

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045604**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.11

(21) Номер заявки
201990468

(22) Дата подачи заявки
2017.08.10

(51) Int. Cl. **C12N 15/82** (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(54) ГЕН РЕЗИСТЕНТНОСТИ К РИЗОМАНИИ(31) **16183533.5**(32) **2016.08.10**(33) **EP**(43) **2019.07.31**(86) **PCT/EP2017/070334**(87) **WO 2018/029300 2018.02.15**

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

(72) Изобретатель:
**Тёрйек Отто, Борхардт Дитрих,
Мехельке Вольфганг, Лайн Енс,
Кристоф, Хабекост Зандра (DE)**

(74) Представитель:
Зуйков С.А. (RU)

(56) DATABASE EMBL [Online] 8 July 2015 (2015-07-08), "Beta vulgaris subsp. vulgaris hypothetical protein", XP002765844, retrieved from EBI accession no. KMT15745 Database accession no. KMT15745 sequence

WO-A1-2014202044

SCHOLTEN O.E. ET AL. "Inheritance of resistance to beet necrotic yellow vein virus in Beta vulgaris conferred by a second gene for resistance", THEORETICAL AND APPLIED GENETICS; INTERNATIONAL JOURNAL OF PLANT BREEDING RESEARCH, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 99, no. 3-4, 1 August 1999 (1999-08-01), pages 740-746, XP035065867, ISSN: 1432-2242, DOI: 10.1007/S001220051292, the whole document

AMIRI R. ET AL. "A new RAPD marker for beet necrotic yellow vein virus resistance gene in Beta vulgaris", BIOLOGIA PLANTARUM, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 53, no. 1, 21 March 2009 (2009-03-21), pages 112-119, XP019670809, ISSN: 1573-8264, the whole document

GRIMMER M.K. ET AL. "An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to Beet necrotic yellow vein virus", THEORETICAL AND APPLIED GENETICS; INTERNATIONAL JOURNAL OF PLANT BREEDING RESEARCH, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 114, no. 7, 9 February 2007 (2007-02-09), pages 1151-1160, XP019510491, ISSN: 1432-2242, DOI: 10.1007/S00122-007-0507-3, the whole document

(57) Создание молекул нуклеиновой кислоты, обеспечивающих устойчивость к ризомании, в частности к "вирусу некротического пожелтения жилок свеклы" (Beet Necrotic Yellow Vein Virus - BNYVV) у растения, в частности, рода свеклы, а также у растений, содержащих аналогичные молекулы нуклеиновой кислоты. Дополнительно заявляются способы выведения резистентных к BNYVV сортов растений, а также способы идентификации и селекции резистентных к BNYVV растений с использованием маркеров, включая способ контроля поражения патогеном BNYVV.

B1**045604****045604 B1**

Область применения изобретения

Изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, способный обеспечить устойчивость к патогену, в частности, к "вирусу некротического пожелтения жилок свеклы" (Beet Necrotic Yellow Vein Virus - BNYVV) у растения, в частности, рода свеклы, в котором экспрессируется этот полипептид, а также полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению. Изобретение также относится к трансгенному растению, растительной клетке, органу растения, растительной ткани, части растения или семени растения, включающих молекулу нуклеиновой кислоты или ее части, а также к резистентному к BNYVV растению или его частям, в которых путем осуществления одной или нескольких мутаций в эндогенной молекуле нуклеиновой кислоты была вызвана эта резистентность. Способ создания такого трансгенного растения или растительной клетки, а также резистентного к BNYVV нетрансгенного растения, также охватывает данное изобретение. Кроме того, изобретение также относится к основанному на маркерах способу идентификации и селекции резистентных к BNYVV растений, в том числе и к способу контроля поражения патогеном BNYVV.

Предшествующий уровень техники

Бородатость свеклы (ризомания) является заболеванием сахарной свеклы, которое может привести к наиболее экономически значимым в мире потерям урожая, составляющим от 50% и более. Данное заболевание, называемое также "бородатость свеклы", вызывает "вирус некротического пожелтения жилок свеклы" (Beet Necrotic Yellow Vein Virus - BNYVV), оно переносится находящимися в земле простейшими *Polymyxa betae*. Инфекция BNYVV проявляется в усилении пролиферации тонких и боковых корней, а также в образовании значительно уменьшенного корневого тела с пониженным содержанием сахара. Инфицированные растения характеризуются сниженным водопоглощением и поэтому более чувствительны к засухе. Если инфекция распространяется на все растение, жилки листьев становятся желтыми, на листьях появляются некротические образования и желтые пятна. Поскольку куративная борьба с этим заболеванием невозможна, как и в случае с другими вирусными заболеваниями, ущерб может быть предотвращен только путем выращивания устойчивых к данной болезни сортов. Поэтому развитие генотипов с генетической устойчивостью к ризомании имеет решающее значение для выращивания сахарной свеклы.

Первые селекционные программы, направленные на получение устойчивых к ризомании растений, начались в Италии еще в 1981 году, когда было установлено, что коммерческая зародышевая плазма имеет удовлетворительную генетическую изменчивость для получения устойчивости к ризомании. Были отобраны растения и генотипы со сниженными симптомами заболевания и почти нормальным весом корня и содержанием сахара. В результате скрещивания с *Beta vulgaris* L. подвида *maritima* (L.) удалось обнаружить источник мультигенной резистентности, названный типом "Alba".

В 1982 году был разработан другой тип резистентности, который показал улучшенную защиту от ризомании. Он был обнаружен два года спустя в сорте Rizo и был классифицирован как моногенная, доминирующая резистентность. Еще одна моногенная, доминирующая резистентность была обнаружена в 1983 году в ходе сортоиспытаний в Калифорнии в селекционной компании "Holly Sugar Company", которая также была представлена в Европе три года спустя (Lewellen et al. 1987). Эта резистентность, известная как RZ-1 (также называемая "Holly"), стала наиболее широко используемым источником и быстро пришла на смену Rizo. Несколько лет спустя в *Beta maritima*, приращение WB42 из Дании, был найден новый источник резистентности к ризомании. В результате картирования он показал иное положение в хромосоме III по сравнению с RZ-1 и обеспечил повышенную резистентность по сравнению с RZ-1. Этот новый основной ген был назван RZ-2. Тем временем в *Beta maritima*, приращение WB41, был найден и RZ-3, в случае с которым речь, вероятно, идет об аллельном варианте RZ-2.

На сегодняшний день RZ-3 является единственным геном резистентности к ризомании, функциональный фон которого, т. е. генетическая структура, был выяснен (см. немецкую патентную заявку DE 10 2013 010 026 A2), что позволило значительно улучшить селекционное использование гена. Таким образом, существует постоянное стремление лучше описать генетически как уже известные, так и новые источники резистентности, чтобы ускорить разработку молекулярных маркеров. Тем самым, элитные линии сахарной свеклы можно было бы дополнительно оптимизировать, не только устранив "сцепленный груз" (Linkage Drag), но и выявляя новые источники резистентности.

Для стабильной селекции сортов, устойчивых к ризомании, противодействующей нарушающим резистентность изолятам BNYVV, необходимо постоянно идентифицировать новые гены резистентности и интегрировать их в генофонд культивируемых растений, таких как сахарная свекла. Эта задача решается с помощью вариантов осуществления изобретения, указанных в формуле изобретения и в описании.

Раскрытие изобретения

Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной обеспечить устойчивость к патогену, в частности, к "вирусу некротического пожелтения жилок свеклы" (Beet Necrotic Yellow Vein Virus - BNYVV) у растения, в частности, рода свеклы, в котором экспрессируется полипептид, кодируемый данной молекулой нуклеиновой кислоты. Изобретение также относится к растению, в частности, к трансгенному растению, растительной клетке, органу растения, растительной ткани, части растения или семени растения, включающих молекулу нуклеиновой кислоты или ее части, а также к рези-

стентному к BNYVV растению или его частям, в которых путем осуществления одной или нескольких мутаций в эндогенной молекуле нуклеиновой кислоты была вызвана эта резистентность. Способ создания такого трансгенного растения или растительной клетки, а также резистентного к BNYVV нетрансгенного растения, также охватывает данное изобретение. Кроме того, изобретение также включает основанный на маркерах способ идентификации и селекцию резистентных к BNYVV растений, в том числе и способ контроля поражения патогеном BNYVV.

Поэтому данное изобретение относится к вариантам осуществления, перечисленным в следующих пунктах с [1] по [22] и проиллюстрированным примерами и на изображениях.

[1] Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, способный обеспечить устойчивость к патогену растения, в котором экспрессируется этот полипептид, отличающаяся тем, что она включает последовательность нуклеотидов, выбранную из

(a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид с аминокислотной последовательностью по SEQ ID NO: 2 или полипептид с аминокислотной последовательностью, идентичной SEQ ID NO: 2 по меньшей мере на 70%, в котором в результате одной или нескольких мутаций нуклеотидной последовательности происходит по меньшей мере одно аминокислотное замещение, предпочтительно в позиции 307 - лизин (K) и/или в позиции 437 - глутамин (Q);

(b) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность по SEQ ID NO: 1 или гибридирующей с дополнительной последовательностью с образованием SEQ ID NO: 1 в жестких условиях, в которой в результате одной или нескольких мутаций происходит по меньшей мере одно нуклеотидное замещение, что приводит к аминокислотному замещению, предпочтительно в позициях 919-921 и/или в позициях 1309-1311;

(c) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, который производится путем замещения, делеции и/или добавления одной или нескольких аминокислот аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью по п. (a) или (b), одного полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью по п. (a) или (b); или

(d) нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один лейцин-богатый домен (LRR) соответственно

(i) аминокислотным позициям 558-594 последовательности SEQ ID NO: 4, предпочтительно аминокислотным позициям 542-594 последовательности SEQ ID NO: 4, (ii) аминокислотным позициям 604-634 последовательности SEQ ID NO: 4, предпочтительно аминокислотным позициям 582-634 последовательности SEQ ID NO: 4,

(iii) аминокислотным позициям 760-790 последовательности SEQ ID NO: 4 или

(iv) аминокислотным позициям 838-869 последовательности SEQ ID NO: 4, и/или по меньшей мере один домен AAA АТФаз соответственно

(I) аминокислотным позициям 177-289 последовательности SEQ ID NO: 4 или

(II) аминокислотным позициям 156-263 последовательности SEQ ID NO: 4, причем предпочтительно, чтобы патогеном был вирус некротического пожелтения жилок свеклы (Beet Necrotic Yellow Vein Virus - BNYVV), а растением - растением рода свеклы, предпочтительно сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.).

[2] Молекула нуклеиновой кислоты по п. [1], отличающаяся тем, что кодированный полипептид в качестве альтернативы или дополнительно включает (i) в позиции, которая соответствует позиции 566 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, аминокислоту, отличную от аргинина (R), и/или (ii) в позиции, которая соответствует позиции 731 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, аминокислоту, отличную от глутамина (Q), и/или (iii) в позиции, которая соответствует позиции 831 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, аминокислоту, отличную от пролина (P).

[3] Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что кодированный полипептид (i) включает глутамин (Q) в позиции, которая соответствует позиции 307 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и/или (ii) аргинин (R) в позиции, которая соответствует позиции 437 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и/или (iii) гистидин (H) в позиции, которая соответствует позиции 566 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и/или (iv) лизин (K) в позиции, которая соответствует позиции 731 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и/или (v) серии (S) в позиции, которая соответствует позиции 831 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

[4] Молекула нуклеиновой кислоты по п. [3], отличающаяся тем, что она включает в местах, которые соответствуют местам в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, одно или несколько из перечисленных ниже нуклеотидных замещений:

(a) C вместо A в позиции 919;

(b) G вместо A в позиции 1310;

(c) A вместо G в позиции 1697;

(d) A вместо C в позиции 2191; и/или

(e) T вместо C в позиции 2491.

[5] Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пунктов с [1] по [4], отличающаяся тем, что она

кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью согласно последовательности SEQ ID NO: 4 и/или включает кодирующую последовательность ДНК согласно последовательности SEQ ID NO: 3.

[6] Вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пунктов с [1] по [5].

[7] Клетка-хозяин, включающая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пунктов с [1] по [5] или вектор по п. [6].

[8] Полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пунктов с [1] по [5], или антитело, действующее против этого полипептида.

[9] Трансгенная клетка растения, предпочтительно растения рода свекла, включающая в качестве трансгена молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пунктов с [1] по [5], при необходимости, под контролем гетерологического промотора, или вектор по п. [6].

[10] Трансгенное растение, предпочтительно растение рода свекла, или его часть, включающее растительную клетку по п. [9].

[11] Резистентное к BNYVV растение рода свекла или его часть, которое эндогенно содержит молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пунктов с [1] по [5] или в котором одна или несколько мутаций, указанных в одном из пунктов с [1] по [4], вносится в эндогенную молекулу нуклеиновой кислоты с нуклеотидной последовательностью, включающей последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или гибридизирующейся с дополнительной последовательностью с образованием SEQ ID NO: 1 в жестких условиях, при этом растение или его часть не относится к подвиду *Beta vulgaris subsp. maritima*.

[12] Растение по п. [10] или [11], отличающееся тем, что оно представляет собой гибридное растение или диплоидное растение.

[13] Растение по любому из пунктов с [10] по [12], которое содержит молекулы нуклеиновой кислоты или одной или нескольких гетерозиготных или гомозиготных мутаций.

[14] Растение по любому из пунктов с [10] по [13], дополнительно содержащее в геноме трансгенную или эндогенную вторую молекулу нуклеиновой кислоты, предпочтительно в другой или, соответственно, дополнительной позиции в геноме, кодирующем полипептид, способный обеспечить резистентность к BNYVV в данном растении, где полипептид экспрессируется в результате транскрипции второй молекулы нуклеиновой кислоты.

[15] Семя растения по любому из пунктов с [10] по [14], которое трансгенно или эндогенно содержит одну или несколько упомянутых выше молекул нуклеиновой кислоты или векторов.

[16] Способ создания трансгенной растительной клетки и/или трансгенного растения, включающий этап введения в растительную клетку молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пунктов с [1] по [5] или вектора по п. [6], и при необходимости регенерации трансгенного растения из трансгенной растительной клетки.

[17] Способ выведения резистентного к BNYVV растения, включающий следующие этапы

(а) мутагенизацию клеток растений с последующей регенерацией растений из мутагенизированных растительных клеток или мутагенизация растений; при необходимости

(б) идентификацию растения из п. (а), содержащего в эндогенной молекуле нуклеиновой кислоты одну или несколько мутаций, указанных в любом из пунктов с [1] по [5].

[18] Способ идентификации растения рода свекла, обладающего резистентностью к патогену BNYVV, включающий

(i) подтверждение наличия и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пунктов с [1] по [5] в растении или, соответственно, в его образце; и/или

(ii) подтверждение по меньшей мере одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пунктов с [1] по [5] или в непосредственном окружении, предпочтительно в хромосоме III; и/или

(iii) подтверждение по меньшей мере двух маркерных локусов в хромосоме III растения, при этом по меньшей мере один маркерный локус находится на участке или в его пределах, хромосомы от s3e4516s05 (SEQ ID NO: 5) до молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пунктов с [1] по [5] и по меньшей мере один маркерный локус находится на участке или в его пределах, хромосомы от молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из пунктов с [1] по [5] до s3e5918s01 (SEQ ID NO: 6); и при необходимости,

(iv) селекцию резистентного к BNYVV растения.

[19] Способ по п. [18], отличающийся тем, что по меньшей мере один маркерный локус определяет одну или несколько мутаций, указанных в пунктах с [1] по [5].

[20] Растение или его часть, идентифицированные или при необходимости подвергнутые селекции с применением способа по п. [18] или п. [19].

[21] Популяция растений, включающих растения по любому из пунктов с [11] по [13] или [20].

[22] Способ контроля поражения вирусом некротического пожелтения жилок свеклы (Beet Necrotic Yellow Vein Virus - BNYVV) растений рода свекла в сельском хозяйстве или садоводстве, включающий I) идентификацию и селекцию растений рода свекла способом по п. [18] или п. [19] и II) выращивание растений из п. I) или их потомства.

[23] Применение растительной клетки по п. [9], растения по любому из пунктов с [10] по [14] или

[20] или его органов, частей, тканей или клеток, семени по п. [15] или получаемых способом по п. [16] или [17] или подвергаемых селекции по п. [18] или [19] растения или его органов, частей, тканей, клеток, потомства или семян в производстве продуктов питания, материалов, лекарственных средств или, соответственно, на предварительных этапах такого производства, в диагностике, производстве косметических средств, химических продуктов тонкого органического синтеза, сахара, сиропа, биоэтанола или биогаза.

Прежде всего, ниже будет дано более подробное пояснение к некоторым терминам, используемым в данной заявке.

Термин "приблизительно" в связи с указанием длины нуклеотидной последовательности означает отклонение на +/- 10 000 пар оснований, на +/- 5000 пар оснований или на +/- 1000 пар оснований, предпочтительно на +/- 200 пар оснований или на +/- 100 пар оснований и наиболее предпочтительно на +/- 50 пар оснований.

"Растение рода свекла" относится к семейству амарантовых (*Amaranthaceae*). К таким растениям относятся представители видов *Beta macrocarpa*, *Beta vulgaris*, *Beta lomatogona*, *Beta macrorhiza*, *Beta corolliflora*, *Beta trigyna* и *Beta nana*. Растением вида *Beta vulgaris*, в частности, является растение подвида *Beta vulgaris subsp. vulgaris*. Сюда относятся, например, *Beta vulgaris subsp. vulgaris var. altissima* (в узком смысле сахарная свекла), *Beta vulgaris ssp. vulgaris var. vulgaris* (мангольд), *Beta vulgaris ssp. vulgaris var. conditiva* (красная/столовая свекла), *Beta vulgaris ssp. vulgaris var. crassa/alba* (кормовая свекла).

Под "гибридизированием" или "гибридизацией" подразумевается процесс, в котором одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты присоединяется к преимущественно комплементарной цепочке нуклеиновой кислоты, т. е. объединяется с ней в пары оснований. Стандартный способ гибридации описан, к примеру, в книге Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001. Под этим предпочтительно следует понимать, что не менее 60%, предпочтительнее не менее 65%, 70%, 75%, 80% или 85%, наиболее предпочтительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% оснований молекулы нуклеиновой кислоты входят в пару оснований с цепочкой нуклеиновой кислоты, в значительной мере комплементарной. Возможность такой сборки зависит от жесткости условий гибридации. Термин "жесткость" относится к условиям гибридации. Очень жесткие условия предполагают затруднение объединения в пары, не жесткие условия подразумевают упрощение объединения в пары. Жесткость условий гибридации зависит, например, от концентрации солей или ионной силы и температуры. В целом, жесткость может быть усилена за счет повышения температуры и/или снижения содержания солей. Под "жесткими условиями гибридации" следует понимать условия, в которых гибридация происходит преимущественно только между гомологичными молекулами нуклеиновой кислоты. При этом термин "условия гибридации" относится не только к условиям, преобладающим во время фактической сборки нуклеиновых кислот, но и к условиям, преобладающим на последующих этапах промывки. Жесткими условиями гибридации являются, например, условия, в которых гибридируются преимущественно только те молекулы нуклеиновой кислоты, степень идентичности последовательности в которых составляет не менее 70%, предпочтительно не менее 75%, не менее 80%, не менее 85%, не менее 90% или не менее 95%. Жесткими условиями гибридации, например, являются: гибридация в 4 x SSC при 65°C с последующей многократной промывкой в 0,1 x SSC при 65°C с общей продолжительностью приблизительно 1 час. Используемый здесь термин "жесткие условия гибридации" также может означать следующее: гибридация при 68°C в 0,25 M фосфата натрия, с pH 7,2, 7% SDS, 1 mM EDTA и 1% BSA в течение 16 часов с последующей двукратной промывкой в 2 x SSC и 0,1% SDS при 68°C. Предпочтительно, чтобы гибридация происходила в жестких условиях.

"Комплементарная" нуклеотидная последовательность в отношении нуклеиновой кислоты в форме двухцепочечной ДНК, означает, что вторая цепочка ДНК, комплементарная первой цепочке ДНК, включает по правилам объединения в пары нуклеотиды, соответствующие основаниям первой цепочки.

Под "изолированной молекулой нуклеиновой кислоты" подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, выделенная из своего естественного или исходного окружения. Данный термин также обозначает полученную синтетическим способом молекулу нуклеиновой кислоты. Под "изолированным полипептидом" подразумевается полипептид, выделенный из своего естественного или исходного окружения. Данный термин также обозначает полученный синтетическим способом полипептид.

"Молекулярный маркер" - это нуклеиновая кислота, которая является полиморфной в популяции растений и используется в качестве контрольной или ориентирной точки. Маркер для обнаружения рекомбинационного события должен быть пригоден для мониторинга различий или полиморфизма в популяции растений. Таким образом, такой маркер позволяет обнаруживать и различать разные аллельные состояния (аллели). Термин "молекулярный маркер" также относится к нуклеотидным последовательностям, являющимся комплементарными или по меньшей мере в значительной степени комплементарными или гомологичными геномным последовательностям, например, нуклеиновые кислоты, которые используются в качестве зондов или праймеров. Для маркеров эти различия находятся на уровне ДНК и представляют собой, к примеру, различия в полинуклеотидных последовательностях, таких как, например,

SSRs (simple sequence repeats), RFLPs (restriction fragment length polymorphisms), FLPs (fragment length polymorphisms) или SNPs (single nucleotide polymorphisms). Маркеры могут быть получены из геномных или экспрессированных нуклеиновых кислот, таких как сплайсированная РНК, кДНК или ESTs (экспрессирующиеся маркерные последовательности), а также могут относиться к нуклеиновым кислотам, которые используются в качестве зондов или пар праймеров и как таковые способны усилить фрагмент последовательности с помощью методов на основе ПЦР. Маркеры, описывающие генетические полиморфизмы (между частями одной популяции), могут быть обнаружены с помощью хорошо зарекомендовавших себя современных методов (An Introduction to Genetic Analysis. 7th Edition, Griffiths, Miller, Suzuki et al, 2000). К ним относятся, например, секвенирование ДНК, амплификация отдельных последовательностей с использованием ПЦР, подтверждение полиморфизма длины рестриционных фрагментов (RFLP), подтверждение полиморфизма полинуклеотидов с помощью аллель-специфической гибридизации (ASH), обнаружение амплифицированных переменных последовательностей генома растений, обнаружение 3SR (self-sustained sequence replication), обнаружение SSRs, SNPs, RFLPs или AFLPs (amplified fragment length polymorphisms). Кроме того, также известны методы обнаружения ESTs (expressed sequence tags) и SSR-маркеров, полученных из EST-последовательностей и RAPD (randomly amplified polymorphic DNA). В зависимости от контекста, термин "маркер" в описании может также означать конкретную позицию в хромосоме генома какого-либо вида, где может быть найден специфический маркер (например, SNP).

"Промотор" - это нетранслируемая регуляторная последовательность ДНК, обычно расположенная выше области кодирования, которая содержит точку соединения для РНК-полимеразы и инициирует транскрипцию ДНК. Промотор также содержит другие элементы, которые выступают в роли регуляторных генов для экспрессии генов (например, цис-регуляторные элементы). "Кор-промотор или минимальный промотор" - это промотор, имеющий по меньшей мере базовые элементы, необходимые для иницирования транскрипции (например, ТАТА-бокс и/или инициатор).

"Патоген" означает организм, который взаимодействует с растением и приводит к возникновению симптомов заболевания в одном или нескольких органах растения. К таким патогенам относятся, например, животные, грибковые, бактериальные или вирусные организмы или оомицеты.

Под "патогенной инфекцией" следует понимать самое раннее время, когда патоген взаимодействует с тканями растения-хозяина. Например, в случае с вирусным патогеном BNYVV перенос осуществляется простейшими *Polymyxa betae*. *Polymyxa* образует споры, которые могут сохраняться в земле в течение многих десятилетий. В этих спорах находится и вирус. Если эти покоящиеся споры прорастают и становятся подвижными зооспорами, через них вирус может проникать в клетки ткани растения-хозяина и взаимодействовать с хозяином (Esser (2000) Kryptogamen 1: Cyanobakterien Algen Pilze Flechten Praktikum und Lehrbuch. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 3. Auflage).

К растительным "органам" относятся, например, листья, стебель, ствол, корни, гипокотиль, вегетативные почки, меристема, эмбрионы, пыльники, яйцеклетки, семена или плоды. "Части растений" включают, помимо прочего, стебель или, соответственно, ствол, листья, цветы, соцветия, корни, плоды и семена, а также пыльцу. Термин "части растения" также означает сочетание нескольких органов, например, цветок или семя, или часть органа, например, сечение стебля. К растительным "тканям" относятся, например, каллусная ткань, накопительная ткань, меристематическая ткань, листовая ткань, ткань побега, корневая ткань, ткань растительных опухолей или репродуктивная ткань, а также образовательная ткань, паренхимная ткань (так называемая паренхима), проводящая ткань, механическая ткань и покровная ткань (так называемый эпидермис). Данное перечисление не является исчерпывающим списком понятий, относящихся к термину "ткань". Под растительными "клетками" следует понимать, например, изолированные клетки с клеточной стенкой или их агрегатами или протопластами.

В контексте данного изобретения термин "регуляторная последовательность" относится к нуклеотидной последовательности, которая влияет на специфичность и/или экспрессионную силу, например, при передаче конкретной специфичности ткани регуляторной последовательностью. Такая регуляторная последовательность может быть расположена не только выше точки инициации транскрипции минимального промотора, но и ниже ее, например, в транскрибированной, но не транслированной лидерной последовательности или внутри интрона.

Термин "резистентность" следует понимать в широком смысле, он охватывает диапазон защиты начиная от задержки и заканчивая полным блокированием развития заболевания. Примером значимого патогена является вирус некротического пожелтения жилок свеклы (Beet Necrotic Yellow Vein Virus - BNYVV). Предпочтительно, чтобы резистентная растительная клетка по данному изобретению или резистентное растение по данному изобретению имели резистентность к BNYVV. Резистентность к патогену эквивалентна резистентности к заболеванию, вызванному данным патогеном, например, резистентность к BNYVV также является резистентностью к бородастости свеклы (ризомании).

"Транстенное растение" означает растение, в геном которого интегрирован хотя бы один полинуклеотид. При этом речь может идти о гетерологическом полинуклеотиде. Предпочтительно, чтобы полинуклеотид был стабильно интегрирован, что означает, что интегрированный полинуклеотид стабильно сохраняется в растении, экспрессируется и может быть стабильно унаследован потомством. Стабильное

внедрение полинуклеотида в геном растения также включает интеграцию в геном растения предыдущего родительского поколения, благодаря чему полинуклеотид может быть стабильно унаследован последующим потомством. Термин "гетерологический" означает, что внедренный полинуклеотид, например, происходит из клетки или организма с другим генетическим фоном того же вида или другого вида, или гомологичен прокариотической или эукариотической клетке-хозяину, но локализован в другой генетической среде и поэтому отличается от любого естественно существующего соответствующего полинуклеотида. Гетерологический полинуклеотид может присутствовать в дополнение к соответствующему эндогенному гену.

Варианты и формы осуществления настоящего изобретения описаны на примерах со ссылкой на соответствующие последовательности и изображения.

Фиг. 1: (A) Геномная последовательность ДНК восприимчивого к ризомании (WB) аллеля *wb-s* гена резистентности *wb* (SEQ ID NO: 1) из *ss*-генотипа, идентифицированного как NBS-LRR (ген домена NB-ARC) посредством тонкого картирования. Анализ потомства 4 ближайших рекомбинантных растений (2 прямых рекомбинанта слева и 2 прямых рекомбинанта справа вокруг гена) локализовал ген NBS-LRR с точностью до одного гена. Показанная последовательность включает кодированную область упомянутой ранее белковой последовательности (B, SEQ ID NO: 2) белка резистентности WB-*s*. (C) Геномная последовательность ДНК резистентного к ризомании аллеля *wb-R* гена резистентности *wb* (SEQ ID NO: 3) с кодированной областью упомянутой ранее белковой последовательности. Диагностический полиморфизм, который приводит к аминокислотному замещению, подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. (D) Аминокислотная последовательность геномной последовательности ДНК резистентного к ризомании аллеля *wb-R* кодированного геном резистентности *wb* (SEQ ID NO: 3) белка. Диагностический полиморфизм подчеркнут и выделен полужирным шрифтом. Эксперименты в рамках данного изобретения, среди прочего - анализ последовательностей резистивных к ризомании генотипов в сравнении с преобладающим восприимчивым генотипом и имеющейся в геномной базе данных аминокислотной последовательностью показали, что в геномной последовательности ДНК резистентных к ризомании аллелей *wb-R* коррелирующий ген NBS-LRR с показанной в последовательности SEQ ID NO: 3 рамке считывания включает одно или несколько аминокислотных замещений, так что наблюдаемая резистентность объясняется мутациями в данном гене. Основываясь на предыдущем анализе рекомбинантов, одно из двух аминокислотных замещений K307Q и/или Q437R, в частности, может рассматриваться как причина возникновения резистентности.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной обеспечить устойчивость к патогену, в частности, к "вирусу некротического пожелтения жилок свеклы" (Beet Necrotic Yellow Vein Virus - BNYVV) у растения, в частности, рода свеклы, в котором экспрессируется полипептид, кодируемый данной молекулой нуклеиновой кислоты. Данное изобретение основано на генетическом тонком картировании, идентификации, изолировании и описании гена, происходящего от донора *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, наличие которого в растении, в частности, в сахарной свекле коррелирует с резистентностью соответствующего растения к ризомании (WB) или, соответственно, является причиной такой резистентности, а его нуклеотидная и кодированная аминокислотная последовательности отличаются по меньшей мере одним нуклеотидным или, соответственно, аминокислотным замещением по сравнению с изображенными на фиг. 1A и B нуклеотидной и аминокислотной последовательностями идентифицированного согласно изобретению гена NBS-LRR, при этом предпочтительно, чтобы нуклеотидные или, соответственно, аминокислотные замещения составляли не больше 50%, предпочтительно не больше 60%, более предпочтительно не больше 70%, еще более предпочтительно не больше 80%, и еще более предпочтительно не больше 90% и, в частности, предпочтительно не больше 95% от всей нуклеотидной и аминокислотной последовательностей, изображенных на фиг. 1A и B. Наиболее предпочтительные варианты осуществления нуклеотидной и аминокислотной последовательностей молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением показаны на фиг. 1C и D и описаны в примерах вместе с легендой к изображению.

В случае с молекулой нуклеиновой кислоты речь может идти об изолированной молекуле нуклеиновой кислоты. Предпочтительно, чтобы это была ДНК, наиболее предпочтительно - кДНК или, соответственно, кодирующая ДНК. Предпочтительно, чтобы полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением, обеспечивал резистентность к вирусному патогену "некротического пожелтения жилок свеклы" (Beet Necrotic Yellow Vein Virus - BNYVV), который вызывает бородастость свеклы (ризоманию) и передается находящимися в земле простейшими *Polymyxa betae*. Кроме того, полипептид, который согласно изобретению кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, обеспечивает резистентность к этому патогену, в частности, растений рода свекла. Предпочтительно, чтобы описываемым растением было растение вида *Beta vulgaris*, наиболее предпочтительно - растение подвида *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*; к ним относятся, например, культивируемые виды сахарной свеклы, красной свеклы, кормовой свеклы, листового мангольда и черешкового мангольда.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения описываемая молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид с аминокислотной по-

следовательностью по SEQ ID NO: 2, при этом данная молекула нуклеиновой кислоты включает одну или несколько мутаций, которые приводят к тому, что полипептид, кодируемый этой молекулой нуклеиновой кислоты, в позиции, соответствующей позиции 307 в контрольной последовательности SEQ ID NO: 2, включает аминокислоту, отличающуюся от лизина (K), и/или в позиции, соответствующей позиции 437 в контрольной последовательности SEQ ID NO: 2, включает аминокислоту, отличающуюся от глутамина (Q). Одна из двух или обе упомянутых мутаций в аминокислотной последовательности, предположительно, были идентифицированы как причина резистентности к ризомании.

Как поясняется на примерах и в легенде к изображениям, в случае с идентифицированным геном согласно изобретению речь идет о гене/белке резистентности типа NBS-LRR, который характеризуется определенными структурными мотивами. Общая структура подобных белков резистентности у растений уже хорошо изучена (Martin et al., Annual Review Plant Biology 54 (2003), 23-61). Однако принцип формирования структуры, в частности, так называемого домена LRR, который рассматривается как потенциальный домен идентификации для преимущественно неизвестных патогенных эффекторов, не предсказуем и в целом функциональный фон генов резистентности, т. е. генетической структуры, в значительной степени неизвестен. Следовательно, идентификация гена или, соответственно, белка, обеспечивающих резистентность к BNYVV, только на основании известных структурных мотивов невозможна. Кроме того, области последовательности вокруг этих генов резистентности зачастую повторяются, что особенно затрудняет разработку диагностических маркеров и сборку последовательностей.

Идентифицированный белок резистентности относится к типу NBS-LRR и включает по меньшей мере один кодированный лейцин-богатый домен (LRR) в соответствии с аминокислотными позициями 558-594 последовательности SEQ ID NO: 4, предпочтительно аминокислотными позициями 542-594 последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотными позициями 604-634 последовательности SEQ ID NO: 4, предпочтительно аминокислотными позициями 582-634 последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотными позициями 760-790 последовательности SEQ ID NO: 4 или аминокислотными позициями 838-869 последовательности SEQ ID NO: 4 и/или по меньшей мере один кодированный домен AAA АТФаз в соответствии с аминокислотными позициями 177-289 последовательности SEQ ID NO: 4 или аминокислотными позициями 156-263 последовательности SEQ ID NO: 4. В случае с идентифицированным доменом AAA АТФаз речь с большой вероятностью идет о домене NB-ARC, главной функцией которого является связывание нуклеотидов. Не будучи привязанным к какой-либо конкретной теории, этот функциональный домен АТФаз предположительно регулирует активность белка резистентности.

В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты по изобретению включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, при этом в позициях 919-921 и/или 1309-1311 происходит замещение одного или нескольких нуклеотидов, что приводит к аминокислотному замещению.

Эти аминокислотные или, соответственно, нуклеотидные замещения могут быть выполнены с использованием традиционных методов, известных согласно современному уровню развития технологий, например, локального мутагенеза, направленного мутагенеза с помощью ПЦР, транспозонного мутагенеза, метода TILLING, геномной инженерии, например, с использованием мегануклеаз, нуклеаз цинковых пальцев, методов TALENS и CRISPR/Cas и т.д. Кроме того, в нуклеотидной последовательности могут быть произведены дополнительные замещения, делеции, инсерции, добавления и/или любые другие изменения как по отдельности, так и в комбинации, которые хоть и изменяют нуклеотидную последовательность, но выполняют ту же функцию, что и исходная последовательность, в данном случае это - нуклеотидная последовательность согласно изобретению, кодирующая полипептид с аминокислотной последовательностью согласно изобретению, которая обеспечивает резистентность к бородастости свеклы (ризомании). Поэтому в другом варианте осуществления изобретение включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который является производной полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью согласно изобретению, или аминокислотную последовательность согласно изобретению. Производная полипептида представляет собой производную аминокислотную последовательность, включающую по меньшей мере одно замещение, одну делецию, одну инсерцию или одно добавление одной или нескольких аминокислот с сохранением функциональности кодированного полипептида/белка.

Замещение одной аминокислоты другой аминокислотой с такими же или эквивалентными или аналогичными химико-физическими свойствами называется "консервативное замещение" или "полуконсервативное замещение". Примерами физико-химических свойств аминокислот являются, например, гидрофобность или заряд. Профессионалу известно, какое аминокислотное замещение представляет собой консервативное или полуконсервативное замещение. Кроме того, общие профессиональные знания позволяют распознать, идентифицировать и подтвердить, какие аминокислотные делеции и добавления не нарушают функциональность белка устойчивости, а в каких позициях такие нарушения возможны. Профессионал осознает, что в случае с данным белком NBS-LRR для модификации аминокислотной последовательности (замещения, делеции, инсерции или добавлений одной или нескольких аминокислот), в частности, функциональность упомянутых выше консервативных доменов, должна быть сохранена, и поэтому в этих доменах возможны лишь ограниченные изменения.

Таким образом, изобретение включает функциональный фрагмент описываемой здесь нуклеотид-

ной последовательности. При этом термин "фрагмент" охватывает гены с нуклеотидной последовательностью, достаточно схожей с указанной выше последовательностью. Термин "достаточно схожая" означает первую нуклеотидную последовательность или аминокислотную последовательность, имеющую достаточное или минимальное число идентичных или эквивалентных нуклеотидов или, соответственно, аминокислотных остатков по сравнению со второй нуклеотидной или, соответственно, аминокислотной последовательностью.

Аминокислотная последовательность имеет общий структурный домен и/или общую функциональную активность даже после изменения с применением упомянутого выше метода. Нуклеотидные или аминокислотные последовательности, идентичные по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% нуклеотидной или, соответственно, аминокислотной последовательности по данному изобретению, рассматриваются здесь как достаточно схожие последовательности. Предпочтительно, чтобы достаточное сходство в функциональных фрагментах было обоснованным в случае, если нуклеотидная последовательность или, соответственно, аминокислотная последовательность в целом имеет те же свойства, что и вышеупомянутые нуклеотидные или, соответственно, аминокислотные последовательности по данному изобретению. Предпочтительно, чтобы нуклеотидные последовательности, кодирующие производную или, соответственно, производную аминокислотную последовательность, могли быть созданы непосредственно или опосредованно (например, путем амплификации или репликации) из исходной нуклеотидной последовательности, которая генерируется по всей длине или по меньшей мере частично в нуклеотидной последовательности по данному изобретению.

Соответственно, настоящее изобретение включает нуклеотидную последовательность, способную гибридизировать в жестких условиях нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности по данному изобретению или нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность по данному изобретению.

В дополнительном варианте осуществления данного изобретения описываемая здесь молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один кодированный лейцин-богатый домен (LRR) в соответствии с аминокислотными позициями 558-594 последовательности SEQ ID NO: 4, предпочтительно аминокислотными позициями 542-594 последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотными позициями 604-634 последовательности SEQ ID NO: 4, предпочтительно аминокислотными позициями 582-634 последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотными позициями 760-790 последовательности SEQ ID NO: 4 или аминокислотными позициями 838-869 последовательности SEQ ID NO: 4 и/или по меньшей мере один домен AAA АТФаз в соответствии с аминокислотными позициями 177-289 последовательности SEQ ID NO: 4 или аминокислотными позициями 156-263 последовательности SEQ ID NO: 4. Наиболее предпочтительно, чтобы эти домены присутствовали в полипептиде последовательности от N-конца до С-конца в порядке AAA АТФазы - LRR, при этом между доменами могут присутствовать одна или несколько дополнительных аминокислот.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения описываемая молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид с аминокислотной последовательностью по SEQ ID NO: 2, при этом данная молекула нуклеиновой кислоты включает одну или несколько мутаций, которые приводят к тому, что полипептид, кодируемый этой молекулой нуклеиновой кислоты, в позиции, соответствующей позиции 307 в контрольной последовательности SEQ ID NO: 2, включает аминокислоту, отличающуюся от лизина (K), и/или в позиции, соответствующей позиции 437 в контрольной последовательности SEQ ID NO: 2, включает аминокислоту, отличающуюся от глутамина (Q), и в позиции, соответствующей позиции 566 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, аминокислоту, отличающуюся от аргинина (R), и/или (ii) в позиции, которая соответствует позиции 731 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, аминокислоту, отличающуюся от глутамина (Q), и/или (iii) в позиции, которая соответствует позиции 831 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, аминокислоту, отличающуюся от пролина (P). Первые два замещения ранее были определены как ответственные за резистентность. Хотя роль последних трех замещений в обеспечении резистентности остается неясной, они носят диагностический характер и поэтому могут быть выгодно использованы в методах подтверждения и/или селекции.

В дополнительном варианте осуществления изобретения описываемая молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 2, при этом кодированный полипептид включает глутамин (Q) в позиции, которая соответствует позиции 307 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и/или аргинин (R) в позиции, которая соответствует позиции 437 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и/или гистидин (H) в позиции, которая соответствует позиции 566 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и/или лизин (K) в позиции, которая соответствует позиции 731 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и/или серин (S) в позиции, которая соответствует позиции 831 в контрольной аминокислотной последовательности

сти SEQ ID NO: 2. Данные аминокислотные замещения предпочтительно происходят в результате замещения одного или нескольких нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты последовательности SEQ ID NO: 1, при этом предпочтительно, чтобы один нуклеотид был замещен другим. Соответственно, описываемая молекула нуклеиновой кислоты отличается тем, что данная молекула нуклеиновой кислоты включает в местах, которые соответствуют местам в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, одно или несколько из перечисленных ниже нуклеотидных замещений: С вместо А в позиции 919; G вместо А в позиции 1310; А вместо G в позиции 1697; А вместо С в позиции 2191; и/или Т вместо С в позиции 2491. В предпочтительном варианте осуществления изобретения описываемая молекула нуклеиновой кислоты отличается тем, что эта молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью согласно последовательности SEQ ID NO: 4 и/или включает кодирующую последовательность ДНК согласно последовательности SEQ ID NO: 3; см. также фиг. 1 и ее легенду, включая примеры.

Далее, настоящее изобретение относится к рекомбинантной молекуле ДНК, включающей последовательности описываемой здесь молекулы нуклеиновой кислоты. Предпочтительно, чтобы данная рекомбинантная молекула ДНК дополнительно включала регуляторную последовательность или, соответственно, была соединена с ней ассоциированно/оперативно, предпочтительно с промоторной последовательностью и/или другими последовательностями транскрипционных или трансляционных контрольных элементов, при этом регуляторная последовательность, контролирующая экспрессию гена, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению, отличается тем, что эта регуляторная последовательность способна обеспечивать или модулировать экспрессию гетерологической последовательности ДНК вследствие патогенной инфекции. Предпочтительно, чтобы гетерологическая последовательность ДНК представляла собой нуклеотидную последовательность, кодирующую компонент защиты растений от патогенов (например, гены резистентности (R-гены) или гены, кодирующие участвующие в передаче сигнала ферменты, например киназы или фосфатазы, а также G-белок) или кодирующую патогенный эффектор (так называемые авирулентные гены (*avr*)).

Настоящее изобретение также относится к полипептиду, который может быть кодирован описываемой молекулой нуклеиновой кислоты и к функциональному и/или иммунологически активному его фрагменту, а также к антителу, которое специфически привязывается к полипептиду или к его фрагменту. Наиболее предпочтительно, чтобы полипептид включал аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 4. Процесс получения рекомбинантных белков, полипептидов и фрагментов специалисту известен и описан, к примеру, в издании Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001 или Wingfield, P. T. 2008. *Production of Recombinant Proteins. Current Protocols in Protein Science.* 52:5.0:5.0.1-5.0.4. Поликлональные или моноклональные антитела к белку из настоящего изобретения могут быть получены специалистом известными методами, как описано в издании E. Harlow et al., *Herausgeber Antibodies: A Laboratory Manual* (1988). Получение моноклональных антител и фрагментов Fab- и F(ab')₂, которые также полезны в методах обнаружения белков, может быть произведено разными распространенными методами, как описано в издании Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, S. 98-118, New York: Academic Press (1983). Впоследствии эти антитела могут быть использованы для скрининга экспрессионных библиотек кДНК с целью идентификации идентичных, гомологических или гетерологических генов путем иммунологического скрининга (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 oder Ausubel et al., 1994, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons). В частности, настоящее изобретение относится к антителам, которые избирательно распознают полипептид, кодированный аллелем *wb-R*, и не распознают полипептиды, кодированные, в основном, восприимчивым аллелем *wb-s*, т. е. по меньшей мере в 2 раза, предпочтительно в 5 раз и еще более предпочтительно в 10 и более раз меньше, чем полипептид, кодированный аллелем *wb-R* согласно изобретению.

Еще одним предметом изобретения являются векторы, которые включают описываемую здесь молекулу нуклеиновой кислоты или, соответственно, рекомбинантную молекулу ДНК. Вектором может быть плазида, космида, фаг или вектор экспрессии, трансформации, челночный или клонирующий вектор, может быть двух- или одноцепочечный, линейный или круговой, может трансформировать прокариотический или эукариотический носитель или путем интеграции в его геном, или экстрахромосомно. Предпочтительно, чтобы молекула нуклеиновой кислоты или молекула ДНК согласно изобретению в векторе экспрессии была оперативно связана с одной или несколькими регуляторными последовательностями, которые делают возможной транскрипцию и - что не обязательно - экспрессию в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине; см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001. Предпочтительно, чтобы эти регуляторные последовательности были промоторами или терминаторами, в частности, начальной точкой инициации транскрипции, точкой соединения рибосом, сигналом обработки РНК, участком завершения транскрипции и/или сигналом полиадезилрования. Например, молекула нуклеиновой кислоты находится под контролем соответствующего промотора и/или терминатора. Соответствующими промоторами могут быть промоторы, индуцированные конститутивно (напр.: промотор 35S из "вируса

мозаики цветной капусты" (Cauliflower mosaic virus) (Odell et al., Nature 313 (1985), 810-812), наиболее подходящими являются промоторы с возможностью патогенного индуцирования (напр.: промотор PR1 из петрушки (Rushton et al., EMBO J. 15 (1996), 5690-5700). Наиболее подходящими патогенно индуцируемыми промоторами являются синтетические или, соответственно, химерные промоторы, которые в природе не встречаются, состоят из множества элементов, содержат минимальный промотор, а также выше минимального промотора имеют по меньшей мере один цис-регуляторный элемент, который служит местом соединения для специальных транскрипционных факторов. Химерные промоторы разработаны в соответствии с необходимыми требованиями и индуцируются или прекращаются различными факторами. Примеры таких промоторов приводятся в WO 00/29592, WO 2007/147395 и WO 2013/091612. Соответствующим терминатором является, например, pos-терминатор (Depicker et al., J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 561-573). Обычно векторы дополнительно содержат индикаторные/репортерные гены или гены резистентности для обнаружения переноса желаемого вектора или, соответственно, молекулы ДНК/молекулы нуклеиновой кислоты и для селекции индивидов, которые их содержат, поскольку прямое обнаружение экспрессии гена является довольно трудным. Поскольку описываемая в изобретении молекула нуклеиновой кислоты сама кодирует полипептид, который вместе с вышеупомянутыми мутациями представляет собой белок, обеспечивающий резистентность к ризомании, нет необходимости создавать другой ген резистентности для экспрессии в растительных клетках, но он предпочтителен для быстрой селекции.

Примерами индикаторных/репортерных генов являются ген люциферазы и ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP). Они также позволяют изучать активность и/или регуляцию промотора гена. Примерами генов резистентности, в частности, для трансформации растений, являются ген неомизинфосфотрансферазы, ген гигромицинфосфотрансферазы или ген, кодирующий фосфинотрицин-ацетилтрансферазу. Однако эти примеры не исключают другие известные специалистам индикаторные/репортерные гены или гены резистентности. В предпочтительном варианте осуществления этим вектором является вектор растения.

По другому аспекту данное изобретение относится к клеткам-хозяевам, включающим векторы согласно изобретению, молекулы рекомбинантной ДНК и/или молекулы нуклеиновой кислоты. Клеткой-хозяином в смысле настоящего изобретения может быть прокариотическая (например, бактериальная) или эукариотическая клетка (например, растительная клетка или дрожжевая клетка). Предпочтительно, клеткой-хозяином является агробактерия, например, *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes* или растительная клетка.

Специалисту известны как многочисленные методы, например, конъюгация или электропорация, с помощью которых он может ввести описываемую молекулу нуклеиновой кислоты, молекулу рекомбинантной ДНК и/или вектор из настоящего изобретения в агробактерию, так и различные методы, например, метод трансформации (биолистическая трансформация, агробактериальная трансформация), с помощью которых он может ввести описываемую молекулу нуклеиновой кислоты, молекулу ДНК и/или вектор согласно данному изобретению в растительную клетку (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001).

Кроме того, настоящее изобретение относится к трансгенной растительной клетке, которая включает молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу ДНК в качестве трансгена или вектора по данному изобретению. Такой трансгенной растительной клеткой является, к примеру, растительная клетка, которая трансформируется, предпочтительно стабильно, с помощью описываемой здесь молекулы нуклеиновой кислоты, молекулы ДНК или вектора по данному изобретению. В предпочтительном варианте исполнения трансгенной растительной клетки молекула нуклеиновой кислоты оперативно связана с одной или несколькими регуляторными последовательностями, которые обеспечивают возможность транскрипции и, при необходимости, экспрессии в растительной клетке. Тогда общая структура из молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению и регуляторной последовательности (регуляторных последовательностей) представляет собой трансген. Такими регуляторными последовательностями являются, например, промотор, усилитель или терминатор. Специалисту известны многочисленные функциональные промоторы, усилители и терминаторы, которые могут быть использованы в растениях.

Предпочтительно, чтобы трансгенная растительная клетка по настоящему изобретению, в частности, клетка растения рода свекла, демонстрировала более высокую резистентность к патогену, в частности, к BNYVV по сравнению с соответствующей нетрансформированной растительной клеткой (растительной клеткой без трансгена). Уровень резистентности, например, к BNYVV, может быть качественно определен в растениях рода свекла путем определения баллов в рамках бонитировки (схемы присуждения баллов бонитировки для растений рода свекла известны в соответствии с современным уровнем развития технологий, например, для сахарной свеклы; см. Mechelke (1997) Probleme in der Rizomaniaresistenzzüchtung, Vorträge für Pflanzenzüchtung, Resistenzzüchtung bei Zuckerrüben, Gesellschaft für Pflanzenzüchtung e.V., 113-123). Более высокая резистентность проявляется в улучшении резистентности по меньшей мере на один балл, по меньшей мере на два балла, по меньшей мере на три или более баллов в рамках бонитировки. Кроме того, настоящее изобретение также относится к способу получения трансгенной растительной клетки по данному изобретению, включающему этап введения в растительную клетку мо-

лекулы нуклеиновой кислоты, молекулы ДНК или вектора по данному изобретению. Например, введение может происходить через трансформацию, предпочтительно через стабильную трансформацию. Специалисту известны соответствующие методы введения, например, биолистическая трансформация, агробактериальная трансформация или электропорация (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001).

По другому аспекту настоящее изобретение относится к трансгенному растению и его частям, включающим описанную выше трансгенную растительную клетку. При этом частью может быть клетка, ткань, орган или сочетание нескольких клеток, тканей или органов. Сочетанием нескольких органов является, например, цветок или семя. В особом исполнении данное изобретение относится к семени трансгенного растения, при этом это семя включает в качестве трансгена описываемую здесь молекулу нуклеиновой кислоты. Предпочтительно, чтобы трансгенное растение по настоящему изобретению, в частности, растение рода свекла, демонстрировало более высокую резистентность к патогену, в частности, к BNYVV по сравнению с соответствующим нетрансформированным растением (растением без трансгена). Уровень резистентности, например, к BNYVV, может быть качественно определен в растениях рода свекла путем определения баллов в рамках бонитировки (схемы присуждения баллов бонитировки для растений рода свекла известны в соответствии с современным уровнем развития технологий, например, для сахарной свеклы; Mechelke (1997) *Probleme in der Rizomaniaresistenzzüchtung, Vorträge für Pflanzenzüchtung, Resistenzzüchtung bei Zuckerrüben, Gesellschaft für Pflanzenzüchtung e.V.*, 113-123). Более высокая резистентность проявляется в улучшении резистентности по меньшей мере на один балл, по меньшей мере на два балла, по меньшей мере на три или более баллов в рамках бонитировки. Кроме того, изобретение предусматривает способ получения трансгенного растения, включающий этап введения молекулы нуклеиновой кислоты по данному изобретению или вектора по данному изобретению в растительную клетку и, при необходимости, селекцию трансгенной растительной клетки. Кроме того, такой способ получения трансгенного растения отличается последующим этапом, включающим регенерацию трансгенного растения из трансгенной растительной клетки, созданной на первом этапе. Методы регенерации известны специалисту из современного уровня развития технологий.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение также относится к способу обеспечения или повышения резистентности к патогену, в частности, к BNYVV, растения, предпочтительно растения рода свекла, который включает этап трансформации растительной клетки с молекулой нуклеиновой кислоты по данному изобретению или вектором по данному изобретению. В качестве альтернативы, как было описано выше, из восприимчивого к ризомании генотипа с помощью случайной или направленной мутагенезации имеющегося эндогенного гена *wb-s* может быть получен резистентный к ризомании генотип.

Например, ген *wb* может быть модифицирован путем мутации гена с помощью TALE-нуклеаз (TALENs) или нуклеаз цинковых пальцев (ZFNs), а также с помощью систем CRISPR/Cas, описанных, среди прочего, на примерах из WO 2014/144155 A1 (*Engineering plant genomes using CRISPR/Cas systems*) и в издании Osakabe & Osakabe, *Plant Cell Physiol*, 56 (2015), 389-400. Этому результату также можно добиться с использованием метода, называемого TILLING (Targeted Induced Local Lesions in Genomes - поиск индуцированных локальных нарушений в геномах), при этом, как описано, например, в немецкой патентной заявке DE 10 2013 101 617, в гене дикого типа вызываются точечные мутации, а затем производится селекция растений, обладающих соответствующей, т.е. обеспечивающей резистентность, мутацией, как, например, в случае с ячменем, устойчивым к вирусной мозаике; см. DE 10 2013 101 617 на страницах 4, 8 и 12 в разделах [0014], [0026] и [0038]. Метод TILLING также подробно описан в публикации Хеникоффа и др. (Henikoff et al., *Plant Physiol*, 135, 2004, 630-636).

Предпочтительно, чтобы этот способ приводил к повышению резистентности по меньшей мере на один балл, наиболее предпочтительно к повышению резистентности по меньшей мере на два, три или более баллов бонитировки. Схемы присуждения баллов бонитировки для растений рода свекла известны в соответствии с современным уровнем развития технологий, например, для сахарной свеклы: Mechelke (1997). После мутагенезации растительных клеток и последующей регенерации растений из мутагенизированных растительных клеток или мутагенезации растений можно идентифицировать растения, которые в эндогенной молекуле нуклеиновой кислоты, предпочтительно с нуклеотидной последовательностью, имеющей или включающей последовательность согласно SEQ ID NO: 1, или гибридирующей с комплементарной SEQ ID NO: 1 последовательностью в жестких условиях, имеют одну или несколько описанных выше мутаций.

По другому аспекту настоящее изобретение относится к резистентному к BNYVV растению рода свекла или к его части, в котором молекула нуклеиновой кислоты согласно изобретению присутствует эндогенно или в которой одна или несколько из указанных выше мутаций были введены в эндогенную молекулу нуклеиновой кислоты, коррелирующую в противном случае с восприимчивым к ризомании генотипом, при этом это растение или его часть не относятся к роду *Beta vulgaris* subsp. *maritima*. В одном из вариантов осуществления изобретения описываемым здесь растением является гибридное растение или диплоидное растение. В дополнительном варианте осуществления растения согласно изобретению молекула нуклеиновой кислоты или одна или несколько описанных выше мутаций являются гетерозиготными или гомозиготными. Например, в случае с гибридным растением молекула нуклеиновой ки-

слоты или одна или несколько мутаций могут также быть гемизиготными.

В другом варианте осуществления растение по данному изобретению дополнительно имеет трансгенную или эндогенную вторую молекулу нуклеиновой кислоты в другой или дополнительной позиции в геноме, кодирующем полипептид, способный обеспечить резистентность к BNYVV в данном растении, где полипептид экспрессируется в результате транскрипции второй молекулы нуклеиновой кислоты. Другая или дополнительная позиция в геноме может означать, что вторая молекула нуклеотида находится за пределами участка хромосомы III от s3e4516s05 до s3e5918s01. Например, ген RZ-3, описанный в международной заявке WO 2014/202044 A1, может быть введен в растение wb-R данного растения путем скрещивания или трансформации, если его еще нет в исходном генотипе. Поэтому в наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения создаются растения wb-R/RZ-3-R, которые предпочтительно являются гомозиготными для одного и, в частности, предпочтительно для двух генов резистентности. В этом контексте предполагается, что благодаря наличию информации о последовательности гена wb-R в настоящей заявке и, например, информации о последовательности гена RZ-3, описанной в вышеупомянутом документе WO 2014/202044 A1, такие растения с двойной резистентностью могут быть получены, прежде всего, только путем скрещивания и селекции с использованием маркерных методов, так что не требуется никаких процедур генной инженерии.

В соответствии с этим настоящее изобретение также относится к способу идентификации растения рода свекла, обладающего резистентностью к патогену BNYVV, отличающемуся тем, что данный способ включает следующий этап

(i) подтверждение наличия и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, обеспечивающей резистентность к ризомии согласно изобретению, в растении или, соответственно, в его образце; и/или

(ii) подтверждение по меньшей мере одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, обеспечивающей резистентность к ризомии согласно изобретению, или в непосредственном окружении, предпочтительно в хромосоме III; и/или

(iii) подтверждение по меньшей мере двух маркерных локусов в хромосоме III растения, при этом по меньшей мере один маркерный локус находится на участке (или в его пределах) хромосомы от s3e4516s05 до молекулы нуклеиновой кислоты, обеспечивающей резистентность к ризомии согласно изобретению, и по меньшей мере одного маркерного локуса на участке (или в его пределах) хромосомы от упомянутой молекулы нуклеиновой кислоты до s3e5918s01; и при необходимости,

(iv) селекцию резистентного к BNYVV растения, при этом данный способ предпочтительно дополнительно отличается тем, что по меньшей мере один маркерный локус включает одну или несколько описанных выше мутаций. В дополнительном варианте осуществления способ также включает соответствующее подтверждение еще одного генотипа резистентности, в частности, предпочтительно гена RZ-3, как описано в WO 2014/202044 A1.

Преимуществом данного способа является подтверждение по меньшей мере одного полиморфизма, приводящего к аминокислотному замещению по сравнению с аминокислотной последовательностью, показанной на фиг. 1B (SEQ ID NO: 2), предпочтительно в одном из выделенных мест изображенных на фиг. 1D (SEQ ID NO: 4) аминокислотных последовательностей (см. также легенду к фиг. 1) с полиморфизмами, выделенными на фиг. 1C (SEQ ID NO: 3), по молекулярным маркерам, которые распознают полиморфизмы, в частности, диагностические полиморфизмы. Предпочтительно, чтобы это подтверждение происходило с использованием по меньшей мере одного молекулярного маркера на каждый полиморфизм, в частности, на каждый диагностический полиморфизм. Специалисту известно, какие маркерные методы следует применять для подтверждения соответствующего полиморфизма и как конструировать для этих целей молекулярные маркеры. Кроме того, настоящее изобретение относится к молекулярным маркерам, описывающим или, соответственно, обнаруживающим полиморфизм в соответствии с фиг. 1C или D, а также к применению молекулярного маркера для обнаружения полиморфизма в соответствии с фиг. 1C и/или D. Помимо этого, вышеуказанные методы идентификации также представляют собой методы селекции растения, резистентного к BNYVV. Этот метод селекции включает заключительный этап селекции резистентного растения.

Дополнительно участки геномной последовательности ДНК, примыкающие выше относительно гена wb-R (как SEQ ID NO: 3) и ниже относительно гена wb-R, которые локализованы в непосредственном окружении, предпочтительно в хромосоме III, и поэтому тесно связаны с геном wb-R, могут быть использованы в качестве областей ДНК для разработки диагностических маркеров для wb-R. Поэтому настоящее изобретение также относится к методу селекции растения, резистентного к BNYVV. Данный метод селекции включает использование молекулярного маркера на последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID NO: 3 и/или на последовательности ДНК, локализованной в непосредственном окружении, предпочтительно в хромосоме III. Предпочтительно, чтобы локализованные в непосредственном окружении маркеры согласно описанным в примерах маркерам s3e4516s05 и s3e5918s01 были расположены в диапазоне 0,11 сМ, что приблизительно соответствует физической длине в 100 000 пар оснований гена wb-R и показывает сопоставимое диагностическое значение (ДЗ), как (a) s3e4516s05_cyt / ДЗ=0,89; по левой стороне и (b) s3e5918s01_ade / ДЗ=0,91; по правой стороне. Метод селекции дополнительно включает, как правило, заключительный этап селекции резистентного растения. Специалисту известно,

как разработать и использовать маркеры на основе раскрытой информации о последовательностях.

Соответственно, настоящее изобретение относится также к растению, предпочтительно, в частности, к резистентному к BNYVV растению или к его части, которое было идентифицировано описанным выше способом и, при необходимости, подвержено селекции. В частности, настоящее изобретение относится к популяции растений, включающей растения, которые могут быть получены одним из описанных выше способов согласно изобретению и которые предпочтительно устойчивы к бородатости свеклы (ризомании) или, соответственно, к BNYVV, и которые отличаются наличием молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Предпочтительно, чтобы популяция состояла из не менее 10, предпочтительно из 50, предпочтительнее из 100, наиболее предпочтительно из 500, а, в частности, в сельском хозяйстве - из не менее 1000 растений. Предпочтительно, чтобы доля растений в популяции, не имеющих молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению и/или подверженных ризомании, составляла менее 25%, предпочтительно менее 20%, предпочтительнее менее 15%, еще более предпочтительно менее 10%, и, в частности, менее 5%, 4%, 3%, 2%, 1 % или 0,5%, если таковые вообще имеются.

Данное изобретение может также обеспечить следующие преимущества для выращивания и разработки новых резистентных семейств растений рода свекла: информация о последовательности, а также идентифицированные полиморфизмы, позволяющие различать резистентные аллели wb-R и восприимчивые аллели wb-s раскрытого гена, делают возможной разработку маркера непосредственно в гене, что значительно упрощает работу селекционера, в частности, в плане разработки оптимизированных элитных линий без эффекта "сцепленного груза" (Linkage Drag). Кроме того, знание структуры последовательностей может быть использовано для идентификации новых генов резистентности, в частности, к ризомании, которые, например, частично гомологичны или ортологичны.

Раскрытое здесь применение аллеля гена резистентности в цис- или транс-генетических подходах открывает возможность получения новых устойчивых сортов рода свекла, обладающих более высокой резистентностью за счет эффекта дозы или позволяющих избежать нарушения резистентности путем пирамидирования раскрытого гена с другими генами устойчивости, в частности, с геном RZ-3, и оптимизировать проявление резистентности. Кроме того, возможны модификации гена методом TILLING или целенаправленная геномная инженерия для разработки новых аллелей резистентности.

Настоящее изобретение также относится к применению идентифицированного резистентного аллеля гена wb-R в генетической или молекулярной пирамиде вместе с другими генетическими элементами, способными обеспечить растению благоприятные с точки зрения агрономии характеристики. Это может значительно увеличить экономическую ценность культивируемых растений, например, за счет повышения урожайности или открытия новых площадей для выращивания растений, которые ранее были недоступны из-за биотических факторов, таких как сильное патогенное давление или из-за абиотических факторов, таких как засуха. В частности, настоящее изобретение относится к применению идентифицированного резистентного аллеля гена wb-R в методах контроля поражения патогеном вируса некротического пожелтения жилок (Beet Necrotic Yellow Vein Virus - BNYVV) в сельском хозяйстве или садоводстве при выращивании растений рода свекла, например, в области идентификации и селекции растений рода свекла с помощью одного из описанных выше методов выращивания отобранных таким образом растений или их потомства.

Выгодным с точки зрения агрономии свойством является, например, толерантность к гербицидам, например, таким как глифосат, глюфосинат или ингибиторам ALS. Из современных технологий специалисту известны многие другие гербициды и их применимость. Он может ознакомиться с современными технологиями для получения знаний о том, какие генетические элементы и каким образом необходимо использовать для обеспечения надлежащей толерантности растений. Другим примером выгодного с точки зрения агрономии свойства является дополнительная устойчивость к патогенам, при этом патогенами могут быть насекомые, вирусы, нематоды, бактерии или грибки. Сочетание различных уровней резистентности/толерантности к патогенам может, например, обеспечить широкую патогенную защиту растения, поскольку генетические элементы могут оказывать взаимодополняющее воздействие друг на друга. Специалисту известны, например, многие гены резистентности как генетические элементы. Еще одним примером выгодного с точки зрения агрономии свойства является толерантность к пониженным температурам или к заморозкам. Растения с этим свойством могут быть посеяны раньше или могут оставаться в поле дольше, к примеру, даже в период заморозков, что может привести, например, к повышению урожайности. И здесь специалист также может ознакомиться с современными технологиями, чтобы найти подходящие генетические элементы. Другими примерами выгодных с точки зрения агрономии свойств являются эффективное использование воды, азота, а также урожайность.

Генетические элементы, которые могут быть использованы для получения таких свойств, известны из существующих технологий.

Специалисту также известно множество модификаций для патогенной защиты. Наряду с подробно описанными семействами R-генов можно было бы выгодно использовать подход Avt/R, комплементацию гена Avt (WO 2013/127379), автоактивацию R-гена (WO 2006/128444), подход HIGS (host induced gene silencing) (например, WO 2013/050024) или подход VIGS (virus induced gene silencing). В частности, значимым для данного изобретения мог бы быть метод автоактивации R-гена. Для этого необходимо со-

здать нуклеиновую кислоту, кодирующую автоактивированный белок резистентности для получения устойчивости растений к патогенам. В этом случае нуклеиновая кислота имеет лишь ограниченную часть гена резистентности NBS-LRR, например, гена *wb-R*, который продолжается от конца 5' области кодирования гена резистентности NBS-LRR вверх до начала домена NBS гена резистентности NBS-LRR, при этом ген резистентности NBS-LRR не является геном резистентности TIR-NBS-LRR.

Кроме того, изобретение также относится к применению резистентного аллеля гена *wb-R*, идентифицированного описанным выше способом, для комбинирования с одной из описанных выше модификаций или с описанным выше генетическим элементом, который может обеспечить для растения одно или несколько выгодных с точки зрения агрономии свойств.

Кроме описанного здесь растения настоящее изобретение также относится к семенам или к потомству, органам, частям растений, тканям или клеткам этих растений при получении продукции, как правило, изготавливаемых из возобновляемого сырья, например, продукты питания и корма для животных, предпочтительно сахар или сироп (меласса), при этом меласса также используется в промышленности, к примеру, при производстве спиртов или в качестве питательной среды для получения биотехнологических изделий, при изготовлении материалов или веществ для химической промышленности, например, химические продукты тонкого органического синтеза, медикаменты или, соответственно, их полуфабрикаты, диагностические средства, косметика, биоэтанол или биогаз. Пример использования сахарной свеклы в качестве биогенного сырья в биогазовых установках описан в заявке DE 10 2012 022 178 A1, см., например, абзац 10.

Приведенные ниже примеры дают пояснения к изобретению, не ограничивая при этом предмет изобретения. Если не указано иное, использовались стандартные молекулярно-биологические методы, см. например (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001), Fritsch et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989; Mayer et al., *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology*, eds., Academic Press, London, 1987) и Weir et al., *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV, Blackwell, eds., 1986).

Примеры

Пример 1: Идентификация гена (WB1), обеспечивающего резистентность к ризомании (бородатость свеклы, WB), и соответствующих восприимчивых аллелей

В популяции сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) с интрогрессией из приращения *Beta vulgaris* subsp. *maritima* с помощью маркеров с хорошим диагностическим значением (ДЗ) в этом приращении удалось подтвердить ген, обеспечивающий резистентность к бородатости свеклы (ризомании) или, соответственно, сегмент генома, (a) *s3e4516s05_cyt* / ДЗ=0,89; по левой стороне и (b) *s3e5918s01_ade* / ДЗ=0,91; по правой стороне. Однако оба этих маркера не являются в полной мере диагностическими в связи с возникновением нулевых аллелей в различных родословных. Генетическая длина области генома между *s3e4516s05* и *s3e5918s01* составляет 0,11 сМ, что приблизительно соответствует физической длине в 100 000 пар оснований. Эта область последовательности является высокоповторяемой и демонстрирует сильные структурные вариации в различных генотипах; поэтому очень трудно разработать другие диагностические маркеры. Из-за того, что генетическая структура сегмента генома, обеспечивающего резистентность к ризомании, неизвестна, можно лишь в ограниченной степени снизить потенциальный "негативный сцепленный груз" (Linkage Drag) вокруг причинного гена.

Первые эксперименты по более точной локализации значимого сегмента генома и, при необходимости, по поиску гена, обеспечивающего рассматриваемую резистентность или, соответственно, генного локуса, отвечающего за восприимчивость растений к ризомании, завершились неудачей, среди прочего, из-за высоких показателей повторяемости целевой области и сильной структурной вариативности (нулевые аллели) во многих генотипах и отсутствия других маркеров с высоким диагностическим значением. Кроме того, анализ экспрессии генов-кандидатов в исследуемой области первоначально не дал никаких доказательств, т. е. специфического ответа на инфекцию ризомании. В итоге фенотипирование растений также было затруднено, поскольку проявление резистентности не всегда было однозначным по неизвестным причинам, так что сначала предполагалось наличие мультигенной резистентности и/или эпигенетических эффектов, которые можно было исключить только путем увеличения числа изученных растений с 90-180 потомками и с применением интенсивных статистических методов (t-тестирование, анализ мощности).

В ходе дальнейших экспериментов и анализов с использованием "картографического клонирования" (Map Based Cloning), которое включало этапы тонкого генетического картирования, физического картирования, анализ последовательностей WHG (весь геном), создание очень большой популяции из более чем 2000 потомков F2, скрининг рекомбинантов, разработку маркеров в исследуемой области, сравнительное секвенирование ВАС в резистентных (RR) и восприимчивых (ss) генотипах, биоинформационный анализ, прогнозирование белков и сравнение белков, удалось установить, что ген NB-ARC (NBS-LRR) отвечает за наблюдаемую резистентность к ризомании. Этот ген NBS-LRR был идентифицирован в результате интенсивного тонкого картирования, при этом из-за сложности последовательности сборка последовательностей RR и ss оказалась непростой задачей, но только благодаря анализу потомства 4 ближайших рекомбинантных растений (2 прямых рекомбинанта слева и 2 прямых рекомбинанта

справа от гена) удалось точно идентифицировать ген NBS-LRR. Последовательность гена NBS-LRR резистентного генотипа отражена в SEQ ID NO: 3, а соответствующий ген или генотип был назван "wb-R" (от сочетания "Wurzelbärtigkeit-Resistenz" - резистентность к ризомании). В гене NBS-LRR были обнаружены в общей сложности 17 "несинонимичных" полиморфизмов одиночных нуклеотидов (SNPs) (полиморфизмов, ведущих к аминокислотному замещению в белке). Основываясь на данных последовательности, состоящей из восприимчивых и устойчивых генотипов, 5 аминокислотных замещений оказались полностью диагностическими:

K307Q, "C" вместо "A" в геномной последовательности в позиции 919 в резистентном генотипе, что замещает кодированный лизин (K) в позиции 307 восприимчивого гена глутамином (Q),

Q437R, "G" вместо "A" в геномной последовательности в позиции 1310 в резистентном генотипе, что замещает кодированный глутамин (Q) в позиции 437 восприимчивого гена аргинином (R),

R566H, "A" вместо "G" в геномной последовательности в позиции 1697 в резистентном генотипе, что замещает кодированный аргинин (R) в позиции 566 восприимчивого гена гистидином (H),

Q731K, "A" вместо "C" в геномной последовательности в позиции 2191 в резистентном генотипе, что замещает кодированный глутамин (Q) в позиции 731 восприимчивого гена лизином (K),

R831S, "T" вместо "C" в геномной последовательности в позиции 2491 в резистентном генотипе, что замещает кодированный пролин (P) в позиции 831 восприимчивого гена серином (S); см. фиг. 1.

Благодаря точкам рекомбинации одно из двух или оба аминокислотных замещения K307Q или Q437R могут рассматриваться как причина обеспечения резистентности. Соответствующие последовательности генов или генотипов, коррелирующих с восприимчивым к ризомании фенотипом, были названы "wb-s" (от сочетания "Wurzelbärtigkeit-sensitiv" - восприимчивые к ризомании).

Пример 2: Валидация гена wb-R с применением подхода RNAi

В дополнение к описанной выше верификации гена с помощью узких рекомбинантов в качестве еще одного доказательства можно продемонстрировать эффект резистентности гена с использованием интерференции РНК; см., например, верификацию гена RZ-3, описанную в примерах (Examples) международной заявки WO 2014/202044 A1 или верификацию гена *vil*, описанную в примерах (Examples) международной заявки WO 2011/032537 A1. Для этого резистентный стандартный генотип сахарной свеклы трансформируется с помощью конструкции ДНК, кодирующей двухцепочечную РНК-шпильку. Эта двухцепочечная РНК способна пост-транскрипционно вызывать глушение генов, которое уменьшило бы или устранило влияние аллеля гена wb-R, в результате чего проявлявший прежде резистентность генотип сахарной свеклы должен был стать восприимчивым к бородатости свеклы (ризомании).

Для получения подходящей конструкции ДНК, предпочтительно из области кодирующей последовательности, выбирают определенную область целевой последовательности резистентного аллеля гена wb-R на участке длиной, например, 400-500 пар оснований, которые являются специфическими для резистентного аллеля гена wb-R, подвергают амплификации с использованием ПЦР и клонируют как в направлении восприимчивости, так и в направлении невосприимчивости, в вектор pZFN, который подходит для синтеза структур шпилек (см. фиг. 6 международной заявки WO 2014/202044 A1). Этот вектор включает двойной промотор CaMV 35S, место множественного клонирования, интрон гена *AtAAP6*, кодирующий в *Arabidopsis thaliana* аминокислотную пермазу, дополнительное место множественного клонирования, а также *nos*-терминатор. Трансформация сахарной свеклы с использованием готового вектора осуществляется по протоколу Lindsey & Gallois, J. Exp. Bot. 41 (1990), 529-536 с применением антибиотика Канамицина в качестве селективного маркера. После нескольких этапов селекции успешность трансформации трансгенных побегов проверяют с помощью ПЦР путем подтверждения присутствия гена *prtII*, интрона *AAP6* и обеих пограничных последовательностей t-ДНК (LB/RB), а также отсутствия *vir*. Побеги с положительными результатами размножают клонированием *in-vitro* до, соответственно, 30 побегов, укореняют и размещают в почве в теплице. Примерно через 2 недели растения трансгенной сахарной свеклы пикируют в зараженную ризоманией почву, где их культивируют в течение 8-10 недель. Для контроля используют не трансформированные растения с таким же фоном резистентной генетической стандартной трансформации, культивируемые в тех же условиях. Для подтверждения проявления ризомании корни сахарной свеклы собирают и определяют количество зараженных BNYVV единиц в ходе теста ELISA, при этом низкое значение ELISA указывает на резистентность, а высокое значение - на восприимчивость (Mechelke 1997, см. выше; Clark & Adams, J. Gen. Virol. 34 (1977), 475-483). Среднее значение ELISA 3-4 для трансформированной сахарной свеклы ожидаемо значительно выше значения ELISA для по-прежнему резистентных контрольных единиц со средним значением 1-2 и сопоставимо со стандартом восприимчивости. В соответствии с этим по результатам теста ELISA можно продемонстрировать, что специфическое глушение генов резистентного аллеля wb-R на фоне трансформации делает устойчивое прежде растение восприимчивым к BNYVV. Следовательно, ген wb-R согласно данному изобретению можно однозначно верифицировать как ген резистентности.

Валидация функции гена также может быть осуществлена путем комплементации восприимчивого к ризомании растения, в частности, сахарной свеклы с геном wb-R согласно изобретению, например, путем трансформации вектора экспрессии растений, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3 или, соответственно, с эквивалентной нуклеотидной по-

следовательностью, кодирующей полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 в восприимчивый генотип, в каждом случае с контролем конститутивного промотора. Для трансформации, в принципе, можно использовать описанный выше вектор рZFN и упомянутые технологии или те из них, которые были приведены в общем описании.

Заключение

Создание гена wb-R согласно изобретению позволяет добиться более эффективного выращивания растений, устойчивых к бородастости свеклы (ризомании), или, соответственно разрабатывать новые резистентные линии. Ген wb-R и описанные выше варианты осуществления настоящего изобретения раскрывают другие возможности применения, например, использование резистентного аллеля гена в в цис- или транс-генетических подходах с целью разработки новых резистентных сортов, "пирамидирование генов" - повышение резистентности за счет эффекта дозы, модификация гена с использованием метода TILLING или целенаправленная геномная инженерия/редактирование гена для разработки новых аллелей резистентности, а также определение взаимодействий между wb-R и другими генами резистентности к ризомании с целью выведения сортов с оптимальным проявлением резистентности.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, способный обеспечить устойчивость к вирусу некротического пожелтения жилок свеклы (Beet Necrotic Yellow Vein Virus - BNYVV) растения рода *Beta vulgaris*, в котором экспрессируется этот полипептид, отличающаяся тем, что она включает последовательность нуклеотидов, выбранную из

(a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид с аминокислотной последовательностью по SEQ ID NO: 2 или полипептид с аминокислотной последовательностью, идентичной по всей длине последовательности SEQ ID NO: 2, по меньшей мере, на 80%, в которой в результате одной или нескольких мутаций нуклеотидной последовательности происходит, по меньшей мере, одно аминокислотное замещение, где в положении, соответствующем положению 307 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, лизин (K) заменяется на глутамин (Q), и/или в положении, соответствующем положению 437 в контрольной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, глутамин (Q) заменяется на аргинин (R); или

(b) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность по SEQ ID NO: 1 или гибридирующей с дополнительной последовательностью с образованием SEQ ID NO: 1 в жестких условиях, в которой в результате одной или нескольких мутаций происходит, по меньшей мере, одно нуклеотидное замещение, что приводит к аминокислотному замещению, при этом в положении, соответствующем положению 919 в контрольной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, А заменяется на С, и/или в положении, соответствующем положению 1310 в контрольной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, А заменяется на G.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что кодированный полипептид дополнительно включает (i) в аминокислотной последовательности, соответствующей SEQ ID NO: 2, в позиции 566 аминокислоту, отличную от аргинина (R), и/или (ii) в позиции 731 аминокислоту, отличную от глутамина (Q), и/или (iii) в позиции 831 аминокислоту, отличную от пролина (P).

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1 или 2, отличающаяся тем, что кодированный полипептид (i) включает в аминокислотной последовательности, соответствующей SEQ ID NO: 2, глутамин (Q) в позиции 307, и/или (ii) аргинин (R) в позиции 437, и/или (iii) гистидин (H) в позиции 566: 2, и/или (iv) лизин (K) в позиции 731, и/или (v) серии (S) в позиции 831.

4. Молекула нуклеиновой кислоты по п.3, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты по SEQ ID NO: 1 дополнительно содержит одно или несколько из перечисленных ниже нуклеотидных замещений:

(c) А вместо G в позиции 1697;

(d) А вместо С в позиции 2191; и/или

(e) Т вместо С в позиции 2491.

5. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что она кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью согласно последовательности SEQ ID NO: 4 и/или содержит кодирующую последовательность ДНК согласно последовательности SEQ ID NO: 3.

6. Вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-5.

7. Трансгенная клетка растения рода свекла, включающая в качестве трансгена молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-5.

8. Трансгенное растение рода свекла или его часть, включающее растительную клетку по п.7.

9. Резистентное к BNYVV растение рода свекла или его часть, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-5, при этом растение или его часть не относится к подвиду *Beta vulgaris* subsp. *maritima*.

10. Резистентное к BNYVV растение рода свекла или его часть, в котором одна или несколько мутаций, указанных в одном из пп.1-4, вносятся в молекулу эндогенной нуклеиновой кислоты, содержа-

щую последовательность SEQ ID NO: 1 или комплементарную последовательность, гибридизирующуюся с SEQ ID NO: 1 в жестких условиях, при этом растение или его часть не относится к подвиду *Beta vulgaris subsp. maritima*.

11. Растение по п.9 или 10, отличающееся тем, что оно представляет собой гибридное растение.

12. Растение по пп.8, 9 или 10, отличающееся тем, что растение является дигаллоидным растением.

13. Растение по пп.8, 9 или 10, отличающееся тем, что молекула нуклеиновой кислоты является гетерозиготной или гомозиготной.

14. Растение по пп.8, 9 или 10, отличающееся тем, что одна из множества мутаций является гетерозиготной или гомозиготной.

15. Семя растения по любому из пп.8-14, которое трансгенно или эндогенно содержит одну или несколько упомянутых выше молекул нуклеиновой кислоты или векторов.

16. Способ выведения резистентного к BNYVV растения, включающий следующие этапы

(а) мутагенизацию клеток растений с последующей регенерацией растений из мутагенизированных растительных клеток или мутагенизацию растений,

(б) идентификацию растения из (а), содержащего в эндогенной молекуле нуклеиновой кислоты молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-5 и одну или несколько мутаций, указанных по любому из пп.1-5.

17. Способ идентификации растения рода свекла, обладающего резистентностью к патогену BNYVV, включающий

(i) подтверждение наличия и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-5 в растении или, соответственно, в его образце; и/или

(ii) подтверждение, по меньшей мере, одного маркерного локуса в нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-5 или в непосредственном окружении, на хромосоме III, при этом, по меньшей мере, один маркерный локус содержит одну или несколько мутаций, указанных по любому из пп.1-4; и/или

(iii) подтверждение, по меньшей мере, двух маркерных локусов в хромосоме III растения, при этом, по меньшей мере, один маркерный локус находится на участке или в его пределах хромосомы от SEQ ID NO: 5 до молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из пп.1-5, и, по меньшей мере, один маркерный локус находится на участке или в его пределах хромосомы от молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из пп.1-4 до SEQ ID NO: 6; и,

(iv) селекцию резистентного к BNYVV растения.

18. Растение, идентифицированное способом по п.17 и подвергнутое селекции.

19. Способ контроля поражения вирусом некротического пожелтения жилок свеклы (Beet Necrotic Yellow Vein Virus - BNYVV) растений рода свекла в сельском хозяйстве или садоводстве, включающий

I) идентификацию и селекцию растений рода свекла способом по п.16 и

II) выращивание растений из I) или их потомства.

A

ATGGGAAGCATTTCAGTCTGACATCGCGTTGGCTTTGCTTCAAGATTGGTAGAAGATTTAAATCATTAGTCATTGATGA
 AGCAGGTCAAATAGTACAGTTTGTATGCAGAGGATGAACCTGAAGAACTGGAGAGGAAGCTATTAAAGGCCAAAGTCTTGC
 TTGGCAGCTTTCAGCTGACAAACCGACAAAATTTGCCAACCTGGGTTGGTGAATGTCACCAGAGTTTGCATATGCTGAA
 GACTTGGTTGATGATATAGTCTTGTATGCCGGCAAACTTCATTGCTTGAGAAGATCTTGTCAATTTTCAAGAAGGGAAG
 CATGGCCCGGAAGATCCAGAGCTCCAAGATAGTTGGAGATATAATAAGTGGATTAGACATGGTTAACAAAACAAAGC
 AACCAGCACAGCAATCTTATTAGGGGAGTTTGTATTGGTAACGAACAATTAACCTACACAGAGAAGTTATTGGGAGG
 GATGCAGATAAAGGAGAACATTATCTCCATGTTACTGGAACACACAATAAGCTCAGTATCTATTGTTGGCATGGACGGCT
 TGGTAAARCAACACTTGTCTCAGAATATGCTATATGATCCAGAAATCCAGGAGAAATTCATCATAGAGTGTGGGTCCGCT
 TGTCTCCGAAGCTTGTCTCAGAAAATCACAGACTTATCTTACATCCGAGGCAAAATGTCAGTACAGCTTCTTCTCT
 GAGAAAATATATGGTTGTTTCCAGATCTGTATATGGGTAAAAGTATATTGATTGTCTGGATGACTTATGGCATGTCAA
 GTACGATGATTGGAGGCTTTTCGCTCTTTGTTTCTGGGCTCTTCTGGTTGCAAAAGTTCTTCTCACCACATAGCAATCCAA
 ATGTAACACCGGTTACAAAAGCTACACCGTATCATTAAAAATGATCAAGGATGAAGATGGCCAAAGCTCTAATCATGCT
 AGAGTTTCTCATTAATAATCTATCTGAACGTCAGCTTGAATCTTGGAGGATATTGCTGTAGCAGTTGCCAAAAGTG
 CAAGGGCTTGCCTGGCAGCAATGTTTGGGCTCCATTTATCTTCTGGGCGTAGAGATGAAATGGATGAATTTT
 TAGATAGAGACATATCCGAGTTGAGGGTATTCAAAGAAGAAATTTCTGCTTTTACACTGAACAACCTTGTTCGCA
 TCACACTTAAAGAAGTGTCTTGTCTTACTGCTCATTATTTCTCATGATTACGATTTCAAGAAAGAAAACCTTAGTTGAGCT
 AITGATGTCAGAAGGTTTTTCTGCTCAAAGGATGACAAGCTTAGAACAAATTTGGCAGTGAITGTTTTGAIAGGCTCT
 TGGGAGATCTGCTTTCAACTTTACATGTGGTGTAGGAGCTACCAACTTACAAAATGCATGAATTTATTCGAGG
 TTTGCTGAATTTTGGCCCTCAGACACATGTTCCGGTGGGAGGAGGTCAGAGCTTCTTCTCAGTCTTCTGGTACAAAAC
 GGCCTGCTCATTATCTTTGCTTTGIGATTGCATCAAACGAGCATTCCTTAAAIACATTTGAAAATTTGIGATGGTCTGAGGA
 CATTCTCTGCTAAGTGAAGAAGGAAACACAAATTTGGCCAGCTTCTTATTCACITTTCCAGAAACIAGTACGACTGCCA
 GTTCTGGACTTGAAGTACTGATATGATGAGCTCCCGGAGTCAITGGGTAGATTAAGTATCTTCCGTTATTCGATGCT
 ATCTCAGACACATATCCAAAGTTGCTTAAGTCAAGTACCACTTCAATCAATTACAAGTACTCAGATTGAGAGAAITGTT
 ATAACTCTTAGAGTTGCCAAAACATTAAGAACCTGACTAACCTTCTACATCTTGACGTGGACATTAAGGATTAGGG
 TGTAGCCAGCAAGTATAGGAAGTCTAAGTTGCTTAAACACTTCCCTTCTTGTGTTTGAAGAAGTAGGATATCG
 CATTGCAAGTGAAGAACTGAAGAACTATGATGTTGATCAATTTGCCTTAGTAACTTTGAAAATGTTAAGGATGGGGCAG
 AGGCCAGGCGGATGATATGATGATAGCCATATATCAAAGGTTGGAATTAGAATGGAGCCGTTTTTCTCGAGATGGG
 TCAATAGAGATGGATGTTCTTCTGGCTTCAACAGACAAAATTTGAAAGAACTGCAAGTAACTCAACTATGGTGGTTC
 GAGCTTTCCTGCTTGGCTTACAGCCATCTTGCATGCTTGTGAGTATCTATATGCAAAATTTGCGGCAAGATGACTTTC
 TGCCTTCACTTGGCAACTTCTTCTTCAAGACACTTCTATGTTGAAGGATGATGATAGCCTGAAGTATGTTGACTATCAT
 TTTTGTGTAAGTACAACTGGGCTTCTTCTTCTTGGAACTCACTGAAGTCCAGGACATGATGTGCTTATGAGTTG
 GTATCCATTAGCAGACATAGCTTGTCCAACTCCGTGATCTTACAATAGAGGATTTCCAAAGTCTCTTCTCAATGCAAT
 CGCTAAAACATATGAGTTCACTACAAGAACIAGTATCAACTGTGCCAGGGCTGGAGACATGCTCAGCTACACAGGA
 TCAATTCAGTCAATGATCAATTTTCAAAGTATATGGTGAACAGCGGTGTCAAGATTGAAGAAGGCTTCAATGGAACAT
 CATAAAACAATTCCTTATGTGGAGATTGACTACGAGGATATGTTCTGGAGATTCAAGTTAG

B

MEAFQSDIALALLQDLLERFKSLVIDEAGQIVQFPAEDLKKLERKLLKAQVLLGSPQLTTDKNQHWVGDVIRVCYDAE
 DLVDDIVLDAGKTSLEKILSYFTRGSMARKIQELQDRLEDIISGLDMVNTKQRAQCCYLGEFVYQNEQLLLEKLFGR
 DADKENIISMLLEQTISSVSIYVMDGLGKTTLAQNMLYDSRIQEFHHRVWVRSKAFDLRKTDFILHRRQCEYSFLP
 EKITYLFDLYMGKSLILVLDLWDVRYDDWRSFRSLFLRSSGCKVLLTTSNPNVTIVTKATPYHLKLMKDEDCQALIMD
 RVFSSNNLSERQLVILEDIAVAQAQCKKGLPLAANVLSLHSSGRDRDEWNNFLDRDICELRVFKBEIPPAFRLNPNCLA
 SHLKKLCLAYCSLPHDYDFKKNLVQLWMSGEGFLPQRMTSLBQIGSDCFDELLWRSVFLSHVGDQELPTYKMHFIRR
 FAEFVADTDFRWEBCQSSFSVPWYKARHLSLLDCIKPAFLKYIENCGLRTPFLLSSEKTIQQLFYSFLFKLVRRLR
 VLDLSRTDIDELPELGRKLYRYPDASQTHILRLPKSVTNLHQLQVLRLECYKLELFPKNIKNLINLLHLDVDIKGLR
 CRPASIGLSCLKTLPSFAVCKKVGYRIARELKNLKNLCCTICLSNLENVKGAEARDAMICDKPYIKRLEWRSRFDG
 SIEMDVLAGLQFDKNLKLQVINYGSSFFAWLTSPLMVSIMQNCRQDDFLPSLQQLPFLKTLHVEGMHSVKYVDYH
 FCGESTTGAFPSLESKIQDMMCLMSWYPLPDNSLLQLRDLTIEDCPSLFSMQSLKHMSSLOQLVINCCPGLTLPQLFG
 SIQSLIIFESDMVKQRQIEBGEWNIKTIPIYVEIDYESSMFFGDS*

Фиг. 1

C

ATGGAAGCATTTCAGICTGACATCGCGTTGGCTTGGCTCAAGATTGTTAGAAAAGATTTAAATCATTAGTCATCGAIGA
AGCCAGTCAAGTAGTACAGTTTGTGCGAGAGGATGAACTGAAGAACTGGAGAGGAAAGCTAAAAAGGCCCAAGTCTTGC
TTGGCAGCTTTCAGCTGACAAACCGCAAAAAATGGCAACACTGGGTTGGTGTGTCACACAGAGTTTGGCTAIGATGCIIGAG
GACTTGGTTGATGATATAGTGTGATGCGCGCAAAACTTCATTGGCTTGAGAGGATCTGTCAATTTTCAAGAGGAAAG
CATGGCCCCGAAGATCCCAAGAGCTCCCAAGATAGGTTGGAAATATAAATAAGTGGATTAGACATGGTTAACCAAAACAAAGC
AAGGAGCAGCAATGTTATTAGGGGAGTTTGGTTAAGGAAACCAAACTTACTCCTAACAGAGAAGTTAATTGGGGAGG
GATGCAGATAAGGAGAACATTATCCAGATGTGCTGGAACAGACAAATAAGCTCAGTATCTATTGTTGGCATGGACGGCT
TGGTAAACAAACACTTTCCTCACAATATACTATATGATCCAGATCCAGGAGAAATTCATCATAGAGTGGGCTCCCTG
TGTCTGCGAAGTTTGAICTGAGAAAAATCACAGACTTATCTTACAICGCAAGCAGGAAATGAGIACAGCTTCTTCTCT
GAGAAAATACATTTGTTTTCACGATCTGATATGGGTAAAGTATATTGATGTTGTTGGATGACTATGGGATGTGAA
GTACAATGATTGGAOCTCTTTTCCTCTTTTCTTCTGCTTCTGCTTCCAAAGTTCTTCCACCACTAGCAATCCAA
ATGTAACAACGGTTACAAGACTACTCCGTAATCAATTAQAATTGATGAAAGGATGAAGATTGCCAAGCTTCAATCATGGAT
AGAGTTTCTCATCTAATAAATCTATCTGAACTGAGCTTGTAACTTGGAGGATATTGCTGAGCAGTTGCCAAAAAGT
CAAGGGCTTGGCTCTGCGCAGCAATGTTTGGCCCTCCATTTATCTTCTGCGCTAGAGATGATGAATGGATGAATTTT
TAGATAGAGACATATGTGAGTTGAGGCTATTCAAGAGAAATAATTTCTGCTTTTAGACTGACCAACCTGGTTGGCA
TCACACTTAAAGAGTGTCTGCTTACTGCTCATTATTCTCATGATTACGATTTCAAGAAAGAAACTTAGTTCAGCT
ATGGATGTCAGAAAGTTTCTGCTTCAAGGATGACAAGCTAGAACAAATGGCAGTGAATGTTTGGATGAGCTCT
TGTGGAGATCTGCTTTCACACTTCACATGTTGGTGTAGCAGGAGTACCAACTTACAAAATGATGAATTTATTCGACGG
TGTCTGTAATTTGTGGCTCAGACACATGTTTCCGGTGGGAGGAGGTCAGAGCTCTTCTCAGTTCCCTGGTACAAAC
GGCTGCTCATTATCTTGTCTTGTGATGCAATAAACAGCATTCCCTAAATACATTTGAAATTTGATGGTCTTAGGA
CATTTCTGCTAAGTGAAGAAAGGACACAAATTTGGCCAGCTTCCCTATTCACTTTCCAGAACTAGTACGACTGGGA
GTCTGGACTTGGTCACTACTGATATTGATGAGCTCCCGGAGTCAATGGGTAGATTAAGTATCTTCGGTATTTCGATGC
ATCTCAGACACATATCTAAGTTGCTTAAGTCAAGTACCAACTTCATCAATACAACTACTCAGATTGAGAGAAATGTT
ATAAACTTCTAGAGTTGCCAAAAACAATAAGAACCTGACTAACCTTCTACATCTGACGTGGACATTAAGGATTAAGG
TGTAGCCAGCAAGTATAGGAAGTCAAGTGGCTTAAACACTTCCCTTCTTGGCTGTTGAAAGGATGAGGATACG
CATTCGAGAGTGAAGAACTGAAAGAACTATAGTGGTACAATTTGCCCTAGTATCTTGAATAATGTTAAGGATGGGGCAG
AGCCAGGACCGGATGATATGATAAGCCATATATCAAAAGGTGGAATTAGAATGGAGCCGTTTTCTCGAGATGGG
TCAATAGAGATGGATGCTTCTGCTGCGCTTAAACAGACAAAAATTTGAAAGAACTGCAAGTATCAATATTGGTGGTTT
GAGCTTCCGCTTGGCTTACAAGCCCATCTGCAAGCTTGTGAGTACTATATGCAAAAACGTCGGCAAGATGACTTTC
TGGCTTGGCTTGGGCAACTTCCCTTCCCAAGACACTTCATGTTGAAGGATGCAATAGCGTGAAGTATGAGACTATCAT
TTTTGGGTGAAAGTACAACCTGGGGCTTTCCTTCCITGGAATCACTGAAGATCCAGGACATGATGTGCTTATGAGTGT
GTATCCATTAACAGACAACTGCTCCAGCTCCGATCTTACAATTTGAGGATTTCCAAAGTCTCTTCAATGCAAT
CGCTAAACATATGAGTCTCACTACAAGAACTAGTATCAACTTGGCCAGGGCTGGAGACATTGGCTCAGCTACAGGA
TCAGTTCACTATTGATCAATTTCCGGAAGTATGTTGGAACAGCGGTGTCAGATTGAAGAGGCTCCGAAATGGAACAT
GATAAAAAAATTCCTTATGTCGAGATGACTACGAGATGTTTCTGGAGATTCAAGTTAG

D

MEAFQSDIALALLQDLLERFKSLVIDEAGQVVFDAEDELKLERLKAQVLLGSFQLTTRKNWQHVVGDVIRVCYDAB
DLVDDIVLDAGKTSLEKILSYPTRGSMARKIQELQDRLEDLISGLDMVNKIKQRAQQCYLGEFVYVNEQLLLEKLFGR
DADKENITMHLLEQTISSVIVGMDGLKTTLAQNI LYDSRIQEKFNHVVWRVSAKFDLRKIITDFILHRQCEBYSFLP
EKIHCFLHDLVMGRSILIVLDDLDWVYKNDWSFRSLFLRSOGCKVLLTTSNPNVTVTKATPYHLQMRDEDCQALIMD
RVFSSNNLSERQLVILEDLAVAVAQKCKGLPLAANVLGLHLSGRDDEWMNFDLDRICELRVFKKEIFPAFRLNPLA
SHLKKLACYSLFPDYDFKKNLVQLWMSGFFLPRMSTSLRQIGSDCPDELLWRSVFLSHVGDQELPTKMHFTRR
FAEFVADTCFRWEBCQSSFSVPWYKTRHLSLDCIKPAFLKYIENCGLRFTLLLSERGTQIQQLFVSLFQKLVLR
VLDLSHTDIDELPESLGRKYLRYFDASQTHILRLPKSVNLHQVLRRECYKLELPRKNIKNLNLHLDVDIRKLR
CRPASIGSLCLKTLPSFAVCKRVGYRIAEKLNKLNLCGTICLSNLENVKDGABARDAMICDKFYIKRLEBWSRFSRQ
SIEMDVLAGIKPDRNLKELQVINYGSSFPAAWLTSPSCMLVSYMQNCRQDDFLPSLGLQPFLLKTLHVEGMHSVKYVDYH
FCGSESTIGAFPSLESKIQMMLMSWYPLSDNSLQLRDLTIEDCFSLFSKQSLKHMSSLQELVINCCPGLTLPQLFG
SVQSLIIFGSDMVQRQCQIEBGEWNMIKTTPYVIDYBEMFFGDS*

Фиг. 1 (продолжение)



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2