

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393269** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.01.15

(22) Дата подачи заявки
2022.06.16

(51) Int. Cl. *A01H 1/04* (2006.01)
A01H 6/82 (2018.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
A01H 1/06 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)

(54) **РАСТЕНИЯ, УСТОЙЧИВЫЕ К ЗАРАЖЕНИЮ ВИРУСОМ МОЗАИКИ ПЕПИНО**

(31) **P202130569**

(32) **2021.06.18**

(33) **ES**

(86) **PCT/EP2022/066499**

(87) **WO 2022/263602 2022.12.22**

(71) Заявитель:

АБИОПЕП, С.Л.;

КОНСЕХО СУПЕРИОР

ДЕ ИНВЕСТИГАСИОНЕС

СИЕНТИФИКАС (СиЭсАйСи) (ES)

(72) Изобретатель:

Аранда Регулес Мигель А., Брето

Монфорт Ма Пау, Руис Рамон

Фабиола, Родригес Сепульведа

Паскуаль, Донайре Сегарра Ливия

(ES)

(74) Представитель:

Махлина М.Г. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к растениям, содержащим в своем геноме ген, который был инактивирован, что делает растение устойчивым к инфекции вируса мозаики пепино (PerMV). Настоящее изобретение также относится к инактивации гена, необходимого для инфекции PerMV. Настоящее изобретение охватывает части этих растений и их потомство, которые демонстрируют инактивацию указанного гена и, как следствие, улучшенный фенотип с точки зрения устойчивости к инфекции PerMV. Способы получения растений или частей растений или семян, устойчивых к инфекции PerMV, также являются частью настоящего изобретения. Настоящее изобретение дополнительно относится к гену и связанным с ним последовательностям в качестве маркеров для отбора растений, устойчивых к инфекции PerMV. Следовательно, настоящее изобретение относится к области сельского хозяйства.

A1

202393269

202393269

A1

РАСТЕНИЯ, УСТОЙЧИВЫЕ К ЗАРАЖЕНИЮ ВИРУСОМ МОЗАИКИ ПЕПИНО

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к растениям, содержащим в своем геноме ген, который был инактивирован, что делает растение устойчивым к инфекции вируса мозаики пегино (PerMV). Настоящее изобретение также относится к инаktivации гена, необходимого для инфекции PerMV. Настоящее изобретение охватывает части этих растений и их потомство, которые содержат инаktivацию указанного гена и, как следствие, улучшенный фенотип с точки зрения устойчивости к инфекции PerMV. Способы получения растений, частей растений или семян, устойчивых к инфекции PerMV, также являются частью настоящего изобретения. Настоящее изобретение дополнительно относится к гену и связанным с ним последовательностям в качестве маркеров для отбора растений, устойчивых к инфекции PerMV. Следовательно, настоящее изобретение относится к области сельского хозяйства.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Вирусы, в частности вирусы растений, имеют небольшие геномы, кодирующие очень небольшой набор белков; с помощью этих нескольких инструментов вирусам необходимо завершить свои циклы, включая репликацию, перемещение внутри хозяина, противодействие защите хозяина и передачу между хозяевами, просто для реализации основных функций. Чтобы добиться этого, вирусы захватывают и разрушают механизмы растительных клеток, взаимодействуя с факторами хозяина, которые выполняют провирусные функции (Hyodo and Okuno, 2020, *Advances in Virus Research*, vol 107. Academic Press, Cambridge, pp 37-86); провирусные факторы хозяина часто называют факторами восприимчивости хозяина, поскольку в их отсутствие (или в присутствии изоформы, нефункциональной для вируса), хозяин не является восприимчивым или является не полностью восприимчивым. Что касается фенотипа взаимодействия растения с вирусом, потеря восприимчивости эквивалентна устойчивости растений (Kourelis and van der Hoorn, 2018, *Plant Cell* 30, 285-299), и поэтому она представляет первостепенный интерес для селекции. Селекционеры растений на протяжении многих лет использовали рецессивные гены устойчивости для создания устойчивых к вирусам сортов; в случаях, изученных достаточно глубоко, все рецессивные гены вирусорезистентности соответствуют гипотезе кодирования провирусного фактора (Nicaise, 2014, *Front Plant Sci* 5, 1-18). Рецессивные гены устойчивости к вирусам, охарактеризованные на сегодняшний день в естественном разнообразии видов сельскохозяйственных культур, по-видимому,

принадлежат только к одному классу, кодирующему факторы инициации эукариотической трансляции (eIF) семейств 4E и 4G (Truniger and Aranda, 2009, *Advances in Virus Research*, vol 75. Academic Press, Cambridge, pp 119–159). Иная картина возникает, когда коллекции мутантов модельных видов проверяют на предмет потери восприимчивости к вирусам; в этом случае были описаны факторы хозяина, отличные от eIF4E или 4G (Makiinen, 2020, *Ann Appl Biol* 176, 122-129). Однако возможность их использования при выведении сортов сельскохозяйственных культур, устойчивых к вирусам, все еще остается малоизученной.

Вирус мозаики пегино (PepMV) представляет собой одноцепочечный вирус с положительной смысловой РНК, принадлежащий к роду *Potexvirus* (семейство *Alphaflexiviridae*) и вызывает эпидемии в посевах томатов во всем мире; действительно, PepMV наносит очень серьезные экономические потери при интенсивном выращивании томатов во всем мире. Виды вируса мозаики пегино весьма разнообразны: на сегодняшний день описано как минимум пять штаммов. Учитывая его экономическое значение, в коллекциях *Solanum spp.* были проведены проверки для выявления источников устойчивости к PepMV (Soler *et al.*, 2011, *J. Plant Dis Prot* 118, 149-155.), но с ограниченным успехом; выявленные устойчивости являются частичными и/или штаммоспецифичными, что вместе с генетической удаленностью источника устойчивости от культивируемых томатов делает их малоинтересными для селекции. Также были идентифицированы факторы хозяина, взаимодействующие с факторами PepMV; это случай родственных изоформ теплового шока 70 (Hsc70), которые взаимодействуют с белком оболочки PepMV (CP) (Mathioudakis *et al.*, 2014, *Mol Plant-Microbe Interact* 27, 135.6-1369). Hsc70, по-видимому, обладает провирусной функцией в отношении PepMV, но его подавление вызывает тяжелый фенотип у целевых растений (Mathioudakis *et al.*, 2014, *Mol Plant-Microbe Interact* 27, 135.6-1369), что делает его непригодным для селекции. Для потексвирусов было идентифицировано несколько других провирусных факторов, но их функции не были проверены на PepMV, или их использование в селекции сортов томатов, устойчивых к PepMV, не предусмотрено.

Следовательно, необходимы новые механизмы, которые снижают восприимчивость растений к инфекции PepMV, при этом такие механизмы работают для нескольких или всех штаммов PepMV и представляют собой стабильные механизмы, которые противостоят адаптации и уклонению вируса, чтобы их можно было использовать в селекции.

РАСКРЫТИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Чтобы решить вышеупомянутую проблему отсутствия у растений полезной устойчивости к PepMV, авторы проверили коллекцию мутантных растений томатов для

выявления мутаций, которые показали связь со сниженной восприимчивостью к ПерMV. В результате скрининга были обнаружены мутантные растения со сниженной вирусной нагрузкой и отсутствием симптомов, типичных для инфекции ПерMV. Геном таких мутантов был охарактеризован с помощью объемного сегрегантного анализа в сочетании с высокопроизводительным секвенированием для определения источника устойчивости растений к инфекции ПерMV. В конечном итоге было установлено, что источником является инактивация определенного гена, кодирующего белок. Путем обратного скрещивания с растениями дикого типа и анализа потомства можно было установить, что устойчивость имеет рецессивную природу (см. примеры), поскольку частоты сегрегации почти идеально соответствуют ожидаемой сегрегации генов в модели, в которой устойчивость является моногенной и рецессивной.

Мутантные растения не имеют очевидного фенотипа, кроме повышенной устойчивости к ПерMV или пониженной восприимчивости к ПерMV (см. примеры).

Таким образом, первый аспект настоящего изобретения относится к растению (здесь и далее к растению по настоящему изобретению) или его части, репродуктивному или размножающемуся растительному материалу, включая семена (отсюда и далее к репродуктивному или размножающемуся растительному материалу по настоящему изобретению), или растительной клетке (здесь и далее растительной клетке по изобретению), характеризующейся тем, что она содержит ген (далее и далее ген по изобретению), который кодирует белок, при этом указанный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 62%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и указанный ген инактивирован. В предпочтительном варианте осуществления растение по изобретению или его часть, репродуктивный или размножающийся растительный материал по изобретению или растительную клетку по изобретению не получают исключительно посредством по существу биологического процесса.

Как указано, авторы изобретения определили мутантные растения, обладающие устойчивостью к заражению ПерMV. Термин «растение», используемый в настоящем документе, включает целые растения, любой «материал для репродукции или размножения» растения, потомство растений и части растений, включая семена, стебли, плоды, листья, цветы, побеги, стебли, клубни, корни изолированные растительные клетки, каллус, ткани и органы. Ссылки на растение могут также включать растительные клетки, протопласты растений, культуры тканей растений, каллусы растений, кластеры растений и растительные клетки, которые неповреждены в растениях или частях растений, таких как

зародыши, пыльца, семязачатки, семена, листья, цветы, ветви, фрукты, зерна, шипы, початки, кожура, стебли, корни, кончики корней и тому подобное. Потомство, варианты и мутанты любого из растений, описанных здесь, входят в объем настоящего изобретения. Также включены семена любого из указанных растений. В данном контексте термин «части растения» включает любую часть или части растения, включая семена, стручки, плоды, листья, цветы, побеги, стебли и/или корни.

Как известно специалисту в данной области, настоящее изобретение также может быть реализовано в растительных клетках. Термин «растительная клетка», используемый здесь, включает растительные клетки, полученные и/или выделенные из ткани растительных клеток или из культуры растительных клеток.

Описанное здесь изобретение относится к растениям с улучшенной устойчивостью к заражению ПерMV или улучшенным фенотипом с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV. В другом предпочтительном варианте осуществления растение по настоящему изобретению или его часть, или репродуктивный или размножающийся растительный материал по настоящему изобретению, или растительная клетка по настоящему изобретению характеризуются повышенной устойчивостью или пониженной восприимчивостью к инфекции ПерMV или улучшенным фенотипом с точки зрения ПерMV устойчивости к инфекциям по сравнению с контрольными растениями дикого типа.

Используемые здесь выражения «устойчивость к инфекции ПерMV» и «пониженная восприимчивость к инфекции ПерMV» относятся к снижению титра вируса или отсутствию вируса в растении по изобретению или репродуктивном или размножающемся растительном материале по изобретению или растительной клетке по изобретению по сравнению с контрольными растениями, материалами или растительными клетками дикого типа. В предпочтительном варианте снижение титра вируса составляет по меньшей мере 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% по сравнению с растением дикого типа. Кроме того, выражения «устойчивость к инфекции ПерMV» и «улучшение фенотипа с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV» относятся к уменьшению или отсутствию симптомов, провоцируемых инфекцией. В предпочтительном варианте устойчивость к инфекции ПерMV или улучшенный фенотип с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV приводит к уменьшению симптомов в соответствии с тестом по шкале болезни (см. примеры) для получения лучших результатов в таком тесте, чем у растений дикого типа, то есть по шкале 0-2 (0 — отсутствие симптомов, 1 — спорадические ярко-желтые пятна на вновь появляющихся листьях, 2 — ярко-желтая мозаика, поражающая все вновь появляющиеся листья) от 2 до 1 или до 0 баллов.

Авторы настоящего изобретения определили, что устойчивость к инфекции ПерMV или улучшенный фенотип с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV обусловлены инактивацией гена по изобретению. В предпочтительном варианте растение по настоящему изобретению или его часть, или репродуктивный или размножающийся растительный материал по настоящему изобретению, или растительная клетка по настоящему изобретению характеризуются тем, что инактивированный ген кодирует белок, причем указанный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую не менее 60%, 62%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 1. В другом предпочтительном варианте растение по настоящему изобретению, или репродуктивный или размножающийся растительный материал по настоящему изобретению, или растительная клетка по настоящему изобретению характеризуются тем, что инактивированный ген кодирует белок, причем указанная аминокислотная последовательность белка состоит из SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1

MIQSSFSADSPSMAANSTFSPPPAAGDGFNYDVAWYGNIQYLLNISAIGALTCLLIFIF
GKLRSDHRRMPGPTAIVSKLLAAWHATGVEIARHCGADAAQYLLIEGGSSALLLFLALL
S
LAVMLPLNIYAGKAPMADQFSKTTINHIEKGSPLLWIHFIFVVIVVVLVHYGISEIQERL
KITRLRDGYGNPSNSGTNVSAIFSIMVQGVPKTLGFDKTPLEVEYFQHKYPGKVYRVVVP
M
DLCALDDLATELVKVREDISKLVSRIELRGYLNEGEEDEYNNDVSVNGRGLLERLCFLWR
K
AKDTWYHVVDQLGFSDEERLRKLQELRADLEMEMASYKEGRARGAGVAFVVFKDVF
TANK
AVQDLRNEKRRRYGRFFSVIELQLQRNQWKVERAPLATDIYWNHLGSTKFSCLKLRRVL
VN
TCLLLMLLFCSSPLAVISAIQSAGRIINAEAMDHAQMWLNWVQGSSWLATIIFQFLPNVL
IFVSMYIVVPSVLSYLSKFEQHLTVSGEQRAELLMVCFFLVNLILLRALVESTLEGALL
SMGRCYLDGEDCKKIEQYMTASFLTRTCLSSLAFLITSSFLGISFDLLAPIWIKKKLQK
FRKNDMLQLVPERSEEYPLENQDIDSLERPLIHERSSTVIADNNGFLHDASPNEIDFPQG
DLSEYPPVSRTPVPKPKFDFAQYYAFNLTIFALTLIYCSFAPLVVPVGA VYFGYRYLVD
KYNFLFVYRVRGFPAGNDGRLMDTVLSIMRFCVDLFLLSMLLFFSVRGDSTKLQAIFTL
G
LLVVYKLLPSDKDSFQPALLQGIQTIDNIVEGPTDYE VFSQPTFDWDTYNS

Термин «инактивированный», используемый в настоящем документе, относится к уменьшению, снижению или полному или частичному ингибированию экспрессии целевого гена или целевого аллеля по меньшей мере примерно на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, от 85% до 100% по сравнению с его нормальной экспрессией в растении дикого типа. Кроме того, термин «инактивация» также используется здесь как синоним «замалчивания» и как синоним «нокаута», который относится к модификации нуклеотидной последовательности гена таким образом, чтобы продуцировать нефункциональную информационную РНК или белок с пониженной функцией или нефункциональный белок. В более предпочтительном варианте растение по настоящему изобретению, или репродуктивный или размножающийся растительный материал по настоящему изобретению, или растительная клетка по настоящему изобретению характеризуются тем, что инактивированный ген кодирует белок, причем указанный белок содержит SEQ ID NO: 2, предпочтительно состоит из SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 2 является результатом мутации в SEQ ID NO: 1 в положении 554, где аминокислота лизин заменена стоп-кодоном. В другом предпочтительном варианте растение по настоящему изобретению, или репродуктивный или размножающийся растительный материал по настоящему изобретению, или растительная клетка по настоящему изобретению характеризуются тем, что инактивированный ген кодирует белок, причем указанный белок содержит SEQ ID NO: 3, предпочтительно состоит из SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 3 возникает в результате делеции аминокислот с 11 по 408 в SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 2

MIQSSFSADSPSMAANSTFSPPPAAGDGFNYDVAWYGNIQYLLNISAIGALTCLLIFIFG
KLRSDHRRMPGPTAIVSKLLAAWHATGVEIARHCGADAAQYLLIEGGSSALLLFLALLS
LAVMLPLNIYAGKAPMADQFSKTTINHIEKGSPLLWIHFIVVIVVVLVHYGISEIQERLKI
TRLRDGYGNPSNSGTVNSAIFSIMVQGVPKTLGFDKTPLEVEYFQHKYPGKVYRVVPM
DLCALDDLATELVKVREDISKLVSRIELRGYLNEGEEDYNNDSVNGRGLLERLCFLWR
KAKDTWYHVVDQLGFSDEERLRKLQELRADLEMEMASYKEGRARGAGVAFVVKDV
FTANKAVQDLRNEKRRRYGRFFSVIELQLQRNQWKVERAPLATDIYWNHLGSTKFSLK
LRRVLVNTCLLLMLLFCSSPLAVISAIQSAGRIINAEAMDHAQMWLNWVQGSSWLATIIF
QFLPNVLIFVSMYIVVPSVLSYLSKFEQHLTVSGEQRAELLKMVCFVLNLILLRALVEST
LEGALLSMGRCYLDGEDCK

SEQ ID NO: 3

MIQSSFSADSQKFSCLKLRRVLVNTCLLLMLLFCSSPLAVISAIQSAGRIINAEAMDHAQM
WLNWVQGSSWLATIIFQFLPNVLIFVSMYIVVPSVLSYLSKFEQHLTVSGEQRAELLKM
VCFFLVNLILLRALVESTLEGALLSMGRCYLDGEDCKKIEQYMTASFLTRTCLSSLAFLIT
SSFLGISFDLLAPIWIKKKLQKFRKNDMLQLVPERSEEYPLENQDIDSLERPLIHERSSTV
IADNNGFLHDASPNEIDFPGQDLSEYPPVSRVSPVPKPKFDFAQYYAFNLTFALTLYCSF
APLVVPGAVYFGYRYLVDKYNFLFVYRVRGFPAGNDGRLMDTVLSIMRFCVDLFLLS
MLLFFSVRGDSTKLQAIFTLGLLVVYKLLPSDKDSFQPALLQGIQTIDNIVEGPTDYEVFS
QPTFDWDTYNS

В настоящем изобретении инактивация относится к гену по изобретению. В настоящем описании термин «ген» относится к любому сегменту ДНК, связанному с биологической функцией. Следовательно, гены включают кодирующие последовательности и/или регулирующие последовательности, необходимые для их экспрессии. Гены также включают неэкспрессируемые сегменты ДНК, которые, например, образуют последовательности распознавания других белков. Гены могут быть получены из множества источников, включая клонирование из представляющего интерес источника или синтез на основе известной или предсказанной информации о последовательностях, и могут включать последовательности, разработанные так, чтобы иметь желаемые параметры. Выражение «кодирует белок», используемое здесь, относится к тому факту, что ген по изобретению содержит необходимые нуклеотидные последовательности, которые позволяют его транскрибировать в информационную РНК, которая затем транслируется в аминокислотную последовательность, которая будет свернута в функциональный белок. В предпочтительном варианте ген по изобретению содержит последовательность геномной ДНК SEQ ID NO: 4. В другом предпочтительном варианте ген по изобретению инактивирован и содержит нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. В другом предпочтительном варианте ген по изобретению инактивирован и состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

Как указано выше, растение с устойчивостью к заражению ПерMV или улучшенным фенотипом с точки зрения устойчивости к заражению ПерMV относится к растению с более низким титром вируса или сниженными симптомами инфекции по сравнению с растением дикого типа. Аналогичным образом, инактивация гена по изобретению также включает снижение уровня экспрессии гена, снижение уровня доступных мРНК, транскрибируемых из указанного гена, уменьшение количества функционального белка, кодируемого указанным геном, как а также полное уничтожение гена и/или функционального белка. В случаях, когда имеет место снижение, указанное снижение определяют по сравнению с

растением дикого типа. Термин «дикий тип» (также обозначаемый как «wildtype», «wild type» или WT), используемый здесь, относится к типичной форме растения или гена в качестве контрольного растения, не содержащего инактивированный ген по изобретению, улучшенной версии контрольного растения вблизи изогенных линий. «Растение дикого типа» относится к растению с фенотипом, соответствующим растению, не содержащему инактивированный ген по изобретению в природной популяции.

Несмотря на то, что ген по изобретению и кодируемый им белок имеют ортологи со сходными структурными характеристиками белка, несмотря на то, что он был идентифицирован как источник пониженной восприимчивости к инфекции ПерМV у растений томата или улучшенного фенотипа с точки зрения устойчивости к инфекции ПерМV, как показано авторами изобретения (см. примеры). Чтобы идентифицировать гомологи белка, специалисты в данной области обычно используют идентичность аминокислотной последовательности двух белков. Термин «идентичность», используемый здесь, относится к доле идентичных аминокислот или нуклеотидов между двумя сравниваемыми пептидами/белками или нуклеотидными последовательностями, соответственно, вдоль их полноразмерной последовательности. Способы сравнения последовательностей известны из уровня техники и включают, помимо прочего, программы BLASTP или BLASTN, EMBOSS Needle, ClustalW и FASTA. Мы можем считать, что пептиды, белки или нуклеотидные последовательности с процентной идентичностью не менее 60%, 70%, 80%, 90% будут сохранять те же свойства, что и последовательность, с которой их сравнивают.

Идентификация гомологов гена по изобретению указывает на то, что инактивация указанных гомологов может быть использована для создания растений, устойчивых к инфекции ПерМV или с улучшенным фенотипом с точки зрения устойчивости к инфекции ПерМV. Следовательно, в другом предпочтительном варианте растение по настоящему изобретению или его часть, или репродуктивный или размножающийся растительный материал по настоящему изобретению, или растительная клетка по настоящему изобретению принадлежит к семейству пасленовых. В другом предпочтительном варианте растение по изобретению или его часть, или репродуктивный или размножающийся растительный материал по изобретению, или растительная клетка по изобретению принадлежит к родам *Solanum* sp, the *Capsicum* sp, *Nicotiana* sp или *Physalis* sp. В еще более предпочтительном варианте осуществления виды выбраны из списка, состоящего из: *S. lycopersicum*, *S. tuberosum*, *S. melongena*, *S. pennellii*, *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *S. cheesmanii*, *S. galapagense*, *S. chilense*, *S. aethiopicum*, *S. quitoense*, *S. torvum*, *S. muricatum*, *S. betaceum*, *S. chmielewskii*, *S. arcanum*, *S. cornellimulleri*, *S. habrochaiti*, *S. huaylasense*, *S.*

neorickii, *S. dulcamara*, *S. Lycopersicoides*, *S. sitiens*, *S. juglandifolium*, *S. ochranthum* и *S. cheesmaniae*. Настоящее изобретение также относится к синонимам данных видов, таким как *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon esculentum* Mill., *Lycopersicon esculentum* var. *esculentum*, *Solanum esculentum*, *Solanum esculentum* Dunal.

Следует понимать, что вид также включает все входящие в него подвиды и разновидности или сорта. Термин «разновидность», используемый здесь, относится к группе растений в пределах вида, которые имеют общие признаки, которые отличают их от других возможных разновидностей этого вида. Такой отличительный признак или совокупность признаков должны быть стабильными после размножения и достаточно однородными среди своих особей и потомства. Для автогамных или самоопыляющихся видов, таких как семейство *Solanaceae*, большинство коммерческих сортов представляют собой чистые линии или инбредные растения, а также гибриды F1 между двумя инбредными растениями. Термин «сорт», используемый здесь, относится к растению, имеющему биологический статус, отличный от «дикого» статуса, причем «дикий» статус указывает на исходное некультивируемое или естественное состояние растения или образца. Термин «сорт» включает, помимо прочего, полуестественные, полудикие, сорные, традиционные и семейные сорта, местные сорта, селекционный материал, исследовательский материал, селекционную линию, синтетическую популяцию, гибрид, исходную/базовую популяцию, инбредную линию (родительская для гибридного сорта), обособленную популяцию, мутантный/генетический материал и усовершенствованный/улучшенный сорт.

Таким образом, в другом предпочтительном варианте осуществления растения по настоящему изобретению или его части, или репродуктивный или размножающийся растительный материал по настоящему изобретению, или растительная клетка по настоящему изобретению вида *S. lycopersicum* включает разновидности/культуры Anna Russian, Applause, Aussie, Baladre, Bella Rosa, Black cherry, Black Pear, Black russian, Blondkopfchen, Brandywine, Cabri, Caracas, Carbón, Ceylan, Cherokee purple, Cherry, Comanche, Costoluto genovese, Ditmarcher, Dombito, Estrella, Eros, Gallician, Glacier, Gartenperle, Green sausage, Grushovka, Harzfeuer, Hugh, Jersey devil, Juboline, Kosovo, Krim black, Kumato, Liguria, Limachino, Lime green salad, Manitoba, Marvel stripe, Moneymaker, Marglobe, Meltine, Monserrat, Muchamiel, Nemato, Opalka, Pera de Girona, Piña Hawaiana, Rio grande, RAF, Roma, Siberian, Sprite, Sugary, Sun sugar, Sobeto, Sonatine, Tigerella, Terrades, Vergel, White Queen, Raf Claudia, Roma, Valenciano, Adoration, Alicante, Azoychka, Better Boy, Big Beef, Big Rainbow, Blaby Special, Black Krim, Branywine, Campari, Celebrity, Canario (tomato), Tomkin, Early Girl, Enchantment, Ferris Wheel, Flamenco, Fourth of July, Garden

Peach, Gardener's Delight, Granadero, Great White, Green Zebra, Hanover tomato, Japanese Black Trifele, Jubilee, Juliet, Lillian's Yellow, Matt's Wild Cherry, Micro-Tom, Moneymaker, Monterosa, Mortgage Lifter, Mr. Stripey, Pantano Romanesco, Plum tomato, Raf tomato, Rebellion, Red Currant, Rosa de Barbastro, San Marzano, San Pedro, Sasha Altai, Tiny Tim, Cherry Bambelo, Cherry Nebula, Santorini, Tomaccio, Yellow Pear, White Queen, Corazón de Buey, Angela, Colgar en Rama, Ciruela Negro, Optima, Pata Negra, Copia, Velasco, Montenegro, Vertyco, Ventero, Ramyle, Pitenza, Paladium, Mayoral, Razymo, Motto, Caniles, Byelsa, Royalty, Trujillo, Delizia, Dumas Duratom, Larguero, Torry, Tovistar, Pintón, Grueso, Larga Vida, Marenza, Window box Roma, Ninette, Retinto, Boludo, Anairis, Tobi Star, Myla, Guarapo, Atago, Jawara, Velasco, Manitu, Colbi, Duraton, Patriarca, Danubio, Intense, Pera Fitto, Vernal, Cecilio, Cherry Kumato, Cherry Amarillo, Cherry Redondo, Cherry Ministar, Cherry Guindos, Cherry Marinica и Cherry Angel.

В другом предпочтительном варианте растение по настоящему изобретению или его часть, или репродуктивный или размножающийся растительный материал по настоящему изобретению, или растительная клетка по настоящему изобретению семейства *S. tuberosum* включает варианты/сорта Kennebec, Monalisa, Desirée, Bintje, Álava, Palogan, Pedro Muñoz, Roja Riñón, Duquesa, Goya, Olalla, Turia, Víctor, Lora, Gauna, Alda, Belda, Buesa, Iturrieta, Diba, Fénix, Onda, Arene, Asun, Ayala, Eburne, Gorbea, Idoia, Iker, Inca, Isla, Mayka, Mikel, Montico, Nagore, Nerea, Zadorra, Zarina и Zela.

Для получения растения по настоящему изобретению, репродуктивного или размножающегося растительного материала или растительной клетки по настоящему изобретению, как указано в настоящем документе, использовали как исключительно биологические способы, так и неисключительно биологические способы или процедуры. По сути, выражение «полученный не исключительно посредством по существу биологического процесса» относится к организму-хозяину, такому как растительная клетка, семя, растение или часть растения, геном или протеом которого был модифицирован способами, отличными от по существу биологических способов, таких как скрещивание, межпородное скрещивание, селективное разведение, интрогрессия, самоопыление или другие биологические процессы, не предполагающие технического этапа, модифицирующего геном или протеом. Примерами способов, отличных по существу от биологических процессов, для получения растения, в котором ген по изобретению инактивирован, являются, помимо прочего, соматическая гибридизация, мутагенез мутагенными агентами, такими как, но не ограничиваясь ими, ионизирующее излучение, такое как рентгеновские лучи, быстрые нейтроны, УФ-излучение и т. д. или химические агенты, такие как, помимо прочего, этилметансульфонат (EMS), диэтилсульфат (des),

этиленимин (ei), пропансульфон, N-метил-N-нитрозуретан (mnu), N-нитрозо-N-метилмочевина (NMU), N-этил-N-нитрозомочевина (enu), азид натрия и генная инженерия. Примерами последних способов являются, помимо прочего, вставка экзогенных нуклеиновых кислот в геном целевого растения с использованием микробных векторов, баллистическая трансфекция, электропорация, микроинъекция, транспозоны или трансформация эндогенных нуклеиновых кислот или способы редактирования генома, включая способы CRISPR/Cas или другие способы, такие как, помимо прочего, способы, основанные на использовании цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN), эффекторных нуклеаз, подобных активатору транскрипции (TALEN) и т. д.

Для целей настоящего изобретения выражение «полученный не исключительно посредством по существу биологического способа» относится к растениям, генетический материал которых был преднамеренно модифицирован с целью изменения гена, кодирующего белок, при этом указанный белок содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 60%, 62%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, или где указанная аминокислотная последовательность белка состоит из SEQ ID NO: 1. Предпочтительно указанный белок представляет собой гиперосмоляльный проницаемый для кальция канал 4.1 (OSCA4.1). В частности, растения по изобретению были модифицированы как по существу, так и не по существу биологическим способом для инактивации экспрессии гена по изобретению, описанного здесь, и/или для модификации продукта его экспрессии, чтобы указанный продукт имел сниженную функциональность или был не функционален.

Растение по изобретению, как и все другие растения, состоит из клеток, тканей и органов, подпадающих под объем изобретения. Таким образом, в другом предпочтительном варианте репродуктивный или размножающийся материал выбран из клетки, плода, семени, клубня или потомства. В еще одном предпочтительном варианте растения по изобретению часть растения выбрана из списка, состоящего из: листа, стебля, цветка, завязи или каллуса. Эти компоненты растения по настоящему изобретению, как материал для воспроизводства или размножения, так и часть растения по настоящему изобретению, также характеризуются тем, что они содержат ген, который кодирует белок, причем указанный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60 %, 62%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и указанный ген инактивирован.

Чтобы получить растение по настоящему изобретению, репродуктивный или размножающийся растительный материал по настоящему изобретению, растительную клетку по настоящему изобретению или любой из компонентов растения по настоящему изобретению, специалисту в данной области техники доступны несколько способов, эксперт будет знать наилучшую практику применения выбранного метода для получения растения с инактивированным геном по изобретению. Следовательно, другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения растения по изобретению, или репродуктивного или размножающегося растительного материала по изобретению, или растительной клетки по изобретению, или компонентов растения по изобретению, где указанное растение или его часть, репродуктивный или размножающийся растительный материал или растительная клетка проявляют устойчивость к инфекции ПерMV или улучшенный фенотип с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV, причем указанный способ (далее и далее способ по изобретению) включает:

a) подвергание растения или его части, репродуктивного или размножающегося растительного материала или растительной клетки случайному или направленному мутагенезу, и

b) обнаружение мутации в гене, который кодирует белок, при этом указанный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 62%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 в растении или его части, репродуктивном или размножающемся растительном материале или растительной клетке, и где указанная мутация приводит к инактивации гена.

В предпочтительном варианте осуществления способа по изобретению растение, или репродуктивный или размножающийся растительный материал по изобретению, или растительная клетка по изобретению, или компоненты растения по изобретению принадлежат к семейству *Solanaceae*. В еще одном предпочтительном варианте осуществления способа по изобретению растение, или репродуктивный или размножающийся растительный материал по изобретению, или растительная клетка по изобретению, или компоненты растения по изобретению принадлежат к роду *Solanum sp.*, *Capsicum sp.*, *Nicotiana sp.* или *Physalis sp* genera. В более предпочтительном варианте осуществления способа по изобретению растение, или репродуктивный или размножающийся материал по изобретению, или растительная клетка по изобретению, или компоненты растения по изобретению принадлежат к видам, выбранным из перечня, состоящего из: *Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum*, *S. pennellii*, *S. pimpinellifolium*, *S.*

peruvianum, *S. cheesmanii*, *S. galapagense*, *S. chilense*, *S. melongena*, *S. aethiopicum*, *S. quitoense*, *S. torvum*, *S. muricatum*, *S. betaceum*. *S. chmielewskii*, *S. arcanum*, *S. cornelliomulleri*, *S. habrochaiti*, *S. huaylasense*, *S. neorickii*, *S. dulcamara*. *S. Lycopersicoides*, *S. sitiens*, *S. juglandifolium*, *S. ochranthum*, и *S. cheesmaniae*. Следует понимать, что вид включает все входящие в него подвиды и варианты или сорта. Примеры вариантов/сортот для нескольких видов, без ограничения, перечислены ранее в описании, и такие варианты/сорта действительны для настоящего аспекта и его вариантов реализации.

Способы получения растений, материала для воспроизводства или размножения, растительных клеток, потомства или частей растений, в частности, в которых гены инактивированы, широко известны в данной области, и эксперт сможет определить лучший способ, который можно применить для получения желаемого растения. Такие способы включают стратегии как направленного, так и случайного мутагенеза. Стратегии случайного мутагенеза в основном основаны, помимо прочего, на способах, вызывающих мутации в ДНК клеток, таких как контакт с мутагенным агентом, таким как химическое вещество (например, этилметилсульфонат (EMS), этилнитрозомочевина (ENU), и т. д.) или ионизирующее излучение (нейтроны, например, при мутагенезе быстрых нейтронов и т. д.), альфа-лучи, гамма-лучи (например, испускаемые источником кобальта 60), рентгеновские лучи, УФ-излучение и т. д. или любой их комбинации. Стратегии направленного мутагенеза включают, помимо прочего, нацеливание на гомологичные рекомбинационно-зависимые гены, антисмысловую РНК, направленную вставку транспозонов, вирус-индуцированное подавление генов и методы редактирования генома, включая, помимо прочего, методы CRISPR/Cas.

По существу, в предпочтительном варианте осуществления способа по изобретению ген по изобретению инактивируют путем мутагенеза с мутагенными агентами, мутагенеза с химическими агентами, методов геной инженерии или редактирования генома, включая методы CRISPR/Cas.

Растение по изобретению находит применение в сельском хозяйстве. Среди указанных применений наиболее широкое применение представляет собой выращивание растения для получения или производства кормовых или потребляемых продуктов. По существу, другой аспект настоящего изобретения относится к использованию растения по изобретению, репродуктивного или размножающегося растительного материала по изобретению, растительной клетки по изобретению или компонентов растения по изобретению для производства сельскохозяйственной продукции, предпочтительно, где сельскохозяйственный продукт представляет собой продукт питания или корм.

Указанное использование тесно связано со способом производства указанного сельскохозяйственного продукта. Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к способу производства сельскохозяйственной продукции, предпочтительно, где сельскохозяйственный продукт представляет собой продукт питания или корм, включающий:

а) культивирование растения по изобретению или репродуктивного или размножающегося растительного материала по изобретению, растительной клетки по изобретению, или компонентов растения по изобретению,

б) сбор плодов, семян, клубней или съедобной части растения для производства сельскохозяйственного продукта, и

с) при необходимости подготовка сельскохозяйственного продукта к употреблению в свежем или измененном виде.

Изобретение, изложенное в настоящем описании и нижеуказанной формуле изобретения, относится к растениям, у которых инактивация гена по изобретению придает устойчивость к инфекции ПерMV или улучшает фенотип с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV. В настоящем описании также указано, что растения с устойчивостью к заражению ПерMV или с указанным улучшенным фенотипом могут быть идентифицированы путем скрининга изменений в нуклеотидной последовательности гена по изобретению, которые могут влиять на уровень экспрессии указанного гена, или скрининга изменений уровня экспрессии продуктов указанного гена. Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к использованию гена в качестве биомаркера, и в дальнейшем использованию биомаркера по настоящему изобретению для отбора растений с устойчивостью к заражению ПерMV или с улучшенным фенотипом с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV, где указанный ген кодирует белок, который содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 62%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. В другом предпочтительном варианте реализации биомаркера по изобретению ген содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 62%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Если обнаруживаемый ген изменен таким образом, что гарантирует его инактивацию, то растение проявляет устойчивость к инфекции ПерMV. Следовательно, в другом варианте применения биомаркера по изобретению биомаркер инактивирован. В другом предпочтительном варианте применения биомаркера по настоящему изобретению биомаркер инактивирован и кодирует белок, который содержит аминокислотную

последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. В еще одном предпочтительном варианте применения биомаркера по настоящему изобретению биомаркер является инактивированным и содержит нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. Применение биомаркера по настоящему изобретению в селекции с помощью программы производителя для выбранных инбредных линий, потомства и/или растений с признаком устойчивости к ПерMV также является частью настоящего описания.

Используемый здесь термин «биомаркер» включает любое измеримое вещество в растении, присутствие которого указывает на биологическое состояние или состояние, представляющее интерес. В настоящем изобретении биомаркер относится к нуклеотидной последовательности гена изобретения, продуктам экспрессии указанного гена или связанным с ним нуклеотидным последовательностям. Следовательно, в предпочтительном варианте применения биомаркера по изобретению выбор осуществляется путем определения нуклеотидной последовательности гена или фрагментов указанной нуклеотидной последовательности и выявления изменений в ней. В другом варианте осуществления выбор осуществляют путем обнаружения или количественного определения продукта экспрессии гена по изобретению, причем указанные продукты выбраны из списка, состоящего из: комплементарной ДНК или ее фрагмента, информационной РНК или ее фрагмента и белка или его фрагмента. В другом предпочтительном варианте осуществления биомаркера по изобретению выбор осуществляют путем дальнейшего определения локуса маркера, который ко-сегрегирует с SEQ ID NO: 4, предпочтительно, где указанный локус маркера локализован в диапазоне 100000 нуклеотидов выше или ниже биомаркера по изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к маркерному локусу для отбора растений с устойчивостью к заражению ПерMV или с улучшенным фенотипом с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV, где указанный маркерный локус ко-сегрегирует с SEQ ID NO: 4 и локализуется в диапазоне из 100000 нуклеотидов выше или ниже SEQ ID NO: 4.

Термин «маркерный локус», используемый в настоящем документе, относится к специфическому фиксированному положению на хромосоме, где расположен конкретный ген или генетический маркер, который разделяется совместно с SEQ ID NO: 4. Термин «ко-сегрегирует», используемый в настоящем документе, относится к двум или более генетическим маркерам в одной хромосоме, которые передаются вместе в результате нахождения в непосредственной физической близости друг к другу, т. е. сцеплены. Маркерный локус может содержать или состоять из любой генетической нуклеотидной

последовательности или общего признака, например, без ограничения, генов, интронов, экзонов, энхансеров, промоторов, однонуклеотидных полиморфизмов, мелкомасштабных вставок/делеций, мобильных элементов, микросателлитов или просто нуклеотидных фрагментов из 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более пар оснований нуклеотидной последовательности.

Термины «выше» и «ниже» в контексте настоящего документа относятся к положениям, которые находятся в 5'-направлении или 3'-направлении биомаркера по изобретению соответственно.

Способы обнаружения биомаркера широко известны специалистам. Например, без ограничения, идентификация изменений в нуклеотидной последовательности гена по изобретению или его фрагментов может быть осуществлена с помощью электрофореза или анализа секвенирования продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) всего гена или его фрагмента. Выражение «изменения в нуклеотидной последовательности», используемое в настоящем документе, относится к мутациям в нуклеотидной последовательности, будь то нуклеотидные замены, вставки или делеции, которые, будучи присутствующими в кодирующей белок области гена по изобретению, могут приводить к миссенс-мутациям, где аминокислота заменяется другой, или нонсенс-мутации, при которых образуется ранний стоп-кодон. Указанные типы изменений с большей вероятностью приведут к функционально сниженным или нефункциональным продуктам экспрессии гена по изобретению и, как таковой, к инактивации гена или более сильному подавлению активности гена по изобретению. Выражение «изменения в нуклеотидной последовательности», используемое в настоящем документе, также охватывает изменения, которые происходят в гене по изобретению за пределами области, кодирующей белок, такие как, помимо прочего, область промотора и/или энхансера, или в последовательностях, связанных с геном по изобретению, такие как, помимо прочего, энхансеры, которые могут влиять на уровень экспрессии продуктов гена изобретения.

Как известно специалисту в данной области, изменения в нуклеотидной последовательности биомаркера могут быть обнаружены в небольшом фрагменте или фрагментах всей последовательности, если указанный фрагмент может быть четко идентифицирован и картирован с нативной последовательностью или дикого типа, чтобы идентифицировать указанные изменения и иметь возможность определить их потенциал в инактивации биомаркера. Указанный фрагмент может иметь длину от 10 пар оснований до полной длины биомаркера. Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления биомаркер содержит фрагмент по меньшей мере из 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 пар оснований последовательности гена.

Обнаружение продуктов экспрессии гена по изобретению может быть осуществлено путем обнаружения или количественного определения уровня информационной РНК (мРНК), полученной в результате транскрипции гена или его фрагмента, при этом может быть выполнен анализ уровня мРНК, например, без ограничения, с помощью амплификации полимеразной цепной реакции (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), обратной транскрипции в сочетании с лигазной цепной реакцией (ОТ-ЛЦР) или любым другим методом амплификации нуклеиновой кислоты; ДНК-микрочипы, полученные с использованием олигонуклеотидов, депонированных любым механизмом; с помощью ДНК-микрочипов, изготовленных из олигонуклеотидов, синтезированных *in situ* фотолитографией или любым другим способом; гибридизацией *in situ* с использованием специфических зондов, меченных любым методом мечения; с помощью гелей для электрофореза; путем мембранного переноса и гибридизации со специфическим зондом; с помощью ядерного магнитного резонанса или любого другого метода визуализации с использованием парамагнитных наночастиц или любого другого типа обнаруживаемых наночастиц, функционализированных зондами ДНК/РНК, антителами или любыми другими способами.

Термин «фрагмент мРНК», используемый в настоящем документе, относится к нуклеотидной последовательности, полученной путем транскрипции гена по изобретению, где в указанной последовательности отсутствует один или более нуклеотидов из 5-го прайм-области и/или 3-й прайм-области или любой его области по сравнению с полной нуклеотидной последовательностью, полученной в результате транскрипции гена по изобретению.

Помимо обнаружения мРНК, обнаружение биомаркера по изобретению также можно осуществлять путем обнаружения и/или количественного определения белкового продукта биомаркера или его фрагмента по изобретению. Как и ранее, указанные способы хорошо известны в данной области техники и включают, помимо прочего, вестерн-блоттинг, белковую матрицу, ELISA, иммуногистохимию или иммунопреципитацию.

Термин «фрагмент белка», используемый в настоящем документе, относится к белку, в котором отсутствует одна или более аминокислот на N-конце и/или C-конце или любой части белка по сравнению с нормальным полноразмерным белком, где указанный фрагмент не сохраняет исходную функцию полноразмерного белка. В настоящем изобретении белок представляет собой белок OSCA4.1, полученный путем трансляции гена по изобретению.

Одним из наиболее распространенных способов обнаружения белков или фрагментов белков является использование антител и способов, в которых используются

указанные антитела. Термин «антитела», используемый в настоящем документе, относится к молекулам иммуноглобулина и иммуноактивным фрагментам молекул иммуноглобулина, т.е. молекулам, которые содержат сайт связывания антигена, который специфически связывается (иммунореагирует) с белком. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: иммуноглобулин М (IgM), иммуноглобулин D (IgD), иммуноглобулин G (IgG), иммуноглобулин A (IgA) и иммуноглобулин E (IgE).

Что касается описанного здесь применения, другой аспект настоящего изобретения относится к способу отбора растений с устойчивостью к заражению ПерMV или с улучшенным фенотипом с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV по сравнению с диким типом, начиная с настоящего момента к способу отбора по изобретению, включающему стадии:

а) Обнаружение гена, который кодирует белок, при этом указанный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 62%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91% , 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и

б) Определение того, инактивирован ли указанный ген стадии а), причем инактивированный ген указывает на устойчивость к заражению ПерMV или улучшенный фенотип с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV по сравнению с диким типом.

В предпочтительном варианте способа селекции по изобретению обнаружение на стадии (а) осуществляют путем определения нуклеотидной последовательности гена или его фрагмента. В другом предпочтительном варианте осуществления способа выбора по изобретению, обнаружение на стадии (а) осуществляют путем обнаружения или количественного определения продукта экспрессии гена по изобретению, причем указанные продукты выбраны из списка, состоящего из: комплементарной ДНК или ее фрагмента, информационной РНК или ее фрагмента и белка или его фрагмента.

Термины и выражения «растения», «устойчивость к заражению ПерMV», «ген», «белок», «аминокислотные последовательности», «идентичность», «инактивированный», «замалчиваемый», «фрагмент гена», «фрагмент белка», «информационная РНК», «фрагмент мРНК», «комплементарная ДНК», «фрагмент кДНК» были определены ранее в отношении предыдущих аспектов настоящего изобретения, и указанные определения в равной степени действительны для настоящего аспекта и его осуществления.

Способы обнаружения гена либо путем определения его нуклеотидной последовательности или ее фрагмента, либо продуктов его экспрессии, таких как мРНК; кДНК или белок или их фрагменты ранее были описаны в связи с применением биомаркера

по настоящему изобретению в отношении способов и методик обнаружения изменений в нуклеотидной последовательности биомаркера или обнаружения изменений в продуктах экспрессии биомаркера. Указанные способы и технологии в равной степени применимы для настоящего аспекта и его вариантов реализации.

Другие применения и способы получения растения по настоящему изобретению или его части, репродуктивного или размножающегося растительного материала по настоящему изобретению или растительной клетки по настоящему изобретению представляют собой способы, которые основаны на существенном вмешательстве человека в биологические процессы с использованием биомаркера растения по изобретению, позволяющие получить желаемый результат. Таким образом, другим аспектом настоящего описания является применение биомаркера по изобретению в программе вспомогательной селекции для отбора растений с устойчивостью к заражению ПерMV или с улучшенным фенотипом с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV по сравнению с диким типом. Еще один аспект настоящего изобретения относится к использованию биомаркера по изобретению для скрининга популяции растений на наличие инактивированного аллеля гена по изобретению, причем указанное присутствие указывает на повышенную устойчивость к инфекции, вызванной ПерMV или улучшенный фенотип с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV по сравнению с диким типом.

Термин «программа вспомогательной селекции», также известный как «селекция с помощью маркеров», используемый здесь, относится к процессу селекции, при котором интересующий признак выбирают на основе маркера, который связан с указанным признаком, а не на самом признаке. В настоящем изобретении маркером является биомаркер по изобретению, а признаком является устойчивость к инфекции ПерMV или улучшенный фенотип с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения гибрида растения по настоящему изобретению или его части, гибрида репродуктивного или размножающегося растительного материала по настоящему изобретению или гибрида растительной клетки по настоящему изобретению, где указанный гибридное растение или его часть, гибридный репродуктивный или размножающийся растительный материал или гибридная растительная клетка проявляют устойчивость к инфекции ПерMV или улучшенный фенотип с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV, начиная с настоящего момента гибридный способ по настоящему изобретению, включающий:

- а) Скрещивание растения по настоящему изобретению или его части, репродуктивного или размножающегося растительного материала по настоящему

изобретению, или растительной клетки по настоящему изобретению с вторым растением; и

b) Получение гибридного потомства от указанного скрещивания.

Используемые здесь термины «гибрид», «гибридное растение» или «гибридное потомство» относятся к индивидууму, полученному от генетически разных родителей (например, генетически гетерозиготному или преимущественно гетерозиготному индивидууму). В предпочтительном варианте осуществления гибридного способа изобретения второе растение на стадии а) принадлежит к видам *Solanum sp.* или *Capsicum sp.*, *Nicotiana sp.* или *Physalis sp.* В другом предпочтительном варианте второе растение выбрано из перечня, состоящего из: *Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum*, *S. pennellii*, *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *S. cheesmanii*, *S. galapagense*, *S. chilense*, *S. melongena*, *S. aethiopicum*, *S. quitoense*, *S. torvum*, *S. muricatum*, *S. betaceum*, *S. chmielewskii*, *S. arcanum*, *S. cornelliomulleri*, *S. habrochaiti*, *S. huaylasense*, *S. neorickii*, *S. dulcamara*, *S. Lycopersicoides*, *S. sitiens*, *S. juglandifolium*, *S. ochranthum*, и *S. cheesmania*.

В другом варианте гибридного способа по изобретению второе растение стадии а) представляет собой инбредную линию, а гибридное потомство стадии б) представляет собой гибрид F1 простого скрещивания. Термин «инбредная линия», используемый здесь, относится к генетически гомозиготной или почти гомозиготной популяции. Инбредная линия может быть получена, например, в результате нескольких циклов скрещивания братьев/сестер, самоопыления или дигаплоидного производства. В настоящем документе выражение «гибрид F1 простого скрещивания» относится к гибриду первого поколения (или «Филиалу 1»), полученному в результате скрещивания двух инбредных линий. В некоторых предпочтительных вариантах гибридного способа по изобретению инбредные линии размножаются по одному или более представляющим интерес фенотипическим признакам. В другом дополнительном предпочтительном варианте гибридного способа по изобретению инбредная линия представляет собой элитную линию. Используемый в настоящем документе термин «элитная линия» относится к линиям растений, которые обеспечивают продукт постоянного качества. Элитные линии являются результатом многих лет инбридинга и сочетают в себе множество превосходных характеристик, таких как высокая урожайность, качество плодов и устойчивость к вредителям, болезням или абиотическому стрессу. Средняя урожайность этих элитных линий, как правило, намного выше, чем у исходных диких (местных сортов) образцов. Элитные линии можно использовать непосредственно в качестве сельскохозяйственных культур или использовать для получения гибридов F1 одиночного скрещивания.

В более предпочтительном варианте гибридного способа по настоящему изобретению он дополнительно включает дополнительную стадию (с), на которой гибриды, собранные на стадии (b), демонстрирующие инактивацию гена, который кодирует белок, при этом указанный белок содержит аминокислотную последовательность с не менее 60%, 62%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, выбраны путем вмешательства человека.

Другой аспект настоящего изобретения относится к растению или его части, репродуктивному или размножающемуся растительному материалу или растительной клетке, полученной гибридным способом по настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения растения по настоящему изобретению или его части, репродуктивного или размножающегося растительного материала по настоящему изобретению или растительной клетки по настоящему изобретению, где указанное растение или его часть, указанное репродуктивное или размножающееся растение материал или указанная растительная клетка проявляют устойчивость к инфекции ПерMV или улучшенный фенотип с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV по сравнению с диким типом, с этого момента и далее к способу интрогрессии по настоящему изобретению, включающему:

а) скрещивание селекционного растения по настоящему изобретению или его части, селекционного репродуктивного или размножающегося растительного материала по настоящему изобретению или клетки селекционного растения по настоящему изобретению со вторым растением;

б) отбор потомства растения, полученного в результате скрещивания на стадии а) имеющего интрогрессию от селекционного растения по настоящему изобретению или его части, селекционного репродуктивного или размножающегося растительного материала по настоящему изобретению или клетки селекционного растения по настоящему изобретению, связанную с устойчивостью к ПерMV или улучшенным фенотипом с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV;

с) самоопыление и/или обратное скрещивание указанного потомственного растения, выбранного на стадии (b), с использованием указанного селекционного растения по настоящему изобретению или его части, селекционного репродуктивного или размножающегося растительного материала по настоящему изобретению, клетки селекционного растения линии по настоящему изобретению или второго растения как в (а) в качестве родителя;

d) отбор потомства растения, полученного в результате скрещивания на стадии c) имеющего интрогрессию от селекционного растения по настоящему изобретению или его части, селекционного репродуктивного или размножающегося растительного материала по настоящему изобретению или клетки селекционного растения по настоящему изобретению, связанную с устойчивостью к ПерMV или улучшенным фенотипом с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV; и

e) повторение указанных стадий самоопыления и/или обратного скрещивания и отбор стадий (c) и (d) для получения селекционной линии растений, по существу гомозиготной по указанной интрогрессии, при этом по меньшей мере один отбор, выполненный на стадиях (b) или (d) осуществляется путем отбора с помощью маркеров,

при этом интрогрессия включает мутацию в гене, который кодирует белок, при этом указанный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 62%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и где указанная мутация приводит к инактивации гена.

Используемый здесь термин «интрогрессия» предназначен для обозначения введения генетической детерминанты в растение, не несущее генетическую детерминанту, посредством скрещивания и отбора, начиная с первого поколения, в котором признак становится видимым или обнаруживаемым. Что касается доминантного признака, отбор может начаться, как только потомство F1 от скрещивания растения, проявляющего этот признак, и растения без этого признака начинает выделяться по указанному признаку (например, поколение F2 или первое обратное скрещивание [BC1]). Для рецессивного признака это возможно также начиная с F2. В качестве альтернативы, особенно для полигенного признака, селекцию можно осуществлять с использованием молекулярных маркеров, связанных с этим признаком. Селекцию с помощью маркера можно проводить в любом поколении или популяции, которая может включать растения, несущие маркер.

Термин «скрещивание», используемый здесь, относится к оплодотворению женских растений (или гамет) мужскими растениями (или гаметами). Термин «гамета» относится к гаплоидной репродуктивной клетке (яйцеклетке или сперматозоиду), образующейся у растений путем митоза гаметофита и участвующей в половом размножении, во время которого две гаметы противоположного пола сливаются, образуя диплоидную зиготу. Этот термин обычно включает в себя пыльцу (включая сперматозоид) и семяпочку (включая яйцеклетку). Таким образом, «скрещивание» обычно относится к оплодотворению семязачатков одной особи пыльцой другой особи, тогда как «самоопыление» относится к оплодотворению семяпочек особи пыльцой той же особи. Говоря о скрещивании в

контексте достижения интрогрессии геномной области или сегмента, специалисту в данной области техники будет понятно, что для того, чтобы добиться интрогрессии только части хромосомы одного растения в хромосому другого растения, необходимо, чтобы случайные части геномов обеих родительских линий были рекомбинированы во время скрещивания из-за возникновения событий кроссинговера при образовании гамет в родительских линиях. Следовательно, геномы обоих родителей должны быть объединены в одной клетке путем скрещивания, где после образования гамет из указанной клетки и их слияния при оплодотворении произойдет событие интрогрессии.

Термин «обратное скрещивание» относится к процессу, при котором растение, полученное в результате скрещивания двух родительских линий, скрещивают с одной из своих родительских линий, при этом родительская линия, используемая в обратном скрещивании, называется рекуррентным родителем. Повторное обратное скрещивание приводит к тому, что геном становится все более гомозиготным или инбредным.

Другой аспект настоящего изобретения относится к растению или его части, репродуктивному или размножающемуся растительному материалу или растительной клетке, полученной интрогрессионным способом по настоящему изобретению, характеризующемуся тем, что оно содержит ген, который кодирует белок, при этом указанный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 62%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и указанный ген инактивирован.

Все определения терминов, описанные ранее в отношении других аспектов настоящего изобретения, в равной степени действительны для всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1 – Симптомы, индуцированные PerMV-H30 в листьях дикого типа и мутантных растениях томата. Растения дикого типа (WT) и мутантные растения 2F531 сорта томата M82 были инокулированы (или не инокулированы (-) для здоровых контрольных растений) агрессивным изолятом PerMV-H30, который вызывает ярко-желтую мозаику в листках инфицированных растений. Фотография была сделана через 16 дней после инокуляции.

ФИГ. 2. – Устойчивость мутантных растений томата 2F531 к изолятам PerMV из разных штаммов. Вирусную нагрузку измеряли с помощью RT-qPCR с использованием специфических праймеров и сравнивали с калибровочной кривой для абсолютного

количественного определения РНК ПерMV. Резкое снижение накопления ПерMV наблюдалось для 2F531 по отношению к растениям дикого типа. Изоляты ПерMV представляют собой: ПерMV-Sp13, -H30 (штамм EU), -PS5 и -KLP2 (штамм CH2). Среднее значение и стандартное отклонение для 4 повторов по 3 растения в каждом. Тотальную РНК экстрагировали через 16 дней после инокуляции. * указывает на достоверные различия ($p < 0,05$, критерий Т-Стьюдента).

ФИГ. 3 – Продолжительность устойчивости мутанта 2F531. Для оценки вероятности нарушения устойчивости было проведено до пяти пассажей двух изолятов ПерMV на растениях дикого типа и мутантных растениях: (A) Схема установки для установления 6 линий ПерMV-Sp13 и 6 линий ПерMV-PS5 у WT и 2F531 растения. (B) Изменение вирусной нагрузки в ходе эксперимента (\log_{10} нг вирусной РНК/100 нг общей РНК, через 16 дней после инокуляции (dpi)), для изолятов ПерMV-Sp13 (вверху) и ПерMV-PS5 (внизу).

ФИГ. 4 – Картирование мутации, придающей устойчивость к ПерMV, в 2F531. (A) Восприимчивость BC_1F_1 к ПерMV-H30 по сравнению с диким типом и 2F531: накопление вирусной нагрузки (нг вирусной РНК/100 нг общей РНК) через 16 дней после инокуляции (dpi); средние значения и стандартное отклонение для 8 повторов по 3 растения в каждом. a и b указывают на достоверно различающиеся уровни накопления ПерMV ($p < 0,05$, LSD-тест). (B) Фенотипирование BC_1F_3 : гистограмма семейств BC_1F_3 относительно процента восприимчивых индивидуумов. (C) Манхэттенский график, представляющий разницу в частотах аллелей между пулами дикого типа и R (ось y) во всех обнаруженных вариантах вдоль хромосомы томата в соответствии с эталонным геномом (Heinz 1706, SL2.50). Пунктирная линия показывает порог различия частот аллелей выше 0,7, что указывает на связь с устойчивостью. (D) Генетическая карта и анализ ассоциаций SNP в регионе-кандидате хромосомы 2: Карта сцепления 12 маркеров в регионе-кандидате после сегрегационного анализа 200 индивидуумов BC_1F_2 , генетические расстояния в см (в центре); и вероятностный график потери чувствительности, связанный с маркерами, представленный как показатель LOD (шкала в верхней части графика, справа).

ФИГ. 5 - Количество парных считываний, сопоставленных с генами-кандидатами. Количество нормализованных парных считываний после секвенирования РНК (ось Y), которые сопоставлены с каждым геном-кандидатом, в 3 пулах по шесть растений F_2 в каждом, потомство которых демонстрирует либо устойчивый (R), либо восприимчивый (WT) фенотип.

ФИГ. 6. Редактирование гена SIOSCA4.1 с использованием CRISPR/Cas9. (A) Схематическое изображение кодирующей последовательности гена SIOSCA4.1 дикого

типа (WT) с указанием положений сконструированных гРНК, используемых для редактирования гена с помощью CRISPR/Cas9, и отредактированного гена *slosca4.1_2*, секвенированного из отредактированных растений, с 1192 делеций п.о. по отношению к гену дикого типа. **(В)** Экспрессия симптомов ПерМV в растениях томата дикого типа и томата с нокаутом *slosca4.1_2*, инфицированных (или не для здорового контроля) ПерМV-Н30. **(С)** Накопление ПерМV-Sp13 в растениях томата дикого типа и мутантах с нокаутом *slosca4.1_2* через 16 дней после инокуляции. Данные представляют собой средние значения и стандартное отклонение для 6 зараженных растений. Звездочки указывают на значительные различия с использованием статистического теста однофакторного дисперсионного анализа (***) $p < 0,001$.

ФИГ. 7. - Относительная экспрессия ПерМV в листьях протопластов дикого типа и мутантов 2F531. Протопласты листьев мутантов дикого типа и 2F531 инфицировали очищенным вирионом ПерМV-SP13. Относительную экспрессию ПерМV через 0, 17 и 24 часа после заражения анализировали с помощью RT-qPCR. Экспрессия в моменты времени 17 и 24 часа были привязаны к времени 0 часов. Данные представляют собой средние значения и стандартное отклонение 8 экспериментальных повторений для дикого типа и 7 для мутанта. Звездочки указывают на существенные различия с использованием статистического критерия t ($p < 0,05$).

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

Пример 1.1.: Способы

Скрининг мутантов томатов

Мутантная популяция состояла из 1000 семейств M_2 , полученных после обработки семян томата сорта М82 с этилметансульфонатом (EMS). Двадцать пять растений на семейство высевали в питомнике (Мурсия, Испания) и через 33 дня после посева пересаживали в теплицы (Мурсия, Испания) с окнами и входами, защищенными сеткой против трипса. Растения сорта томата М82 дикого типа были включены в качестве восприимчивых контрольных растений и для пограничных линий. Плотность растений составляла 4 растения на квадратный метр. Растения инокулировали агрессивным изолятом ПерМV-KLP2 (Agüero et al., 2018, Front Plant Sci 9, 1-12.) в тот же день после трансплантации. Растения *Nicotina benthamiana* использовали для размножения инокулята: через 14 дней после инокуляции (dpi) собирали симптоматические листья над инокулированными, смешивали с 30 мМ фосфатным буфером, pH 8, до концентрации 100

г/л и хранили при -80°C ; для прививок этот исходный раствор разводили в 5 раз. Растения томата опрыскивали под высоким давлением суспензией порошка карборунда (размер частиц 0,037 мм; 10 г/л) в растворе инокулята. Авторы настоящего изобретения использовали в общей сложности 28 л разбавленного раствора инокулята для всей популяции мутантов томата. Второй этап инокуляции был проведен 28 дней спустя, чтобы гарантировать инфекцию. У каждого растения M_2 оценивали симптомы через 42 дня после первоначальной инокуляции. Шкалу тяжести симптомов от 0 до 2 определяли следующим образом: 0 — отсутствие симптомов; 1 — спорадические ярко-желтые пятна на только что появившихся листьях; 2 — ярко-желтая мозаика, поражающая все вновь появившиеся листья. Были выбраны растения с баллами 0 и 1. Чтобы проверить связь симптомов с фактической инфекцией, выявление ПерMV проводили на 10 растениях на семейство; авторы настоящего изобретения применяли молекулярную гибридизацию в тканевых отпечатках поперечных срезов черешков, как в Marco et al. (2003, *Phytopathology* 93, 844–852). Уход за посевами осуществляли в соответствии с традиционными способами, за исключением того, что для персонала, работающего в теплицах, были приняты строгие меры гигиены. После оценки были собраны плоды растений с легкими симптомами или без них и извлечены семена, таким образом сохранили более 600 семейств M_3 .

На втором этапе отбора оценивали 10-12 растений из семейства M_3 ; семена дезинфицировали 4% H_2O_2 в течение 30 минут для устранения загрязнения ПерMV, затем высевали в 40 лотков для рассады, инокулировали и выращивали в экспериментальной теплице (CEBAS-CSIC, Murcia, Spain). Вирусный изолят, используемый для прививок, представлял собой ПерMV-H30, который, как и ПерMV-KLP2, индуцирует ярко-желтую мозаику, но имеет более стабильный инфекционный фенотип (Agüero et al., 2018, *Front Plant Sci* 9, 1-12). В этом случае инокулят производили на растениях томата (сорт Moneymaker), а механические инокуляции проводили вручную, как в Agüero et al. (2018, *Front Plant Sci* 9, 1-12) через 21 день после посева. Растения повторно инокулировали через 14 дней после первой инокуляции. Отображение симптомов было аннотировано с разрешением 25 dpi, фиксируя процент растений с симптомами на семейство. После оценки 3-6 растений выбранных семейств пересаживали в мешочки из кокосового волокна и выращивали в теплицах (Finca “La Matanza”, CEBAS-CSIC, Murcia, Spain) в стандартных условиях выращивания до созревания плодов. Для отобранных растений было проведено контролируемое опыление для получения двух раундов самоопыления (семена M_4 и M_5).

Измерение вирусной нагрузки у растений 2F531

Четыре изолята ПерMV были проанализированы на растениях дикого типа и 2F531 (семена M₅): ПерMV-Sp13 и ПерMV-H30, принадлежащие штамму EU, а также ПерMV-PS5 и ПерMV-KLP2 штамму CH2. ПерMV-Sp13 и -PS5 представляют собой ослабленные изоляты, вызывающие легкие симптомы, тогда как ПерMV-H30 и -KLP2 являются агрессивными изолятами (Agüero et al., 2018, Front Plant Sci 9, 1-12). Инокуляты были восстановлены на растениях *N. benthamiana* согласно стандартной методике. Каждым вирусом или вирусным изолятом инокулировали три-четыре повторности по 3 растения томата на каждый генотип. Во всех случаях растения с двумя настоящими листьями инокулировали механически, как описано ранее (Gómez et al., 2009a, J Virol 83, 12378-12387), и отбор проб проводили через 16 dpi. Растения выращивали в горшках объемом 1,1 л, наполненных смесью торфа и кокосового волокна (2:1) в кристаллической теплице (CEBAS-CSIC) с климат-контролем (дневная температура 24-25°C, ночная 16-16°C). 18 °C, 16 ч света). Количественное определение вирусной РНК проводили после выделения общей РНК. Все листья растений из каждой повторности собирали и гомогенизировали в блендере с 4 мл буфера TNA на грамм растительной ткани (TNA: 2% SDS, 100 мМ Tris HCl, pH 8, 10 мМ EDTA, pH 8); отбирали 500 мкл гомогенатов и смешивали с таким же количеством TRI-Reagent® (реагент для выделения РНК, Sigma Chemical Co, США); экстракцию РНК проводили согласно инструкциям производителя. Конечный осадок растворяли в 50 мкл стерильной воды, не содержащей РНКазы, и остатки ДНК удаляли обработкой набором TURBO DNA-free TM (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. Количество РНК оценивали в приборе Nano-Drop® One (Thermo Scientific, США). RT-qPCR использовали для количественного определения вирусной РНК. Стандартные кривые были построены для каждого из различных анализируемых вирусов с помощью серийных разведений 1:10 вирусной РНК известной концентрации. Использовали набор КАРА SYBR® FAST Universal One-Step RT-qPCR Kit (КАРА Biosystems, США) с 2 мкл разведения очищенной вирусной РНК или экстрагированной растительной РНК в реакционном объеме 20 мкл и со специфическими праймерами (Gómez et al., 2009a, J Virol 83, 12378-12387). По три технических повторности на биологический повтор анализировали с помощью термоциклера StepOnePlus («Applied Biosystems», США).

Эксперимент по серийному пассажу

Стабильность устойчивости к ПерMV у растений 2F531 охарактеризовали в эксперименте серийного пассажа. В этот эксперимент были включены два генотипа растений (2F531 и дикого типа) и два вируса (ПерMV-Sp13 и ПерMV-PS5). Для 2F531 использовали семена M₅. По три растения на генотип и на изолят ПерMV использовали для

установления 12 линий (Фигура 3А). Исходный инокулят для обоих изолятов сначала обновляли в растениях дикого типа, определяли количественно, как описано выше, и готовили для пассажа 0 до концентрации примерно 10^7 копий вируса/нг общей РНК. Пятьдесят мкл инокулята использовали для механической инокуляции каждого из растений-основателей каждой линии на стадии 2 настоящих листьев, а затем проводили 5 последовательных пассажей; для этого 4 диска диаметром 10,7 мм брали со второго листа над инокулированным листом при 16 dpi и использовали в качестве нового источника инокулята для следующего пассажа этой линии (Фигура 3А). Еще 4 диска из того же листа хранили замороженными при -80°C для количественного определения вирусной нагрузки, как описано выше. Все растения выращивали в горшках объемом 1,1 л, наполненных смесью торфа и кокосового волокна (2:1) в кристаллической теплице (SEBAS-CSIC) с климат-контролем (дневная температура $24-25^{\circ}\text{C}$, ночная $16-16^{\circ}\text{C}$). 18°C , 16 ч света).

Картирование популяций и фенотипирование

Контролируемые опыления проводили для получения обратного скрещивания с M82 (BC_1F_1). BC_1F_2 был получен путем контролируемого самоопыления BC_1F_1 . Двести четыре особи BC_1F_2 были выращены и использованы в качестве картируемой популяции, а затем самоопылены для получения 204 потомков BC_1F_3 . Во всех случаях растения выращивали в мешках из кокосового волокна в теплице из ПВХ (Finca «La Matanza», SEBAS-CSIC). Ценность фенотипирования любого данного BC_1F_2 определяли путем анализа восприимчивости к PepMV-H30 10-12 его потомков BC_1F_3 . Методика этого теста потомства была аналогична описанной ранее для второго этапа отбора при массовом скрининге, за исключением повторной инокуляции, которая проводилась при 7 dpi, и окончательной оценки при 14 dpi.

Массовый сегрегантный анализ и высокопроизводительное генотипирование

Были созданы две группы: группа дикого типа с 18 индивидуумами BC_1F_2 , у которых BC_1F_3 демонстрировала 100% потомков с симптомами, и группа R с 18 индивидуумами с 0% потомков с симптомами. Ткани листьев каждой особи BC_1F_2 использовали для экстракции нуклеиновых кислот. Автоматизированную экстракцию ДНК проводили в соответствии с протоколом Maxwell® CSC (Promega Corp., США) для набора «PureFood GMO and Authentication Kit for Food, Feed and Seed samples». Незначительные модификации были использованы для повышения урожайности; а именно, 60 мг измельченной ткани в качестве исходного материала, 600 мкл СТАВ, 30 мкл протеиназы К, 2-часовая инкубация при 65°C и конечный объем 80 мкл. Количественный анализ ДНК

проводили с помощью Qubit™ dsDNA BR Assay Kit во флуориметре Qubit® 2.0 (Life Technologies, США), а ее качество проверяли электрофорезом в 1%-ной агарозе и в Nano-Drop® One. ДНК выбранных индивидуумов была объединена так, чтобы каждый из них был представлен в равной степени, и оба пула были глубоко секвенированы компанией Macrogen Inc. (Южная Корея). Были созданы библиотеки TruSeq DNA PCR-Free с размером фрагмента 350 п.н. и пропущены в HiSeq®2500-High Throughput NORM (Illumina Inc., США) с парным считыванием для достижения глубины покрытия около 50X. Необработанные данные анализировали следующим образом: Качество считывания проверяли с помощью FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>); картирование считываний эталонного генома томата (сорт Heinz 1706, версия SL2.50; http://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome; Tomato Genome Consortium, 2012) было выполнено с помощью инструмента для выравнивания BWA Li and Durbin, 2009, *Bioinformatics* 25, 1754-1760); последовательность M82 была получена из общедоступных баз данных (Bolger et al., 2014a, *Nat Genet* 46, 1034-1038). Программу FreeBayes (Garrison and Marth, 2012, ArXiv:1207.3907 [q-bio.GN]) использовали для вариантного вызова обоих пулов и M82; частоты аллелей рассчитывали в пулах и M82 после фильтрации (критерии: доступные данные в обоих пулах, охват, равный или превышающий 20 на образец, качество варианта не менее 25 и общая частота аллеля ниже 0,9). Наконец, была рассчитана разница частот аллелей между пулами и представлена в виде манхэттенского графика с использованием программного обеспечения R. Было подсчитано, что для менделевской рецессивной мутации, связанной с наблюдаемой потерей функции, такая разница будет не менее 0,7.

РНК-Seq

Те же 18 особей BC₁F₂ в массе были далее разделены на 3 повтора по 6 растений. Эквивалентные количества ткани листьев каждого из 6 растений на пул использовали для экстракции РНК, как описано выше, за исключением того, что конечные препараты РНК получали с использованием набора Nucleo-Spin® RNA plant (Macherey-Nagel GmbH, Германия). Полученные препараты РНК оценивали с помощью Nano-Drop® One и биоанализатора Agilent 2100 (Agilent Technologies, США). Все образцы показали показатели целостности РНК выше 7,4. Шесть пулов были секвенированы (Macrogen Inc.) после создания библиотеки с использованием набора TruSeq Stranded mRNA LT (Illumina Inc.) на платформе NovaSeq™ 6000 (Illumina Inc.) с парными считываниями длиной 151 п.н. Необработанные данные были обрезаны (адаптеры и 10 нуклеотидов 5'-конца) с помощью программы Trimmomatic (Bolger et al., 2014b) и отфильтрованы по качеству

(минимальный КК 30 и длина не менее 70 п.н.) с помощью FastQC. Считывания были сопоставлены с BBMap (www.sourceforge.net/projects/bbmap), а затем сопоставлены с эталонным геномом с использованием алгоритма MEM BWA (Li and Durbin, 2009, *Bioinformatics* 25, 1754-1760), проверяя качество картографирования с помощью Qualimap (bamqc). Вызов вариантов и расчет частот аллелей проводили, как описано для повторного секвенирования ДНК. Количество считываний, сопоставленных с аннотированными генами, рассчитывали с помощью функции FeatureCounts SubRead, его качество с помощью DESeq2, и их нормализация с помощью rlog. DESeq2 позволил также изучить дифференциальную экспрессию между образцами R и дикого типа с учетом двух факторов: генотипа и репликации. Goseq использовался для анализа обогащения GO. Наконец, биологическое воздействие вариантов было предсказано с помощью SnpEff (Cingolani et al., 2012, *SnpEff. Fly* 5, 29-30).

Редактирование CRISPR/Cas9

Три гРНК, комплементарные кодирующей последовательности SIOSCA4.1, были созданы с использованием биоинформатического инструмента BreakingCas (Oliveros et al., 2016). Целевыми последовательностями в SIOSCA4.1 были 5'-ACTTCAATTACGACGTCGCT-3' (SEQ ID NO: 7), 5'-CAGAGCTGCCGCCCTCAATA-3' (SEQ ID NO: 8) и 5'-ATAAGGCTGTCCAGGACCTC-3' (SEQ ID NO: 9). Смысловые и антисмысловые олигонуклеотиды (Integrated DNA Technologies, Inc.) отжигали и клонировали в бинарную плазмиду pDIRECT_22C (Addgene ref. #91135) в соответствии с протоколом, описанным Čermák et al. (*The Plant cell*, 2017 29(6), 1196–1217). Полученной плазмидой трансформировали штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, который, в свою очередь, использовали для трансформации эксплантов томата сорта Micro-Tom, следуя протоколу, описанному Van Eck et al. (*Methods in molecular biology*, 2006, 343, 459–473). Растения, укорененные в селективной среде, переносили на субстрат и акклиматизировали в ростовых камерах. Чтобы проверить, имеет ли место редактирование SIOSCA4.1 в растениях T0, целевой участок внутри гена амплифицировали с помощью ПЦР с помощью прямой тканевой ПЦР с использованием набора Phire Tissue direct PCR (Thermo Scientific) в соответствии со спецификациями производителя, и секвенировали по Сэнгеру. Отредактированные растения подвергали самоопылению для получения семян T1. Растения T1, выращенные в субстрате, генотипировали, отбирая те, которые имели гомозиготную мутацию.

Пример 1.2.: Утрата восприимчивости к PepMV в коллекции мутантов томата

Скрининг проводили на популяции из 25 000 мутантов томата из 1 000 семейств M2. Мутантные растения инокулировали агрессивным изолятом ПерMV, который вызывал очевидную ярко-желтую мозаику. Тяжесть симптомов оценивали для каждого растения по шкале от 0 до 2, где 0 — отсутствие симптомов, 1 — спорадические ярко-желтые пятна на вновь появляющихся листьях, 2 — ярко-желтая мозаика, поражающая все вновь появляющиеся листья (Фигура 1). Агрессивные симптомы (2 балла) проявились у 97,5 % растений, которые были отнесены к восприимчивым. Присутствовали растения, получившие оценку 0 или 1 из 379 семейств. Субпопуляция симптоматических и бессимптомных растений была протестирована на инфекцию ПерMV, что выявило идеальную корреляцию между инфекцией и проявлением симптомов. От одного до 4 растений на семейство с оценкой 0 или 1 были отобраны и самоопылены, что дало начало более чем 600 семействам M3. Из них от 10 до 12 человек из каждой из 453 семей M3 были привиты ПерMV, и снова провели оценку симптомов. Семейство 2F531 показало 100% бессимптомных растений, что указывает на гомозиготную мутацию, вызывающую потерю восприимчивости к ПерMV; растения этого семейства были самоопылены для получения семян M4 и обратно скрещены с образцом дикого типа M82 для получения BC₁F₁. В дальнейшем авторы будут называть фенотип потери восприимчивости этих растений устойчивостью.

Растения томата, несущие инактивированный ген по изобретению, не проявляют фенотипических различий по сравнению с диким типом, за исключением устойчивости к инфекции ПерMV или улучшенного фенотипа с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV. Ни проростки (Фигура 6B), ни полностью выросшие растения мутантов 2F531 или нокаут *slosca4.1_2* нельзя отличить от растений дикого типа в отсутствие заражения ПерMV: они имеют сходный детерминированный характер роста, размер, цвет и форму листьев, как и а также внешний вид, количество или завязь плодов, а также продуктивность семян (урожайность и всхожесть), указывающие на то, что мутация не изменяет приспособленность растений томата.

Широта и длительность устойчивости у мутанта 2F531

Накопление ПерMV в растениях дикого типа (WT) и 2F531 сравнивали после инокуляции ПерMV-Sp13, ПерMV-H30 (оба принадлежат штамму EU), ПерMV-PS5 или ПерMV-KLP2 (принадлежащим штамму CH2). Наблюдалось резкое и значимое снижение вирусной нагрузки у мутанта по отношению к растениям дикого типа для всех четырех изолятов (Фигура 2), которое было более выраженным для EU (в 9–10 раз), чем для изолятов

CH2 (от 3 до 10 раз, а также резче для агрессивных (PerMV-H30 и -KLP2), чем для легких (PerMV-Sp13 и – PS5) изолятов.

Продолжительная устойчивость является ключом к развертыванию устойчивых стратегий борьбы с патогенами на полях. Чтобы проверить, сможет ли PerMV легко преодолеть устойчивость 2F531, был проведен эксперимент по пассажу. После первоначальной инокуляции PerMV-Sp13 или PerMV-PS5 на растениях каждого генотипа M82 или 2F531 создавали три вирусные линии и проводили 5 последовательных пассажей (Фигура 3А). Вирусную нагрузку измеряли для каждого пассажа. Для пассажей PerMV-PS5 вирусная нагрузка колебалась, но она всегда была меньше (в большинстве случаев почти на порядок) у 2F531, чем у растений дикого типа (Фигура 3В). Для PerMV-Sp13 колебания вирусной нагрузки при пассаже были более выраженными и, действительно, к 3-му, 4-му и 5-му пассажам вирусные популяции в каждой из линий 2F531 соответственно практически вымерли (Фигура 3Б).

Картирование путем секвенирования мутации, связанной с потерей восприимчивости к PerMV

Растения BC₁F₁ демонстрировали такое же накопление и симптомы PerMV, как и растения дикого типа (Фигура 4А), что указывает на то, что устойчивость к 2F531 имеет рецессивный характер. Растения BC₁F₁ были подвергнуты самоопылению для получения более 200 растений BC₁F₂, которые были выращены, самоопылены для получения потомства BC₁F₃, и индивидуально отобраны образцы для экстракции ДНК и РНК. Двадцать четыре семейства BC₁F₃ были фенотипированы путем инокуляции 12 растений на семейство PerMV. В 50 и 54 семьях BC₁F₃ соответственно все особи были либо резистентны, либо восприимчивы, тогда как внутрисемейная сегрегация наблюдалась в 100 случаях (Фигура 4В). Эти частоты почти идеально соответствуют ожидаемой сегрегации генов в модели, в которой устойчивость является моногенной и рецессивной (χ^2 статистика, 2 df = 0,23; $\alpha > 0,001$).

Массовый сегрегационный анализ (BSA) в сочетании с высокопроизводительным секвенированием (HTS) был принят для картирования мутации, связанной с устойчивостью PerMV. Были сформированы две партии: 18 особей BC₁F₂ в пуле R (т.е. 0% восприимчивых растений в BC₁F₃) и еще 18 особей BC₁F₂ в пуле дикого типа (т.е. 100% восприимчивых растений в BC₁F₃). Объединенные ДНК секвенировали для каждой партии на глубину 50X. После качественной фильтрации и выравнивания по эталонному геному (Heinz 1706, SL2.50) 99% считываний удалось сопоставить, причем 78% из них имели показатель качества MAPQ>57. При вызове вариантов по эталонному геному после фильтрации по

низкому охвату было обнаружено 1 285 278 вариантов. Большинство вариантов можно отнести к природным полиморфизмам между M82 и Heinz 1706 и только 6302 (0,49 %) — к EMS-индуцированному мутагенезу; это указывает на приблизительную частоту возникновения 1 мутации на каждые 150 т.п.н. в мутанте 2F531. Для всех вариантов были рассчитаны аллельные частоты в каждом пуле. Разница в частотах аллелей превышала 0,7 для 10 SNP и 1 вставки/делеции, расположенной на дистальном конце хромосомы 2, что указывает на связь между вариантными аллелями и типом пула (Фигура 4C). Эти 11 вариантов занимают область размером 2,02 МБ, с позиции 45 135 056 до 47 155 034; пять мутаций расположены в аннотированных генах. Этот регион включает 448 других вариантов с низким покрытием и включает 145 аннотированных генов.

Для уточнения картирования генов был проведен анализ рекомбинации. Двадцать четыре SNP, идентифицированные внутри интересующей области генома или рядом с ней, были выбраны и проанализированы у 200 индивидуумов BC₁F₂; только 12 маркеров были выделены в популяции. Для этих маркеров была построена карта сцепления и проведен ассоциативный анализ для корреляции генотипов маркеров и восприимчивости. На Фигуре 4D представлена генетическая карта и плотность вероятности вдоль нее, а также иллюстрируется сильная связь устойчивости с маркерами C18 и C19. Анализ рекомбинантов далее показывает, что потеря восприимчивости к PepMV проявляется только у людей с альтернативными аллелями в гомозиготе в области, обрамленной C16 и C20, охватывающей 734 632 п.н. В этом регионе анализ BSA-HTS выявил 4 варианта; предсказанный функциональный эффект этих вариаций был от низкого до умеренного, за исключением мутации от А до Т в положении нуклеотида 1803 в единственном экзоне Solyc02g083430, что соответствует положению 1660 в основной открытой рамке считывания Solyc02g083430. Белок, кодируемый Solyc02g083430, содержит 831 аминокислоту, а мутация затрагивает лизин в положении 554, вводя вместо него преждевременный стоп-кодон.

Чтобы подтвердить и дополнить приведенные выше данные, был проведен анализ RNA-Seq с использованием объединенных РНК из объемов R и дикого типа. Транскрипты секвенировали, сопоставляли с эталонным геномом и фильтровали, варианты идентифицировали, и сравнивали частоты аллелей между пулами. Опять же, единственные локусы, в которых частоты аллелей различались более чем на 0,7, были расположены в той же геномной области, что и ранее обнаруженная, а варианты были специфически обнаружены в трех локусах: Solyc02g081200, Solyc02g082660 и Solyc02g083430. В этом районе можно обнаружить некоторые новые SNP, но с низким охватом. При сравнении количества считываний, картированных для каждого из трех кандидатов RNA-Seq для пула

R и пула WT (Фигура 5), различия наблюдались для Solyc02g083430; хотя они и не были статистически значимыми, показания Solyc02g083430, по-видимому, были меньше для устойчивой массы, чем для восприимчивой, что согласуется с природой мутации, наблюдаемой для этого гена. С другой стороны, анализ обогащения генной онтологии (GO) выявил 27 чрезмерно представленных терминов GO. Почти 9% дерегулированных генов относятся к комплексам АТФазы в категории клеточного компонента. В категории молекулярных функций наиболее обогащенными были связывание АТФ (GO: 0005524), активность эндопептидазы аспарагинового типа (GO: 0004190) и оксидоредуктазная активность (GO: 0016491). Наконец, в категории биологических функций были идентифицированы только два расширенных биологических процесса: реакция на повреждение (GO: 0009611) и метаболический процесс спирта (GO: 0006066).

Solyc02g083430 кодирует SIOSCA4.1, белок, участвующий в вакуолярном транспорте, и член семейства гиперосмоляльно-управляемых кальций-проницаемых каналов 1 (OSCA)

Белок, кодируемый Solyc02g083430 (геномная последовательность SEQ ID NO: 4), SEQ ID NO: 1, имеет 3 консервативных домена: трансмембранный домен, который является частью проницаемого для кальция катионообменного канала 1 (Csc1_N), активируемого физическими сигналами, такими как осмотические стресс; домен переносчика фосфата, предсказанный как цитозольный (PHM7_cyt); и область из 7 трансмембранных доменов, которые являются частью предполагаемого переносчика фосфата (RSN1_7TM) (Zhu et al., 2008, Nat Genet 40, 854-861). Преждевременное введение стоп-кодона в аминокислоту 554 приводит к потере большей части трансмембранного домена RSN1_7TM, что может вызвать полную или частичную потерю функции белка, что приводит к мутантному фенотипу. Его ближайший ортолог *Arabidopsis* кодирует AtOSCA4.1, который принадлежит к семейству гиперосмоляльно-зависимых/механически активированных кальций-проницаемых каналов (OSCA) (Yuan et al., 2014, Nature 514, 367-371) и с которым он имеет 69% идентичности аминокислот. Как и *Arabidopsis*, томат OSCA4.1 (SIOSCA4.1) принадлежит к небольшому семейству, состоящему из 12 членов, филогенетически организованных в те же четыре клады, что и *Arabidopsis*. AtOSCA4.1 был четко идентифицирован как фактор сортировки вакуолей в двух независимых отчетах (Fuji et al., 2007, Plant Cell 19, 597-609; Delgadillo et al., 2020, PNAS 117, 9884-9895). Дальнейший поиск ортологов белка, кодируемого геном Solyc02g083430, у сельскохозяйственно важных видов со сходной структурной организацией привел к появлению двух наборов белков: один чрезвычайно консервативен внутри пасленовых с минимальной идентичностью 91,29% по

всему белку (Таблица 1); и второй высококонсервативен за пределами пасленовых (Таблица 2) с минимальной идентичностью 62,77% по всему белку. Структурное сходство и распределение доменов обоих наборов белков указывают на то, что белки должны иметь консервативную функцию по сравнению с белком, кодируемым Solyc02g083430.

Редактирование SIOSCA4.1 в сорте томатов Micro-Tom подтверждает его провирусную функцию в отношении ПерMV

Чтобы подтвердить участие SIOSCA4.1 в восприимчивости ПерMV, авторы использовали технологию редактирования генома CRISPR/Cas9 для получения мутантов сорта томатов Micro-Tom по локусу Solyc02g083430. Были разработаны направляющие РНК, нацеленные на последовательности в начале единственного экзона Solyc02g083430. Гомозиготные мутации наблюдались у отдельных растений поколения T1 (Фигура 6А), которые были инокулированы ПерMV. Наблюдался фенотип инфекции, аналогичный фенотипу мутантных растений 2F531: у отредактированных растений не наблюдалось симптомов заболевания (Фигура 6В), а накопление ПерMV было значительно снижено у мутанта по сравнению с растениями дикого типа (Фигура 6С), что подтверждает исходную гипотезу.

Таблица 1: Ортологи SEQ ID NO:1 в видах Solanaceae

Виды (<i>Solanaceae</i>)	% id
<i>Nicotiana_benthamiana_1</i>	91.29
<i>Nicotiana_benthamiana_2</i>	92.27
<i>Capsicum_annuum_cv</i>	93.98
<i>Capsicum_annuum_glabriusculum</i>	94.26
<i>Capsicum_annuum_zunla</i>	94.38
<i>Solanum_melongena</i>	93.98
<i>Solanum_lycopersicum</i>	100.00
<i>Solanum_pimpinellifolium</i>	100.00
<i>Solanum_pennellii</i>	98.32
<i>Solanum_tuberosum</i>	97.56

Table 2: Ортологи SEQ ID NO:1 в видах, не относящихся к Solanaceae

Виды (Не относящиеся к <i>Solanaceae</i>)	%id
<i>Musa_acuminata</i>	65.04
<i>Zea_mays</i>	62.96
<i>Oryza_sativa_Indica</i>	62.77

Виды (Не относящиеся к <i>Solanaceae</i>)	%id
<i>Triticum_aestivum</i>	63.12
<i>Brassica_rapa</i>	69.33
<i>Brassica_rapa_2</i>	62.90
<i>Daucus_carota</i>	75.55
<i>Actinida_chinensis</i>	76.78
<i>Sesamum_indicum</i>	79.34
<i>Olea_europaea</i>	78.16
<i>Solanum_lycopersicum</i>	100.00
<i>Coffea_canephora</i>	80.37
<i>Phaseolus_vulgaris</i>	71.73
<i>Glycine_max</i>	70.85
<i>Malus_domestica</i>	72.29
<i>Manihot_esculenta</i>	73.79
<i>Cucumis_sativus</i>	71.11

ПРИМЕР 2

Пример 2.1.: Способ

Выделение и инокуляция протопластов

Протопласты выделяли из листьев дикого типа и мутантных растений томата 2F531 с помощью методик, описанных Tan *et al.* (1987, *Plant cell reports*, 6(3), 172–175). Примерно 2 г листьев томата собирали как от дикого типа, так и от мутанта 2F531, и подвергали выделению протопластов. Каждый образец протопласта, содержащий примерно 2×10^6 клеток, инокулировали 50 мкг очищенного вириона ПерMV методом PEG 4000 и инкубировали в течение 24 часов при 26°C, влажности и постоянном освещении в камере роста. Пробы протопластов отбирали через 0, 17 и 24 часа после заражения. Общую РНК выделяли из протопласта с помощью реагента Тризол. Геномную ДНК удаляли из образцов РНК, РНК нормализовали и использовали для анализа экспрессии с помощью RT-qPCR. Экспрессию ПерMV стандартизировали с использованием фактора элонгации 1-альфа в качестве эндогенного гена.

Пример 2.2.: Инфицирование протопластов томата дикого типа и 2F531 ПерMV подтверждает его роль в репликации ПерMV внутри клетки.

Чтобы дополнить данные о влиянии SLOSCA4.1 на чувствительность и репликацию ПерMV, авторы использовали протопласты листьев томата сорта М82 как дикого типа, так и мутант 2F531. Протопласты выделяли из листьев дикого типа и мутантных растений, инфицированных очищенным вирионом ПерMV, и отбирали образцы через 0, 17 и 24 часа

после заражения. Экспрессию вируса измеряли по общей РНК с помощью относительной RT-qPCR с использованием фактора элонгации альфа 1 (EF-1alpha) в качестве эндогенного гена для нормализации. Результаты показали, что относительное накопление PerMV в протопласте мутантных растений 2F531 было значительно снижено по сравнению с растениями дикого типа (Фигура 7), что указывает на то, что SIOSCA4.1 участвует в репликации PerMV внутри клетки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение или его часть, репродуктивный или размножающийся растительный материал или растительная клетка, отличающиеся тем, что они содержат ген, который кодирует белок, причем указанный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75% %, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и указанный ген инактивирован.

2. Растение или его часть, репродуктивный или размножающийся растительный материал или растительная клетка по п. 1, отличающиеся тем, что растение или его часть, репродуктивный или размножающийся растительный материал или растительная клетка не получены исключительно посредством по существу биологического процесса.

3. Растение или его часть, репродуктивный или размножающийся растительный материал или растительная клетка по п. 1 или 2, где указанный ген инактивирован и кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

4. Растение или его часть, репродуктивный или размножающийся растительный материал или растительная клетка по п. 1 или 2, где указанный ген инактивирован и кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

5. Растение или его часть, репродуктивный или размножающийся растительный материал или растительная клетка по любому из пп.1-4, принадлежащие к семейству *Solanaceae*.

6. Растение или его часть, репродуктивный или размножающийся растительный материал или растительная клетка по любому из пп.1-5, принадлежащие к *Solanum sp.*, *Capsicum sp.*, *Nicotiana sp.* или *Physalis sp.*

7. Растение или его часть, репродуктивный или размножающийся растительный материал или растительная клетка по любому из пп.1-6, принадлежащие к видам, выбранным из перечня, состоящего из: *Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum*, *S. pennellii*, *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *S. cheesmanii*, *S. galapagense*, *S. chilense*, *S. melongena*, *S. aethiopicum*, *S. quitoense*, *S. torvum*, *S. muricatum*, *S. betaceum*, *S. chmielewskii*, *S. arcanum*, *S. cornelliomulleri*, *S. habrochaiti*, *S. huaylasense*, *S. neorickii*, *S. dulcamara*, *S. Iycopersicoides*, *S. sitiens*, *S. juglandifolium*, *S. ochranthum* и *S. cheesmaniae*.

8. Растение или его часть, репродуктивный или размножающийся растительный материал или растительная клетка по любому из пп.1-7, где часть растения выбрана из списка, состоящего из: листа, стебля, цветка, завязи или каллуса.

9. Растение или его часть, репродуктивный или размножающийся растительный материал или растительная клетка по любому из пп.1-8, где репродуктивный или размножающийся растительный материал выбран из плода, семени, клубня или потомства.

10. Способ получения растения или его части, репродуктивного или размножающегося растительного материала или растительной клетки по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что указанное растение или его часть, репродуктивный или размножающийся растительный материал или растительная клетка проявляют устойчивость к инфицированию вирусом мозаики пепино (PerMV) или улучшенный фенотип с точки зрения устойчивости к инфекции PerMV, включающий:

a) Подвержение растения или его части, репродуктивного или размножающегося растительного материала или растительной клетки случайному или направленному мутагенезу, и

b) обнаружение мутации в гене, который кодирует белок, при этом указанный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, в растении или его части, репродуктивном или размножающемся растительном материале или растительной клетке, и при этом указанная мутация приводит к инактивации гена.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что случайный мутагенез достигается путем приведения в контакт растения или его части, репродуктивного или размножающегося растительного материала или растительной клетки с мутагенным агентом, предпочтительно выбранным из списка, состоящего из: химического вещества, ионизирующего излучение, альфа-лучей, гамма-лучей, рентгеновских лучей, УФ-излучения или любой их комбинации.

12. Способ по п. 10, отличающийся тем, что направленный мутагенез достигается путем нацеливания на гомологичные рекомбинационно-зависимые гены, антисмысловую РНК, направленную вставку транспозонов, вирус-индуцированное подавление генов или способы редактирования генома, предпочтительно, где способом редактирования генома является способом CRISPR/Cas.

13. Применение растения или его части, репродуктивного или размножающегося растительного материала или растительной клетки по любому из пп. 1-9 для производства сельскохозяйственного продукта, предпочтительно, где сельскохозяйственный продукт представляет собой продукт питания или корм.

14. Способ производства сельскохозяйственного продукта, предпочтительно, где сельскохозяйственный продукт представляет собой продукт питания или корм, включающий:

а) культивирование растения или его части, репродуктивного или размножающегося растительного материала или растительной клетки по любому из пп.1-9,

б) сбор плодов, семян, клубней или съедобной части растения для производства сельскохозяйственного продукта, и

с) при необходимости подготовка сельскохозяйственного продукта к употреблению в свежем или измененном виде.

15. Применение гена в качестве биомаркера для отбора растений с устойчивостью к заражению ПерMV или с улучшенным фенотипом с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV, где указанный ген кодирует белок, который содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

16. Применение по п.15, где отбор осуществляют путем определения нуклеотидной последовательности гена.

17. Применение по п. 15, в котором отбор осуществляют путем обнаружения или количественного определения продукта экспрессии гена, причем указанные продукты выбраны из списка, состоящего из: комплементарной ДНК или ее фрагмента, информационной РНК или ее фрагмента и белка или его фрагмента.

18. Применение маркерного локуса для отбора растений с устойчивостью к заражению ПерMV, где указанный маркерный локус ко-сегрегирует с SEQ ID NO: 4 и локализуется в диапазоне 100000 нуклеотидов выше или ниже SEQ ID NO: 4.

19. Применение по п.15, где отбор осуществляют путем дополнительного определения локуса маркера по п.18.

20. Способ отбора растений с устойчивостью к заражению ПерMV или с улучшенным фенотипом с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV по сравнению с диким типом, включающий стадии:

а) Обнаружение гена, который кодирует белок, при этом указанный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и

б) Определение того, инактивирован ли указанный ген стадии а), причем инактивированный ген указывает на устойчивость к заражению ПерMV или улучшенный фенотип с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV по сравнению с диким типом.

21. Способ по п. 20, в котором обнаружение на стадии а) осуществляют путем определения нуклеотидной последовательности гена или его фрагмента.

22. Способ по п. 20, в котором обнаружение на стадии а) осуществляют путем обнаружения или количественного определения продукта экспрессии гена, причем указанные продукты выбраны из списка, состоящего из: комплементарной ДНК или ее фрагмента, информационной РНК или ее фрагмента и белка или его фрагмента.

23. Способ получения гибрида растения или его части, репродуктивного или размножающегося растительного материала или растительной клетки по любому из пп.1-9, где указанный гибрид проявляет устойчивость к заражению вирусом мозаики пепино (PerMV) или улучшенный фенотип с точки зрения устойчивости к инфекции PerMV, включающий:

а) Скрещивание растения или его части, репродуктивного или размножающегося растительного материала или растительной клетки по любому из пп.1-9 со вторым растением; и

б) Получение гибридного потомства от указанного скрещивания.

24. Способ получения растения или его части, репродуктивного или размножающегося растительного материала или растительной клетки по любому из пп. 1 или 3 или 9, отличающийся тем, что указанное растение или его часть, репродуктивный или размножающийся растительный материал или растительная клетка проявляют устойчивость к инфицированию вирусом мозаики пепино (PerMV) или улучшенный фенотип с точки зрения устойчивости к инфекции PerMV по сравнению с диким типом, включающий:

а) Скрещивание селекционного растения или его части, селекционного репродуктивного или размножающегося растительного материала или клетки селекционного растения по любому из пп. 1-9 со вторым растением;

б) отбор потомства растения, полученного в результате скрещивания на стадии а) имеющего интрогрессию от селекционного растения или его части, селекционного репродуктивного или размножающегося растительного материала или клетки селекционного растения по любому из пп.1-9, связанную с устойчивостью к PerMV или улучшенным фенотипом с точки зрения устойчивости к инфекции PerMV;

с) самоопыление и/или обратное скрещивание указанного потомственного растения, выбранного на стадии (б), с использованием указанного селекционного растения или его части, селекционного репродуктивного или размножающегося растительного материала, клетки селекционного растения линии или второго растения как в (а) в качестве родителя;

d) отбор потомства растения, полученного в результате скрещивания на стадии c) имеющего интрогрессию от селекционного растения или его части, селекционного репродуктивного или размножающегося растительного материала или клетки селекционного растения, связанную с устойчивостью к ПерMV или улучшенным фенотипом с точки зрения устойчивости к инфекции ПерMV; и

e) повторение указанных стадий самоопыления и/или обратного скрещивания и отбор стадий (c) и (d) для получения селекционной линии растений, по существу гомозиготной по указанной интрогрессии, при этом по меньшей мере один отбор, выполненный на стадиях (b) или (d) осуществляется путем отбора с помощью маркеров,

при этом интрогрессия включает мутацию в гене, который кодирует белок, при этом указанный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 62%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и где указанная мутация приводит к инактивации гена.

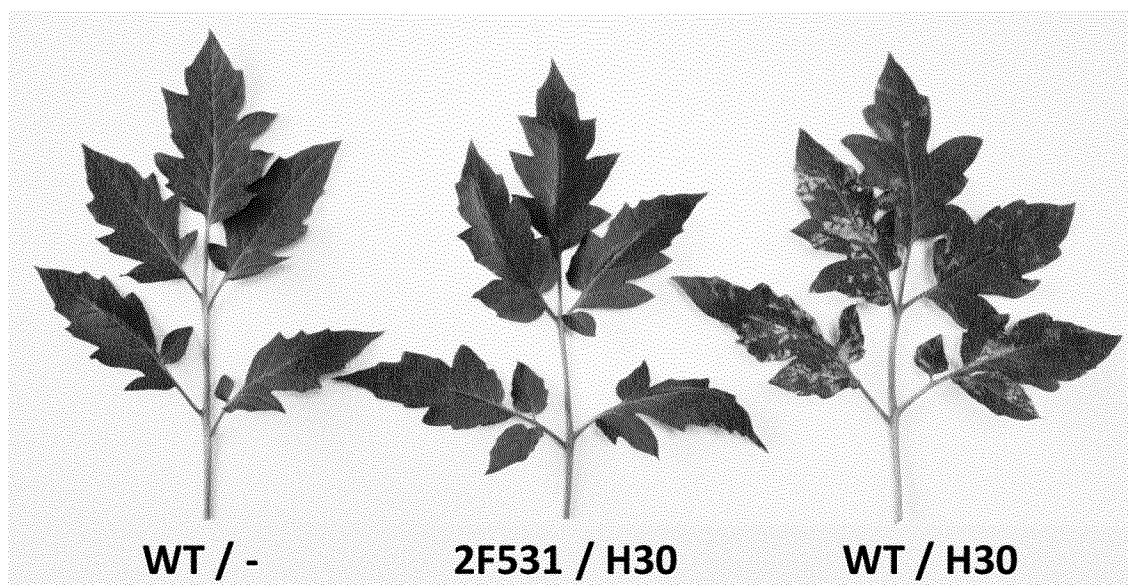
25. Способ по п.23 или 24, отличающийся тем, что второе растение на стадии а) принадлежит к *Solanum sp.*, *Capsicum sp.*, *Nicotiana sp.* или *Physalis sp.*, предпочтительно *Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum*, *S. pennellii*, *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *S. cheesmanii*, *S. galapagense*, *S. chilense*, *S. melongena*, *S. aethiopicum*, *S. quitoense*, *S. torvum*, *S. muricatum*, *S. betaceum*, *S. chmielewskii*, *S. arcanum*, *S. cornelliomulleri*, *S. habrochaiti*, *S. huaylasense*, *S. neorickii*, *S. dulcamara*, *S. Lycopersicoides*, *S. sitiens*, *S. juglandifolium*, *S. ochranthum* или *S. cheesmania*.

26. Способ по любому из пп. 23 или 25, в котором второе растение стадии а) представляет собой инбредную линию, а гибридное потомство стадии b) представляет собой гибрид F1 простого скрещивания.

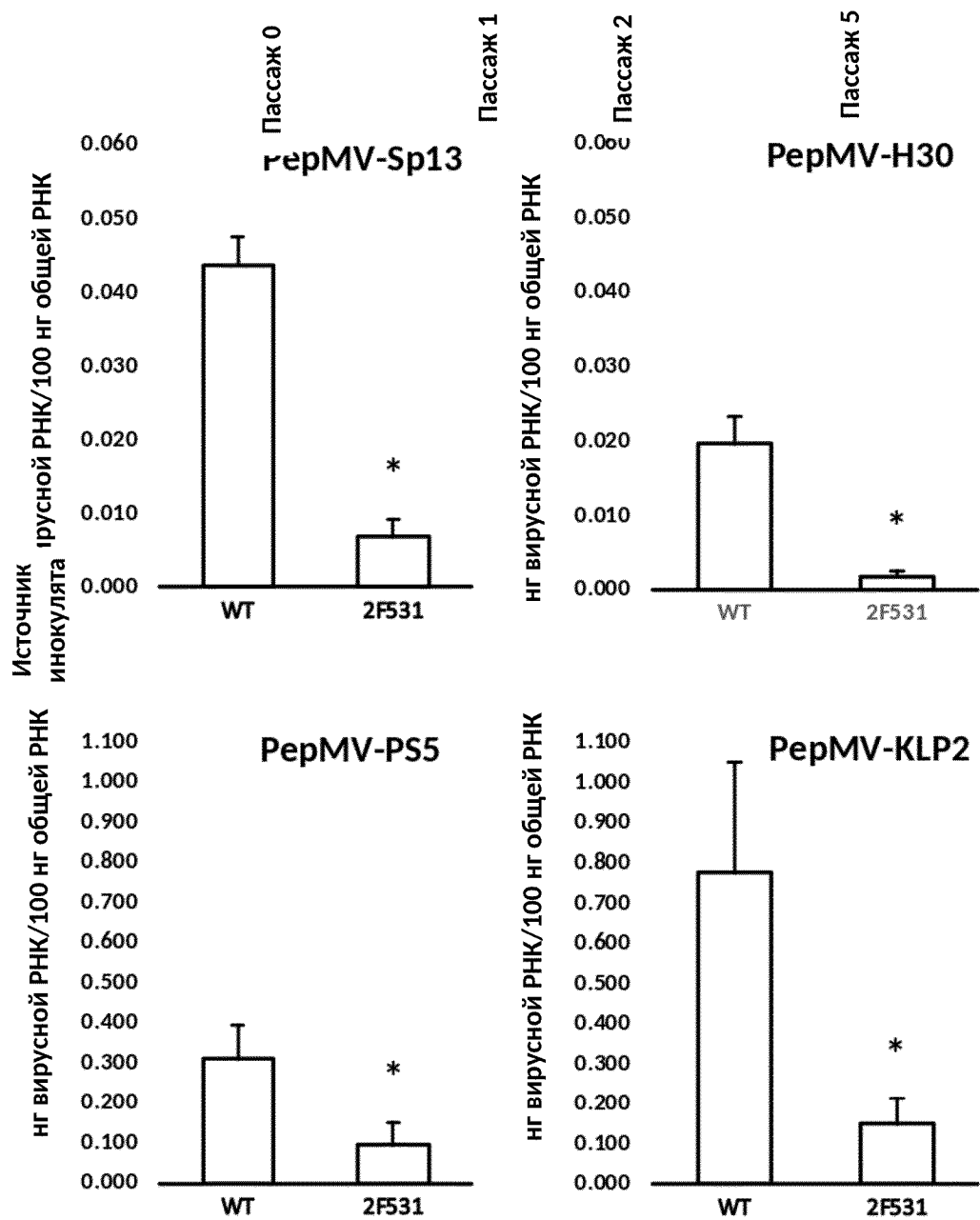
27. Способ по любому из пп. 23, 25 или 26, который дополнительно включает дополнительную стадию (c), на которой гибриды, собранные на стадии (b), демонстрирующие инактивацию гена, который кодирует белок, при этом указанный белок содержит аминокислотную последовательность с не менее 60%, 62%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, выбраны путем вмешательства человека.

28. Растение или его часть, репродуктивный или размножающийся растительный материал или растительная клетка, полученная способом по любому из пп. 23-27, где указанное растение или его часть, репродуктивный или размножающийся растительный материал или растительная клетка содержат ген который кодирует белок, причем указанный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей

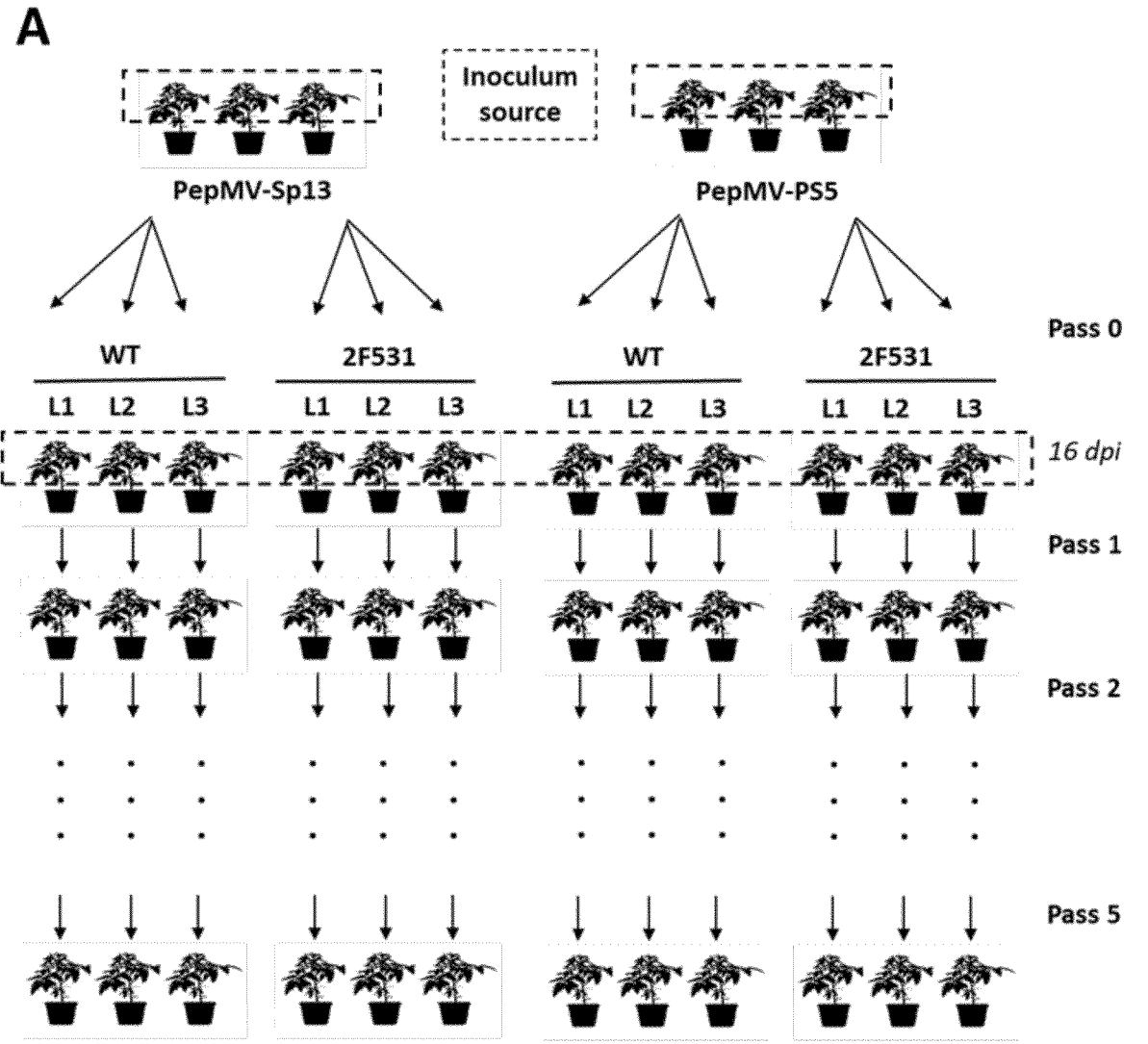
мере 60%, 62%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и указанный ген инактивирован.

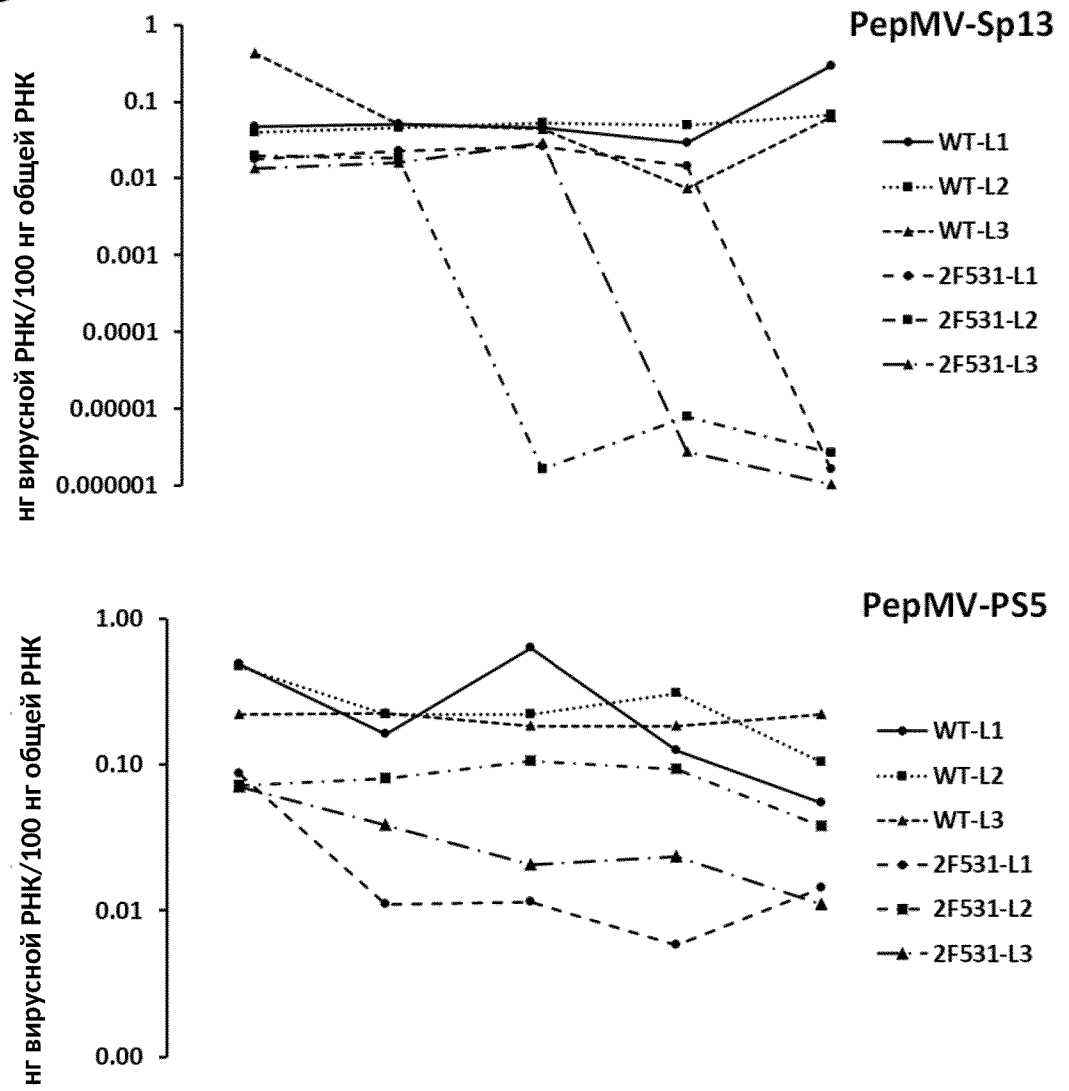


ФИГ. 1



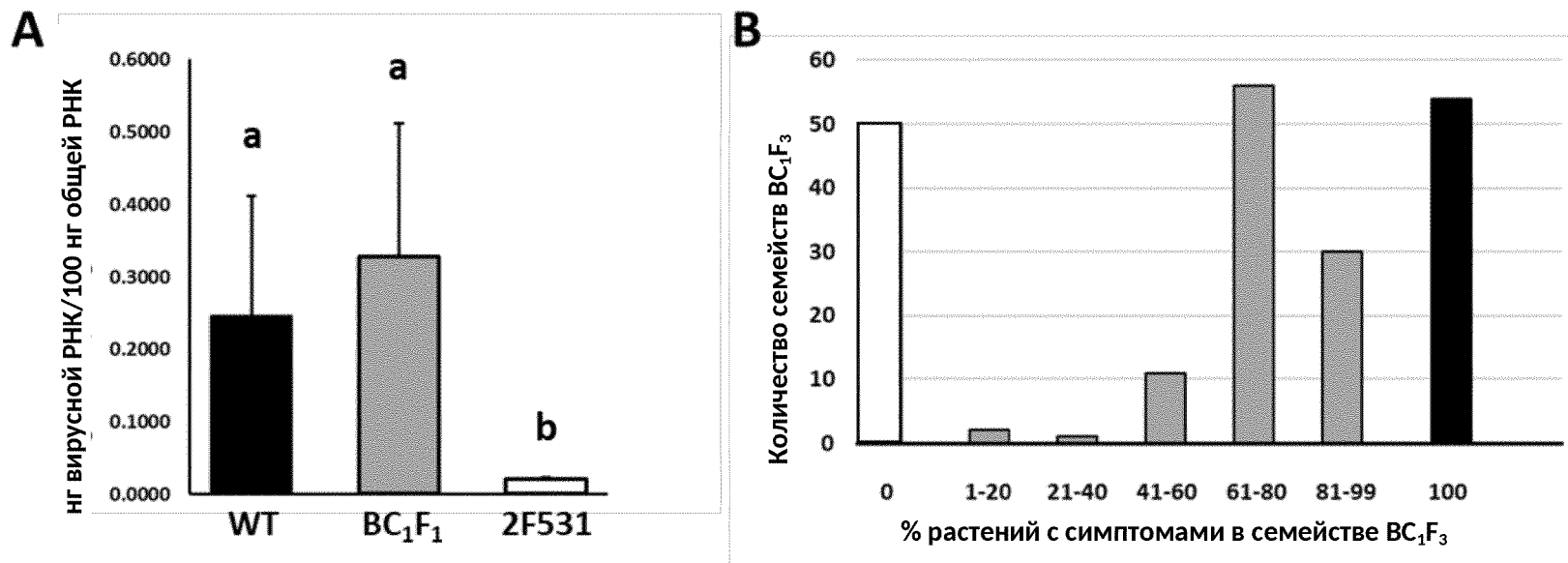
ФИГ. 2



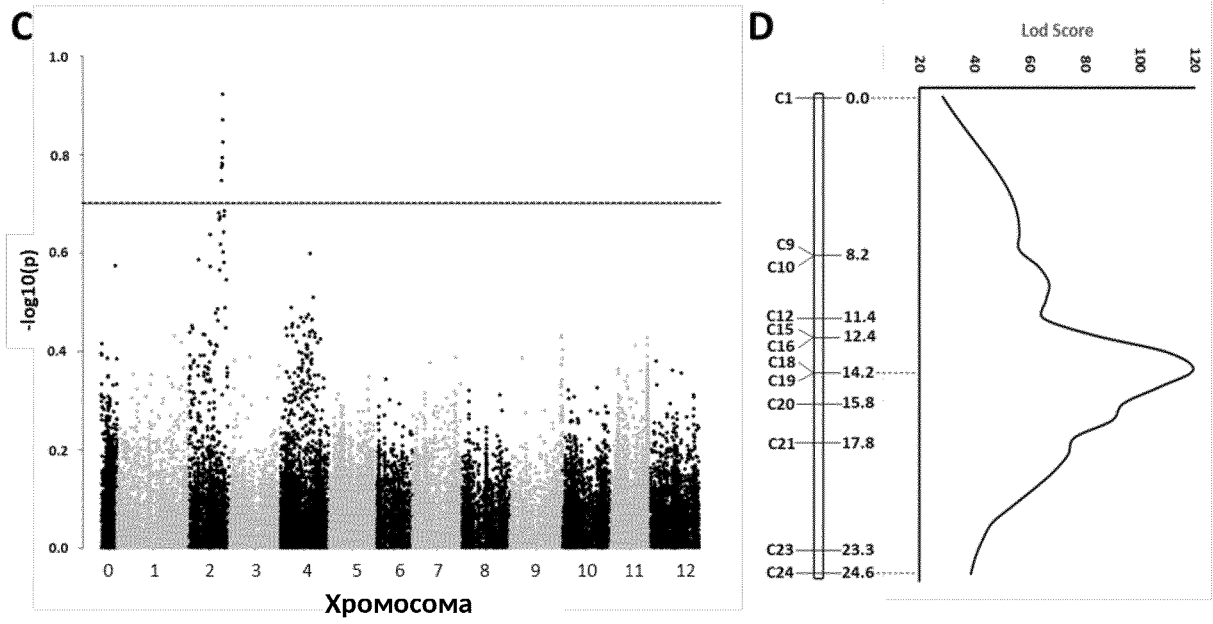
B

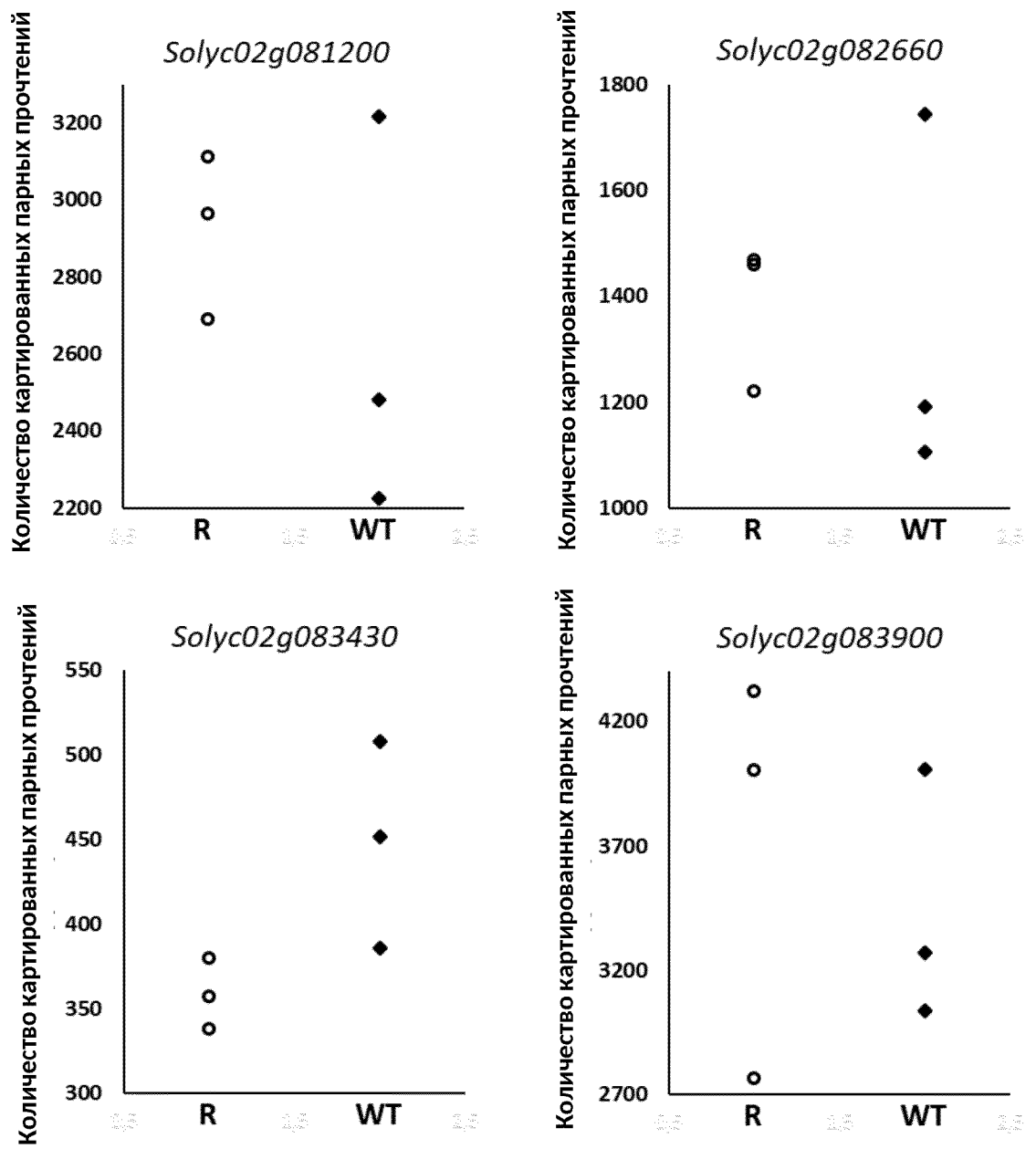
ФИГ. 3
(ПРОДОЛЖЕНИЕ)

ФИГ. 4

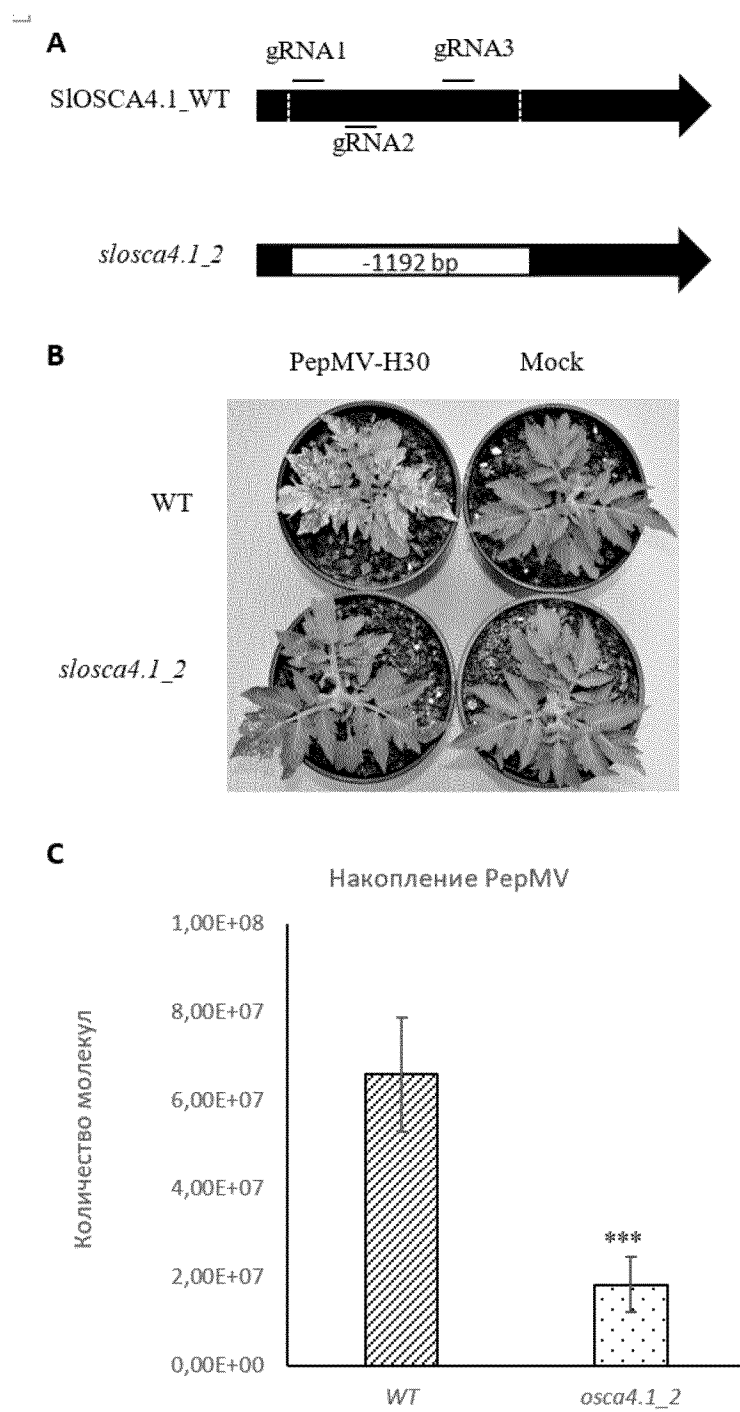


Фиг. 4
(ПРОДОЛЖЕНИЕ)

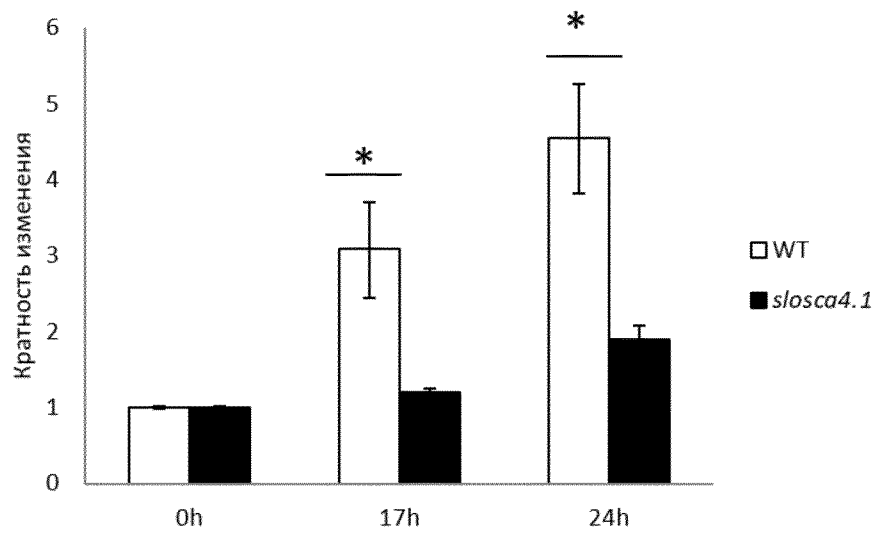




ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7