксировать общую массу зерна с делянки и влажность зерна. После корректировки влажности урожайность зерна рассчитывали от кг/делянку до кг/га.

Поскольку большинство агротехнических показателей, таких как урожайность, в значительной степени зависят от условий окружающей среды, полевые испытания проводили в 2-3 разных местах и в течение до 5 сезонов. Значимость результатов определяли на основе среднего эффекта для разных участков и сезонов.

	Участок 1 Сезон 1	Участок 2 Сезон 1	Участок 1 Сезон 2	Участок 1 Сезон 3	Участок 2 Сезон 3	Участок 1 Сезон 4	Участок 2 Сезон 4	Участок 1 Сезон 5	Участок 2 Сезон 5	Участок 3 Сезон 5	Средн. значение
CaSAR	9,3%	50,5%	26,5%			41,1%	16,0%				28,7%
Pti5				4,3%	4,5%	14,0%	10,5%				8,3%
RLK2			103,6%	3,4%	3,4%	61,9%	6,4%	25,9%	4,1%	135,3%	43,0%
EIN2						-2,9%	-22,8%				-12,9%
ACD				-10,5%	-24,7%						-17,6%

Избыточная экспрессия CaSAR, Pti5 и RLK2 существенно повышала урожайность сои при заражении соевой ржавчиной.

Пример 5: Анализ устойчивости и урожайности, обеспечиваемых различными генами.

Устойчивость к острой реакции на инфекцию, обеспечиваемую экспрессией всех различных генов, оценивалась в сравнении с другими агротехническими признаками, такими как урожайность. Для анализа зависимости (= корреляции) между 2 факторами был выполнен корреляционный анализ на основе формулы, разработанной Пирсоном (корреляция Пирсона; r). Формула следующая:

$$r = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

Где x – значения устойчивости к болезням, y – значения урожайности для определенного сезона и участка, а n – общее количество значений (21).

Формула дает значение от -1 до 1, где: 1 указывает на сильную положительную связь, -1 указывает на сильную отрицательную связь, а нулевой результат указывает на отсутствие связи вообще. Любые корреляции менее 0,4 обычно считаются слабыми.

По результатам использования приведенной выше формулы, коэффициент корреляции урожайности и устойчивости установлен на уровне -0,30, что свидетельствует об очень слабой отрицательную корреляцию между урожайностью и устойчивостью. Это означает, что более высокая устойчивость часто приводит к снижению урожайности, факт, который ранее уже был описан в литературе (см. описание изобретения). Соответственно, обнаружение генов устойчивости, которые повышают урожайность, стало неожиданностью.

Формула изобретения

1. Способ повышения урожайности растения по сравнению с контрольным растением, включающий

- i) предоставление растения, содержащего кассету гетерологичной экспрессии, содержащую ген, выбранный из Pti5, SAR8.2 и RLK2, а также
- ii) выращивание растения.

2. Способ ведения сельского хозяйства для повышения урожайности растения по сравнению с контрольным растением, включающий выращивание растения, содержащего кассету гетерологичной экспрессии, содержащую ген, выбранный из Pti5, SAR8.2 и RLK2, причем во время выращивания растения количество обработок пестицидами за вегетационный период уменьшается, по меньшей мере, на одну по сравнению с контрольным растением, предпочтительно, по меньшей мере, на две.

3. Способ по любому из предшествующих пунктов, **отличающийся тем**, что урожайность представляет собой один или более из следующих показателей:

- количество биомассы на единицу площади,
- количество зерна на единицу площади,
- количество семян на единицу площади.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, **отличающийся тем**, что урожайность увеличивается в присутствии вредителя по сравнению с контрольным растением.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, **отличающийся тем**, что вредитель представляет собой или содержит, по меньшей мере, грибковый вредитель, предпочтительно биотрофный или геминекротрофный грибок, более предпочтительно ржавчинный грибок, более предпочтительно грибок типа Basidiomycota, еще более предпочтительно подтипа Pucciniomycotina, еще более предпочтительно класса Pucciniomycetes, еще более предпочтительно порядка Pucciniales, еще более предпочтительно семейства Chaconiaceae, Coleosporiaceae,

Cronartiaceae, Melampsoraceae, Mikronegeriaceae, Phakopsoraceae, Phragmidiaceae, Pileolariaceae, Pucciniaceae, Pucciniastraceae, Pucciniosiraceae, Raveneliaceae, Sphaerophragmiaceae или Uropyxidaceae,

еще более предпочтительно рода *Rhizoctonia*, *Maravalia*, *Ochropsora*, *Olivea*, *Chrysomyxa*, *Coleosporium*, *Diaphanopellis*, *Cronartium*, *Endocronartium*, *Peridermium*, *Melampsora*, *Chrysocelis*, *Mikronegeria*, *Arthuria*, *Batistopsora*, *Cerotelium*, *Dasturella*, *Phakopsora*, *Prospodium*, *Arthuriomyces*, *Catenulopsora*, *Gerwasia*, *Gymnoconia*, *Hamasporea*, *Kuehneola*, *Phragmidium*, *Trachyspora*, *Triphragmium*, *Atelocauda*, *Pileolaria*, *Racospermyces*, *Uromycladium*, *Allodus*, *Ceratocoma*, *Chrysocyclus*, *Cumminsiella*, *Cystopsora*, *Endophyllum*, *Gymnosporangium*, *Miyagia*, *Puccinia*, *Puccorchidium*, *Roestelia*, *Sphenorchidium*, *Stereostrium*, *Uromyces*, *Hyalopsora*, *Melampsorella*, *Melampsoridium*, *Milesia*, *Milesina*, *Naohidemyces*, *Pucciniastrum*, *Thekopsora*, *Uredinopsis*, *Chardonella*, *Dietelia*, *Pucciniosira*, *Diorchidium*, *Endoraecium*, *Kernkampella*, *Ravenelia*, *Sphenospora*, *Austropuccinia*, *Nyssopsora*, *Sphaerophragmium*, *Dasyspora*, *Leucotelium*, *Macruropyxis*, *Porotenus*, *Tranzschelia* или *Uropyxis*,

еще более предпочтительно видов *Rhizoctonia alpina*, *Rhizoctonia bicornis*, *Rhizoctonia butinii*, *Rhizoctonia callae*, *Rhizoctonia carotae*, *Rhizoctonia endophytica*, *Rhizoctonia floccosa*, *Rhizoctonia fragariae*, *Rhizoctonia fraxini*, *Rhizoctonia fusispora*, *Rhizoctonia globularis*, *Rhizoctonia gossypii*, *Rhizoctonia muneratii*, *Rhizoctonia papayae*, *Rhizoctonia quercus*, *Rhizoctonia repens*, *Rhizoctonia rubi*, *Rhizoctonia silvestris*, *Rhizoctonia solani*,

Phakopsora ampelopsidis, *Phakopsora apoda*, *Phakopsora argentinensis*, *Phakopsora cherimoliae*, *Phakopsora cingens*, *Phakopsora coca*, *Phakopsora crotonis*, *Phakopsora euvitis*, *Phakopsora gossypii*, *Phakopsora hornotina*, *Phakopsora jatrophiicola*, *Phakopsora meibomiae*, *Phakopsora meliosmae*, *Phakopsora meliosmaemyrianthae*, *Phakopsora montana*, *Phakopsora muscadinae*, *Phakopsora myrtacearum*, *Phakopsora nishidana*, *Phakopsora orientalis*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Phakopsora phyllanthi*, *Phakopsora tecta*, *Phakopsora uva*, *Phakopsora vitis*, *Phakopsora ziziphi-vulgaris*,

Puccinia abrupta, *Puccinia acetosae*, *Puccinia achnatheri-sibirici*, *Puccinia acroptili*, *Puccinia actaeae-agropyri*, *Puccinia actaeae-elymi*, *Puccinia antirrhini*, *Puccinia argentata*, *Puccinia arrhenatheri*, *Puccinia arrhenathericola*, *Puccinia artemisiae-keiskeanae*, *Puccinia arthrocnemi*, *Puccinia asteris*, *Puccinia atra*, *Puccinia aucta*,

Puccinia ballotiflora, *Puccinia bartholomaei*, *Puccinia bistortae*, *Puccinia cacabata*,
Puccinia calcitrapae, *Puccinia calthae*, *Puccinia calthicola*, *Puccinia calystegiae-*
soldanellae, *Puccinia canaliculata*, *Puccinia caricis-montanae*, *Puccinia caricis-stipatae*,
Puccinia carthami, *Puccinia cerinthes-agropyrina*, *Puccinia cesatii*, *Puccinia*
chrysanthemi, *Puccinia circumdata*, *Puccinia clavata*, *Puccinia coleataeniae*, *Puccinia*
coronata, *Puccinia coronati-agrostidis*, *Puccinia coronati-brevispora*, *Puccinia coronati-*
calamagrostidis, *Puccinia coronati-hordei*, *Puccinia coronati-japonica*, *Puccinia coronati-*
longispora, *Puccinia crotonopsidis*, *Puccinia cynodontis*, *Puccinia dactylidina*, *Puccinia*
dietelii, *Puccinia digitata*, *Puccinia distincta*, *Puccinia duthiae*, *Puccinia emaculata*,
Puccinia erianthi, *Puccinia eupatorii-columbiani*, *Puccinia flavenscentis*, *Puccinia*
gastrolobii, *Puccinia geitonoplesii*, *Puccinia gigantea*, *Puccinia glechomatis*, *Puccinia*
helianthi, *Puccinia heterogenea*, *Puccinia heterospora*, *Puccinia hydrocotyles*, *Puccinia*
hysterium, *Puccinia impatientis*, *Puccinia impedita*, *Puccinia imposita*, *Puccinia infra-*
aequatorialis, *Puccinia insolita*, *Puccinia justiciae*, *Puccinia klugkistiana*, *Puccinia*
knervslaktensis, *Puccinia lantanae*, *Puccinia lateritia*, *Puccinia latimamma*, *Puccinia*
liberta, *Puccinia littoralis*, *Puccinia lobata*, *Puccinia lophatheri*, *Puccinia loranthicola*,
Puccinia menthae, *Puccinia mesembryanthemi*, *Puccinia meyeri-albertii*, *Puccinia*
miscanthi, *Puccinia miscanthidii*, *Puccinia mixta*, *Puccinia montanensis*, *Puccinia morata*,
Puccinia morthieri, *Puccinia nitida*, *Puccinia oenantes-stoloniferae*, *Puccinia operta*,
Puccinia otzeniani, *Puccinia patriniae*, *Puccinia pentstemonis*, *Puccinia persistens*,
Puccinia phyllostachydis, *Puccinia pittieriana*, *Puccinia platyspora*, *Puccinia pritzeliana*,
Puccinia prostii, *Puccinia pseudodigitata*, *Puccinia pseudostriiformis*, *Puccinia*
psychotriae, *Puccinia punctata*, *Puccinia punctiformis*, *Puccinia recondita*, *Puccinia rhei-*
undulati, *Puccinia rupestris*, *Puccinia senecionis-acutiformis*, *Puccinia septentrionalis*,
Puccinia setariae, *Puccinia silvatica*, *Puccinia stipina*, *Puccinia stobaeae*, *Puccinia*
striiformis, *Puccinia striiformoides*, *Puccinia stylidii*, *Puccinia substriata*, *Puccinia*
suzutake, *Puccinia taeniatheri*, *Puccinia tageticola*, *Puccinia tanacetii*, *Puccinia tatarinovii*,
Puccinia tetragoniae, *Puccinia thaliae*, *Puccinia thlaspeos*, *Puccinia tillandsiae*, *Puccinia*
tiritea, *Puccinia tokyensis*, *Puccinia trebouxii*, *Puccinia triticina*, *Puccinia tubulosa*,
Puccinia tulipae, *Puccinia tumidipes*, *Puccinia turgida*, *Puccinia urticae-acutae*, *Puccinia*
urticae-acutiformis, *Puccinia urticae-caricis*, *Puccinia urticae-hirtae*, *Puccinia urticae-*
inflatae, *Puccinia urticata*, *Puccinia vaginatae*, *Puccinia virgata*, *Puccinia xanthii*,
Puccinia xanthosiae, *Puccinia zoysiae*,

более предпочтительно видов *Phakopsora pachyrhizi*, *Puccinia graminis*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia hordei* или *Puccinia recondita*, более предпочтительно рода *Phakopsora* и наиболее предпочтительно *Phakopsora pachyrhizi*.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, **отличающийся тем**, что растение представляет собой культурное растение, предпочтительно двудольное растение, более предпочтительно растение подкласса Fabales, более предпочтительно растение семейства Fabaceae, более предпочтительно растение трибы Phaseoleae, более предпочтительно рода *Amphicarpea*, *Cajanus*, *Canavalia*, *Dioclea*, *Erythrina*, *Glycine*, *Arachis*, *Lathyrus*, *Lens*, *Pisum*, *Vicia*, *Vigna*, *Phaseolus* или *Psophocarpus*, еще более предпочтительно видов *Amphicarpea bracteata*, *Cajanus cajan*, *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia ensiformis*, *Canavalia gladiata*, *Dioclea grandiflora*, *Erythrina latissima*, *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus maculatus*, *Psophocarpus tetragonolobus*, *Vigna angularis*, *Vigna mungo*, *Vigna unguiculata*, *Glycine albicans*, *Glycine aphyonota*, *Glycine arenaria*, *Glycine argyrea*, *Glycine canescens*, *Glycine clandestina*, *Glycine curvata*, *Glycine cyrtoloba*, *Glycine dolichocarpa*, *Glycine falcata*, *Glycine gracei*, *Glycine hirticaulis*, *Glycine lactovirens*, *Glycine latifolia*, *Glycine latrobeana*, *Glycine microphylla*, *Glycine peratosa*, *Glycine pindanica*, *Glycine pullenii*, *Glycine rubiginosa*, *Glycine stenophita*, *Glycine syndetika*, *Glycine tabacina*, *Glycine tomentella*, *Glycine gracilis*, *Glycine max*, *Glycine max* x *Glycine soja*, *Glycine soja*, более предпочтительно видов *Glycine gracilis*, *Glycine max*, *Glycine max* x *Glycine soja*, *Glycine soja*, наиболее предпочтительно видов *Glycine max*.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, **отличающийся тем**, что кассета гетерологичной экспрессии содержит ген, выбранный из Pti5, SAR8.2 и RLK2, функционально связанный с любым из

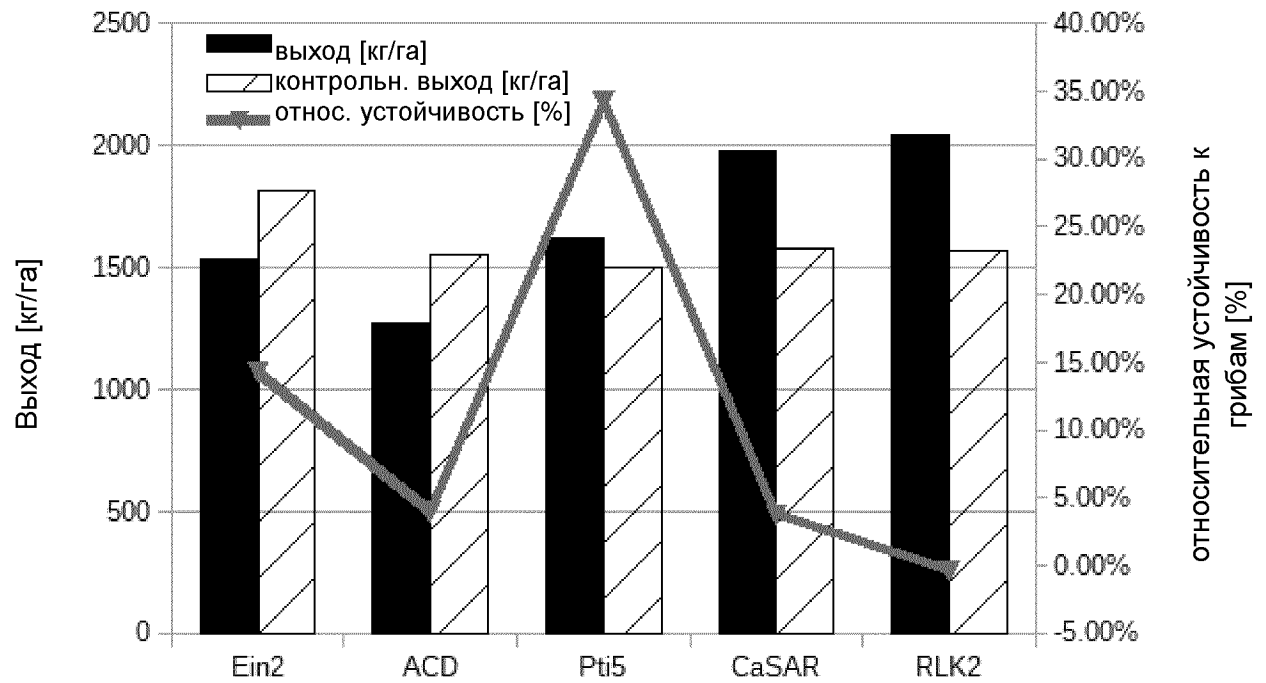
- a) конститутивно активного промотора,
- b) тканеспецифического или тканепредпочтительного промотора,
- c) промотора, индуцируемого воздействием на растение вредителем, предпочтительно грибковым вредителем.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, **отличающийся тем**, что выращивание осуществляют в группе из, по меньшей мере, 1000 растений, предпочтительно, в полевых условиях или в теплице.

9. Применение гена, выбранного из Pti5, SAR8.2 и RLK2, для повышения урожайности растения, предпочтительно причем растение выращивают в естественных полевых или тепличных условиях и/или в условиях низкого воздействия вредителей.

10. Способ получения гибридного растения с повышенной урожайностью по сравнению с контрольным растением, включающий

- i) предоставление первого растительного материала, содержащего кассету гетерологичной экспрессии, содержащую ген, выбранный из Pti5, SAR8.2 и RLK2, и второго растительного материала, не содержащего указанную кассету гетерологичной экспрессии,
- ii) получение поколения F1 в результате скрещивания первого и второго растительного материала, и
- iii) выбор одного или более представителей поколения F1, которые содержат указанную кассету гетерологичной экспрессии.



Фигура 1