

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393306 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.04.12

(51) Int. Cl. C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.06.09

(54) ПОВЫШЕНИЕ УРОЖАЙНОСТИ ЗА СЧЕТ КОМБИНАЦИЙ ГЕНОВ

(31) 63/210,291

(32) 2021.06.14

(33) US

(86) PCT/EP2022/065687

(87) WO 2022/263285 2022.12.22

(71) Заявитель:
БАСФ СЕ (DE)

(72) Изобретатель:

Дейоунг Броди Джон (US), Босси
Занон Рената (BR), Куи Йунксинг
Кори (US), Др. Шульгхайсс Хольгер
(DE)

(74) Представитель:
Беляева Е.Н. (BY)

(57) Настоящее изобретение относится к селекции и выращиванию растений. В частности, изобретение относится к материалам и способам повышения урожайности растений. Предпочтительно такое повышение наблюдается при стрессе, вызванным грибковым патогеном.

202393306
A1

202393306

A1

Повышение урожайности за счет комбинаций генов

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к селекции и выращиванию растений. В частности, изобретение относится к материалам и способам повышения урожайности растений. Предпочтительно соответствующие улучшения наблюдаются при стрессе, вызванным грибковым патогеном.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В прошлом патогенные организмы растений, в частности, грибы, приводили к серьезному снижению урожайности сельскохозяйственных культур, а при наиболее негативных сценариях – к голоду. Монокультуры, в частности, очень восприимчивы к эпидемическому распространению болезней. На сегодняшний день борьба с патогенными организмами главным образом предполагает использование пестицидов. В настоящее время возможность прямой модификации генетической предрасположенности растения или патогена доступна и человеку. В некоторых случаях существует возможность синтеза и применения к растениям природных фунгицидов, вырабатываемых растениями после грибковой инфекции.

На урожайность влияют различные факторы, например, количество и размер органов растения, архитектура растения (например, количество ветвей), количество заполненных семян или зерен, жизнеспособность растения, скорость роста, развитие корней, использование воды и питательных веществ и, особенно, устойчивость к абиотическому и биотическому стрессу.

В прошлом предпринимались усилия по созданию растений, которые являются резистентными к биотическим стрессам, таким как грибковые патогены. Термин «резистентность», используемый по тексту настоящей заявки, обозначает отсутствие или уменьшение одного или нескольких симптомов заболевания у растения, вызванного растительным патогеном. Резистентность обычно описывает способность растения предотвращать или, по меньшей мере, сокращать заражение и колонизацию вредным патогеном. Для естественной резистентности характерны различные механизмы, при помощи которых растения

противодействуют колонизации фитопатогенными организмами (Шопфер и Бреннике (1999), Физиология растений, издательство Шпрингер, Берлин-Гейдельберг, Германия). Однако, в естественных условиях резистентность часто преодолевается по причине быстрого развития новых вирулентных рас возбудителей, в том числе грибов (Neu et al. (2003) American Cytopathol. Society, MPMI 16 No. 7: 626-633).

Грибы встречаются по всему миру. На сегодняшний день специалистам известно порядка 100 000 различных видов грибов. Поэтому ржавчина имеет большое значение. Для данных грибов может быть характерен сложный цикл развития, включающий до пяти различных стадий развития спор (сперматий, эцидиоспора, уредоспора, телеутоспора и базидиоспора). Для проникновения в растение формируются специфические инфекционные структуры. Питание биотрофных фитопатогенных грибов зависит от метаболизма живых растительных клеток. К примерам биотрофных грибов относятся многие ржавчинные грибы, мучнисторосяные грибы или патогенные оомицеты, такие как род *Phytophthora* или *Pezizospora*. Некротрофные фитопатогенные грибы, например, виды из рода *Fusarium*, *Rhizoctonia* или *Mycosphaerella*, питаются мертвыми клетками растений. Ржавчина сои занимает промежуточное положение. Он проникает непосредственно в эпидермис, после чего проникшая клетка некротизируется. Однако, после проникновения гриб переходит к облигатно-биотрофному образу жизни. Подгруппа биотрофных грибковых патогенов, которая, по сути, использует данную стратегию заражения, является геминекротрофной.

Ржавчина сои, *Phakopsora pachyrhizi*, проникает непосредственно в эпидермис растения. Прорастая через клетку эпидермиса, гриб достигает межклеточного пространства мезофилла, где начинает распространяться по листу. Для получения питательных веществ гриб проникает в клетки мезофилла и формирует гаустории внутри клеток мезофилла. Особенно негативной особенностью *Phakopsora pachyrhizi* является то, что данный патоген демонстрирует чрезвычайную изменчивость, тем самым преодолевая новые механизмы резистентности растений и новую фунгицидную активность в течение нескольких лет, а иногда и в течение одного вегетационного сезона в Бразилии.

Несмотря на научную значимость резистентности, резистентность имеет экономическую ценность только в том случае, если приводит к повышению урожайности или качества урожая (по сравнению с восприимчивыми сортами) при наличии заболевания.

По мере того как повышалась резистентность сельскохозяйственных культур, становилось ясно, что повышение резистентности к грибам не соотносится с повышением урожайности, в частности, в естественных полевых условиях, а не в защищенных тепличных условиях. Даже гены, которые стабильно обеспечивают высокую резистентность к грибам, могут не увеличивать или даже снижать урожайность. Вопреки здравому смыслу, предположениям и утверждениям в литературе, характеристики резистентности к грибам и урожайности в лучшем случае не зависят друг от друга, а зачастую даже нейтрализуют друг друга (обзор на эту тему приведен в работе Ning et al. *Balancing Immunity and Yield in Crop Plants Trends in Plant Science* 22(12), 1069-1079). Фермеров, однако, в первую очередь интересует урожайность. Степень поражения растений грибковыми инфекциями не имеет значения, если только это не влияет на урожайность.

В прошлом был идентифицирован ряд генов, повышающих резистентность сои к ржавчине сои, примерами таких публикаций являются WO2014118018, WO2013001435, WO2014076614, WO2014024079 и WO2012023099.

Тем не менее, как видно из примеров, невозможно со значительной степенью уверенности предсказать развитие урожайности за счет экспрессии гена, придающего резистентность к грибковому патогену. Таким образом, признак повышения урожайности не зависит от признака резистентности к грибам и не может прогнозироваться с его помощью. Кроме того, как также указано в тексте настоящей заявки, комбинации генов, по отдельности участвующих в повышении урожайности, обычно не приводят к сверхаддитивному повышению урожайности и зачастую даже дают увеличение урожайности, которое меньше, чем теоретический эффект аддитивного повышения урожайности, прогнозируемый на основе отдельных генов. Фактически, совместная экспрессия генов, по отдельности участвующих в повышении урожайности и резистентности к грибам, может даже приводить к снижению урожайности.

Таким образом, задачей изобретения было создание материалов и способов повышения урожайности растений, в частности, сельскохозяйственных культур, и предпочтительно обеспечение увеличения урожайности, несмотря на потенциальный стресс в результате воздействия грибковых патогенов. В частности, предпочтительной задачей изобретения было создание материалов и способов, которые приводят к получению растительного материала с наследуемой повышенной урожайностью даже в условиях заражения грибковым патогеном, предпочтительно ржавчинным грибом и, наиболее предпочтительно, ржавчинным грибом рода *Phakopsora*, при этом также в условиях отсутствия значительного риска инфицирования.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы изобретения обнаружили, что определенные гены обеспечивают повышение урожайности растений, в частности, сельскохозяйственных культур. В частности, настоящей заявкой предусмотрено, что одновременное присутствие белков Pti5 и SAR8.2 в клетках растения, предпочтительно сельскохозяйственного растения, более предпочтительно сельскохозяйственного растения, не входящего в таксономическое подсемейство Solanoideae, неожиданно повышает урожайность семян в условиях естественного стресса, вызванного грибковыми патогенами.

Таким образом, заявка включает в себя следующие принципы изобретения:

Изобретением предусмотрен способ повышения урожайности растения по сравнению с контрольным растением, включающий:

- i) получение растения, содержащего ген Pti5 и SAR8.2 и/или гибридный ген Pti5-SAR8.2, причем предпочтительно гены Pti5 и/или SAR8.2 представлены в соответствующей гетерологичной экспрессионной кассете, и
- ii) культивирование растения.

Изобретением также предусмотрена растительная клетка, часть растения или целое растение, содержащие ген Pti5 и SAR8.2 и/или гибридный ген Pti5-SAR8.2, причем растение предпочтительно содержит гетерологичную экспрессионную кассету Pti5 и/или гетерологичную экспрессионную кассету SAR8.2.

Также изобретением предусмотрен способ получения гибридного растения, которое характеризуется повышенной урожайностью по сравнению с контрольным растением, включающий:

- i) получение
 - i-a) первого растительного материала, содержащего ген Pti5 и SAR8.2 и/или гибридный ген Pti5-SAR8.2, предпочтительно содержащего гетерологичную экспрессионную кассету Pti5 и гетерологичную экспрессионную кассету SAR8.2, и второго растительного материала, не содержащего ни ген Pti5 и SAR8.2, ни гибридный ген Pti5-SAR8.2, или
 - i-b) первого растительного материала, содержащего ген Pti5, предпочтительно содержащего гетерологичную экспрессионную кассету Pti5, и второго растительного материала, содержащего ген SAR8.2, предпочтительно содержащего гетерологичную экспрессионную кассету SAR8.2,
- ii) получение поколения F1 путем скрещивания первого и второго растительного материала, и
- iii) селекцию одного или более представителей поколения F1, способных экспрессировать Pti5 и SAR8.2.

Кроме того, изобретением предусмотрено применение комбинации, по меньшей мере, гена Pti5 и гена SAR8.2, гибридного гена Pti5-SAR8.2 или растения, части растения или растительной клетки согласно изобретению для повышения урожайности растения, предпочтительно в естественных полевых условиях, более предпочтительно в условиях воздействия патогенов, более предпочтительно причем на одной стадии роста растения средняя площадь пораженных листьев составляет 2 - 100%, более предпочтительно 5 - 50%, более предпочтительно 10 - 50%,

причем урожайность представляет собой один или несколько из следующих параметров:

- биомасса на площадь,
- масса зерна на площадь,
- масса семян на площадь,

предпочтительно масса семян на площадь.

Настоящим изобретением предусмотрен способ синергетического повышения урожайности, включающий экспрессию в растительной клетке, части растения или растении, по меньшей мере, белка Pti5 и белка SAR8.2.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На Фигуре 1 показана относительная резистентность к заболеваниям, обеспечиваемая экспрессией Pti5, SAR8.2 и комбинацией SAR8.2 и Pti5 при двух различных обработках

Для того чтобы сравнить прогресс заболевания в течение всего сезона у растений, экспрессирующих отдельные гены или комбинацию SAR8.2 и Pti5, по сравнению с диким типом, выполняется расчет относительной резистентности к заболеваниям (средняя относительная резистентность к заболеваниям = $(\text{ПКРБ (контроль)} / \text{ПКРБ (событие)}) - 1) * 100\%$ в среднем по местоположениям).

Четко видно, что оба отдельных гена обеспечивают повышенную резистентность при обеих обработках (без обработки: отсутствие обработки фунгицидами, обработка А: одна обработка фунгицидами в начале острая реакция на стресс, вызванный заболеванием (~35 - 40 дней после высадки)). По результатам сравнения относительной резистентности к заболеваниям вариантов, экспрессирующих один ген, с вариантами, экспрессирующими оба гена, становится очевидно, что резистентность к заболеваниям не является аддитивной (или более аддитивной).

На Фигуре 2 показана формула Колби, которая обычно используется для прогнозирования общей эффективности признака для двух факторов, которые аддитивно влияют на один и тот же признак.

На Фигуре 3а показано относительное повышение урожайности [%] сои культурной, экспрессирующей отдельные гены Pti5 или SAR8.2 или комбинацию обоих генов (SAR8.2 + Pti5), по сравнению с нетрансгенной соей дикого типа (среднее повышение урожайности = $(\text{урожайность(контрольный сорт)} / \text{урожайность(событие)} - 1) * 100\%$), с обработкой фунгицидами и без нее (без обработки: обработка фунгицидами не проводится, обработка А: одна обработка фунгицидами в начале азиатской ржавчины сои (~35 - 40 дней после высадки)). Пунктирная линия показывает прогнозируемое относительное повышение урожайности на основе формулы Колби (см. Фигуру 2) в случаях, когда

повышение урожайности обусловлено обоими единичными генами. Поскольку пунктирная линия находится ниже линии с диагональными полосами (показывающей реальное измеренное повышение урожайности, обусловленное комбинацией Pti5 и SAR8.2 (пакетирование)), можно считать, что результат превышает аддитивный. На графике показаны результаты, измеренные в местоположении 1.

Четко видно, что повышение урожайности, обусловленное комбинацией Pti5 и SAR8.2, больше аддитивного повышения урожайности, которое прогнозируется формулой Колби на основе эффективности единичных генов. Таким образом, комбинация SAR8.2 и Pti5 позволяет получить урожайность, которая превышает аддитивную.

На Фигуре 3b показано относительное повышение урожайности [%] сои культурной, экспрессирующей отдельные гены Pti5 или SAR8.2 или комбинацию обоих генов (SAR8.2 + Pti5), по сравнению с нетрансгенной соей дикого типа с обработкой фунгицидами и без нее (без обработки: обработка фунгицидами не проводится, обработка А: одна обработка фунгицидами в начале азиатской ржавчины сои (~35 - 40 дней после высадки)). Пунктирная линия показывает прогнозируемое относительное повышение урожайности на основе формулы Колби (см. Фигуру 2) в случаях, когда повышение урожайности обусловлено обоими единичными генами. Поскольку пунктирная линия находится ниже линии с диагональными полосами, показывающей реальное измеренное повышение урожайности, обусловленное комбинацией Pti5 и SAR8.2 (пакетирование), можно считать, что результат превышает аддитивный. На графике показаны результаты, измеренные в местоположении 2.

Четко видно, что повышение урожайности, обусловленное комбинацией Pti5 и SAR8.2, больше аддитивного повышения урожайности, которое прогнозируется формулой Колби на основе эффективности единичных генов. Таким образом, комбинация SAR8.2 и Pti5 позволяет получить урожайность, которая превышает аддитивную.

На Фигуре 4a показано относительное повышение урожайности [%] сои культурной, экспрессирующей отдельные гены Pti5 или ADR1 или комбинацию обоих генов (ADR1 + Pti5), по сравнению с нетрансгенной соей дикого типа с обработкой фунгицидами и без нее (без обработки: обработка фунгицидами не

проводится, обработка А: одна обработка фунгицидами в начале азиатской ржавчины сои (~35 – 40 дней после высадки)). Пунктирная линия показывает прогнозируемое относительное повышение урожайности на основе формулы Колби (см. Фигуру 2) в случаях, когда повышение урожайности обусловлено обоими единичными генами. Если пунктирная линия находится ниже линии с диагональными полосами, показывающей реальное измеренное повышение урожайности, обусловленное комбинацией Pti5 и ADR1 (пакетирование), можно считать, что результат превышает аддитивный. На графике показаны результаты, измеренные в местоположении 1.

Четко видно, что повышение урожайности, обусловленное комбинацией Pti5 и ADR1 значительно меньше аддитивного повышения урожайности, которое прогнозируется формулой Колби на основе эффективности единичных генов. Таким образом, комбинация ADR1 и Pti5 дает меньшую урожайность по сравнению с аддитивной.

На Фигуре 4b показано относительное повышение урожайности [%] сои культурной, экспрессирующей отдельные гены Pti5 или ADR1 или комбинацию обоих генов (ADR1 + Pti5), по сравнению с нетрансгенной соей дикого типа с обработкой фунгицидами и без нее (без обработки: обработка фунгицидами не проводится, обработка А: одна обработка фунгицидами в начале азиатской ржавчины сои (~35 – 40 дней после высадки)). Пунктирная линия показывает прогнозируемое относительное повышение урожайности на основе формулы Колби (см. Фигуру 2) в случаях, когда повышение урожайности обусловлено обоими единичными генами. Если пунктирная линия находится ниже линии с диагональными полосами, показывающей реальное измеренное повышение урожайности, обусловленное комбинацией Pti5 и ADR1 (пакетирование), можно считать, что результат превышает аддитивный. На графике показаны результаты, измеренные в местоположении 2.

Четко видно, что повышение урожайности, обусловленное комбинацией Pti5 и ADR1 значительно меньше аддитивного повышения урожайности, которое прогнозируется формулой Колби на основе эффективности единичных генов. Таким образом, комбинация ADR1 и Pti5 дает меньшую урожайность по сравнению с аддитивной.

На Фигуре 5a показано относительное повышение урожайности [%] сои культурной, экспрессирующей отдельные гены Pti5 или RLK2 или комбинацию обоих генов (RLK2 + Pti5), по сравнению с нетрансгенной соей дикого типа с обработкой фунгицидами и без нее (без обработки: обработка фунгицидами не проводится, обработка А: одна обработка фунгицидами в начале азиатской ржавчины сои (~35 – 40 дней после высадки)). Пунктирная линия показывает прогнозируемое относительное повышение урожайности на основе формулы Колби (см. Фигуру 2) в случаях, когда повышение урожайности обусловлено обоими единичными генами. Если пунктирная линия находится ниже линии с диагональными полосами, показывающей реальное измеренное повышение урожайности, обусловленное комбинацией Pti5 и RLK2 (пакетирование), можно считать, что результат превышает аддитивный. На графике показаны результаты, измеренные в местоположении 1.

Четко видно, что повышение урожайности, обусловленное комбинацией Pti5 и RLK2 значительно меньше аддитивного повышения урожайности, которое прогнозируется формулой Колби на основе эффективности единичных генов. Таким образом, комбинация RLK2 и Pti5 дает меньшую урожайность по сравнению с аддитивной.

На Фигуре 5b показано относительное повышение урожайности [%] сои культурной, экспрессирующей отдельные гены Pti5 или RLK2 или комбинацию обоих генов (RLK2 + Pti5), по сравнению с нетрансгенной соей дикого типа с обработкой фунгицидами и без нее (без обработки: обработка фунгицидами не проводится, обработка А: одна обработка фунгицидами в начале азиатской ржавчины сои (~35 – 40 дней после высадки)). Пунктирная линия показывает прогнозируемое относительное повышение урожайности на основе формулы Колби (см. Фигуру 2) в случаях, когда повышение урожайности обусловлено обоими единичными генами. Если пунктирная линия находится ниже линии с диагональными полосами, показывающей реальное измеренное повышение урожайности, обусловленное комбинацией Pti5 и RLK2 (пакетирование), можно считать, что результат превышает аддитивный. На графике показаны результаты, измеренные в местоположении 2.

Четко видно, что повышение урожайности, обусловленное комбинацией Pti5 и RLK2 значительно меньше аддитивного повышения урожайности, которое

прогнозируется формулой Колби на основе эффективности единичных генов. Таким образом, комбинация RLK2 и Pti5 дает меньшую урожайность по сравнению с аддитивной.

На Фигуре 6a показано относительное повышение урожайности [%] сои культурной, экспрессирующей отдельные гены SAR8.2 или RLK2 или комбинацию обоих генов (RLK2 + SAR8.2), по сравнению с нетрансгенной соей дикого типа с обработкой фунгицидами и без нее (без обработки: обработка фунгицидами не проводится, обработка А: одна обработка фунгицидами в начале азиатской ржавчины сои (~35 – 40 дней после высадки)). Пунктирная линия показывает прогнозируемое относительное повышение урожайности на основе формулы Колби (см. Фигуру 2) в случаях, когда повышение урожайности обусловлено обоими единичными генами. Если пунктирная линия находится ниже линии с диагональными полосами, показывающей реальное измеренное повышение урожайности, обусловленное комбинацией SAR8.2 и RLK2 (пакетирование), можно считать, что результат превышает аддитивный. На графике показаны результаты, измеренные в местоположении 1.

Четко видно, что повышение урожайности, обусловленное комбинацией SAR8.2 и RLK2 значительно меньше аддитивного повышения урожайности, которое прогнозируется формулой Колби на основе эффективности единичных генов. Таким образом, комбинация RLK2 и SAR8.2 дает меньшую урожайность по сравнению с аддитивной.

На Фигуре 6b показано относительное повышение урожайности [%] сои культурной, экспрессирующей отдельные гены SAR8.2 или RLK2 или комбинацию обоих генов (RLK2 + SAR8.2), по сравнению с нетрансгенной соей дикого типа с обработкой фунгицидами и без нее (без обработки: обработка фунгицидами не проводится, обработка А: одна обработка фунгицидами в начале азиатской ржавчины сои (~35 – 40 дней после высадки)). Пунктирная линия показывает прогнозируемое относительное повышение урожайности на основе формулы Колби (см. Фигуру 2) в случаях, когда повышение урожайности обусловлено обоими единичными генами. Если пунктирная линия находится ниже линии с диагональными полосами, показывающей реальное измеренное повышение урожайности, обусловленное комбинацией SAR8.2 и RLK2

(пакетирование), можно считать, что результат превышает аддитивный. На графике показаны результаты, измеренные в местоположении 2.

Четко видно, что повышение урожайности, обусловленное комбинацией SAR8.2 и RLK2 значительно меньше аддитивного повышения урожайности, которое прогнозируется формулой Колби на основе эффективности единичных генов. Таким образом, комбинация RLK2 и SAR8.2 дает меньшую урожайность по сравнению с аддитивной.

На Фигуре 7 показано относительное повышение урожайности [%] сои культурной, экспрессирующей отдельные гены Pti5 или Ein2Cterm или комбинацию обоих генов (Ein2Cterm + Pti5), по сравнению с нетрансгенной соей дикого типа с обработкой фунгицидами и без нее (без обработки: обработка фунгицидами не проводится, обработка А: одна обработка фунгицидами в начале азиатской ржавчины сои (~35 – 40 дней после высадки)). Пунктирная линия показывает прогнозируемое относительное повышение урожайности на основе формулы Колби (см. Фигуру 2) в случаях, когда повышение урожайности обусловлено обоими единичными генами. Если пунктирная линия находится ниже линии с диагональными полосами, показывающей реальное измеренное повышение урожайности, обусловленное комбинацией Pti5 и Ein2Cterm (пакетирование), можно считать, что результат превышает аддитивный. Четко видно, что повышение урожайности, обусловленное комбинацией Pti5 и Ein2Cterm значительно меньше аддитивного повышения урожайности, которое прогнозируется формулой Колби на основе эффективности единичных генов. Таким образом, комбинация Ein2Cterm и Pti5 дает меньшую урожайность по сравнению с аддитивной.

На Фигуре 8 представлена схема замены аминокислот в последовательности белка Pti5. Положения аминокислот даны в виде фрагментов, содержащих не более 100 аминокислот (в данном случае 1-100 и 101-161). Для каждой позиции количество звездочек обозначает степень консервативности, при этом более высокий столбик из звездочек соответствует положению, которое указывает на более высокую предпочтительность сохранения соответствующей наиболее предпочтительной аминокислоты. Аминокислотная последовательность под рядами звездочек представляет собой последовательность наиболее предпочтительных аминокислот. Вторая аминокислотная последовательность под

рядами звездочек представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO. 1. Столбцы аминокислот под наиболее предпочтительной последовательностью указывают для каждого положения замены, которые являются предпочтительными согласно изобретению, причем замены отсортированы в порядке убывания предпочтительности. Замены обозначаются стандартными однобуквенными сокращениями аминокислот, где «-» обозначает недостающую аминокислоту таким образом, что после выравнивания по верхней последовательности в выровненной последовательности появляется пробел.

На Фигуре 9 представлена схема замены аминокислот в последовательности белка SAR8.2. Положения аминокислот даны в виде фрагментов, содержащих не более 100 аминокислот (в данном случае 1-86). Для каждой позиции количество звездочек обозначает степень консервативности, при этом более высокий столбик из звездочек соответствует положению, которое указывает на более высокую предпочтительность сохранения соответствующей наиболее предпочтительной аминокислоты. Аминокислотная последовательность под рядами звездочек представляет собой последовательность наиболее предпочтительных аминокислот. Вторая аминокислотная последовательность под рядами звездочек представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO. 2. Столбцы аминокислот под наиболее предпочтительной последовательностью указывают для каждого положения замены, которые являются предпочтительными согласно изобретению, причем замены отсортированы в порядке убывания предпочтительности. Замены обозначаются стандартными однобуквенными сокращениями аминокислот, где «-» обозначает недостающую аминокислоту таким образом, что после выравнивания по верхней последовательности в выровненной последовательности появляется пробел.

SEQ ID	нт/ак	описание
1	ак	искусственная Pti5-подобная последовательность
2	ак	искусственная SAR8.2-подобная последовательность
3	ак	Последовательность белка Pti5
4	нт	Последовательность ДНК, кодирующая белок Pti5 SEQ ID NO. 3
5	ак	Последовательность белка SAR8.2A
6	нт	Последовательность ДНК, кодирующая белок SAR8.2A SEQ ID NO. 5

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Технические принципы осуществления изобретения описаны по тексту настоящей заявки с использованием языковых средств, в частности, научных и технических терминов. Тем не менее, специалисту в данной области понятно, что языковые средства, какими бы подробными и точными они ни были, могут лишь приблизительно передать всю суть технических принципов, хотя бы потому, что существует множество способов описать принципы, каждый из которых не в состоянии полностью охарактеризовать все понятийные связи, поскольку любое выражение рано или поздно должно закончиться. Осознавая это, специалист в данной области техники понимает, что предмет изобретения представляет собой сумму отдельных технических вариантов, указанных или описанных по тексту настоящей заявки, во всех случаях на основе принципа «часть вместо целого» с естественными ограничениями письменного стиля. В частности, специалисту в данной области техники понятно, что значение отдельных технических вариантов приведено по тексту настоящей заявки в виде сокращенного изложения каждой возможной комбинации вариантов, насколько это технически целесообразно, таким образом, например, раскрытие трех концепций или вариантов осуществления А, В и С представляет собой сокращенное описание вариантов А+В, А+С, В+С, А+В+С. В частности, дополнительные варианты осуществления функций описаны по тексту настоящей заявки в виде списков смежных альтернатив или вариантов осуществления. За исключением случаев, когда указано иное, описанное по тексту настоящей заявки изобретение включает в себя любую комбинацию указанных вариантов. Выбор более или менее предпочтительных элементов из указанных списков является частью изобретения и обусловлен предпочтением специалиста в части минимальной степени осуществления преимущества или преимуществ, реализуемых через соответствующие признаки. Такие множественные комбинированные варианты осуществления представляют собой достаточно предпочтительную(-ые) форму(-ы) изобретения.

Ввиду того, что по тексту настоящей заявки приводятся ссылки на записи в общедоступных базах данных, например Uniprot и PFAM, содержимое этих ссылок актуально на 20 мая 2020 г. За исключением случаев, когда указано иное, если запись содержит информацию о нуклеиновой кислоте или аминокислотной

последовательности, такая информация о последовательности включена в настоящий документ.

По тексту настоящей заявки термины в единственном числе и с использованием форм единственного числа, таких как «a», «an» и «the», включают в себя множественное число, за исключением случаев, когда из контекста явно следует иное. Так, например, термин «нуклеиновая кислота» в некоторых случаях включает в себя множество копий соответствующей молекулы нуклеиновой кислоты; точно так же, термин «зонд», при необходимости, (и, как правило) включает в себя множество аналогичных или идентичных молекул-зондов. По тексту настоящей заявки выражение «включать в себя» или его варианты, такие как «включает в себя» или «включающий» обозначает включение указанного элемента, целого числа или этапа, или группы элементов, целых чисел или этапов, но не обозначает исключение любого другого элемента, целого числа или этапа, или группы элементов, целых чисел или этапов.

По тексту настоящей заявки термин «и/или» относится к любым и всем возможным комбинациям одного или нескольких взаимосвязанных перечисленных элементов, а также к отсутствию комбинаций при интерпретации в альтернативном варианте («или»). Термин «включающий» также включает в себя термин «состоящий из».

Термин «около» в случаях, когда он используется по отношению к измеряемой величине, например, массе, дозировке, времени, температуре, идентичности последовательности и т.д., обозначает отклонение $\pm 0,1\%$, $0,25\%$, $0,5\%$, $0,75\%$, 1% , 2% , 3% , 4% , 5% , 6% , 7% , 8% , 9% , 10% , 15% или даже 20% от указанного значения, а также указанное значение. Таким образом, если данная композиция описана как содержащая «около $50\% X$ », следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления композиция содержит $50\% X$, в то время как в других вариантах осуществления она может содержать от 40% до $60\% X$ (т.е. $50\% \pm 10\%$).

По тексту настоящей заявки термин «ген» относится к биохимической информации, которая, при осуществлении в нуклеиновой кислоте, может быть транскрибирована в продукт гена, т.е. в дополнительную нуклеиновую кислоту, предпочтительно РНК, и предпочтительно также может быть транслирована в

пептид или полипептид. Таким образом, данный термин также используется для обозначения участка нуклеиновой кислоты, напоминающего указанную информацию, и последовательности такой нуклеиновой кислоты (по тексту настоящей заявки также именуемой «последовательностью гена»).

Также по тексту настоящей заявки термин «аллель» обозначает вариацию гена, характеризующуюся одним или несколькими специфическими различиями в последовательности гена по сравнению с последовательностью гена дикого типа, независимо от присутствия в последовательности других различий. Аллели или варианты нуклеотидной последовательности по изобретению, по меньшей мере, в порядке возрастания предпочтения имеют нуклеотидную последовательность, которая на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%-84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична нуклеотидной последовательности гена дикого типа. Соответственно, в случаях, когда «аллель» обозначает биохимическую информацию для экспрессии пептида или полипептида, соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты аллеля имеет, по меньшей мере, в порядке возрастания предпочтения аминокислотную последовательность, которая на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%-84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности соответствующего пептида или полипептида дикого типа.

Варианты белка или нуклеиновой кислоты можно определить по идентичности их последовательностей по сравнению с исходным белком или нуклеиновой кислотой. Идентичность последовательности обычно указывается как «% идентичности последовательности» или «% идентичности». Для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей на первом этапе между этими двумя последовательностями выполняют попарное выравнивание последовательностей, причем указанные две последовательности выравниваются по всей их длине (т.е. выполняется парное глобальное выравнивание). Выравнивание выполняется с помощью программы, реализующей алгоритм Нидлмана и Вунша (J. Mol. Biol. (1979) 48, стр. 443-453), предпочтительно с использованием программы «NEEDLE» (The European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS)) с параметрами программы по

умолчанию (gapopen=10.0, gapextend=0.5 и matrix=EBLOSUM62). Предпочтительным выравниванием для целей настоящего изобретения является такое выравнивание, при котором определяется наибольшая идентичность последовательности.

Приведенный ниже пример служит для иллюстрации двух нуклеотидных последовательностей, при этом те же расчеты применимы и к белковым последовательностям:

Seq A: AAGATACTG длина: 9 оснований

Seq B: GATCTGA длина: 7 оснований

Соответственно, более короткая последовательность – это последовательность B.

Парное глобальное выравнивание, которое показывает обе последовательности по всей длине, дает

Seq A: AAGATACTG-

||| |||

Seq B: --GAT-CTGA

Символ «|» в выравнивании указывает на идентичные остатки (что означает основания ДНК или аминокислот для белков). Количество одинаковых остатков составляет 6.

Символ «-» в выравнивании указывает на пробелы. Количество пробелов, полученных в результате выравнивания внутри последовательности B, равно 1. Количество пробелов, полученных в результате выравнивания на границах последовательности B, равно 2, а на границах последовательности A – 1.

Длина выравнивания, показывающая выровненные последовательности по всей длине, равна 10.

Выполнение попарного выравнивания с более короткой последовательностью по всей ее длине, согласно изобретению, соответственно, дает:

Seq A: GATACTG-

||| |||

Seq B: GAT-CTGA

Выполнение попарного выравнивания с последовательностью А по всей длине, согласно изобретению, соответственно, дает:

Seq A: AAGATACTG

||| |||

Seq B: --GAT-CTG

Выполнение попарного выравнивания с последовательностью В по всей длине, согласно изобретению, соответственно, дает:

Seq A: GATACTG-

||| |||

Seq B: GAT-CTGA

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

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

После выравнивания двух последовательностей на втором этапе на основе выравнивания определяют значение идентичности. Таким образом, согласно описанию настоящего изобретения применяется следующий расчет процента идентичности:

% идентичности = (идентичные остатки/длина области выравнивания, которая демонстрирует соответствующую последовательность по настоящему изобретению по всей длине) *100. Таким образом, идентичность последовательностей при сравнении двух аминокислотных последовательностей согласно изобретению рассчитывают путем деления количества идентичных остатков на длину области выравнивания, которая демонстрирует соответствующую последовательность по настоящему изобретению по всей длине. Для определения «% идентичности» данное значение умножается на 100. В соответствии с приведенным выше примером %идентичности для последовательности А, являющейся последовательностью по изобретению, равен

$(6/9) * 100 = 66,7 \%$; для последовательности В, представляющей собой последовательность по изобретению, – $(6/8) * 100 = 75\%$.

Термин «конструкция нуклеиновой кислоты», используемый по тексту настоящей заявки, обозначает молекулу одно- или двухцепочечной нуклеиновой кислоты, которая выделена из встречающегося в природе гена или модифицирована таким образом, что содержит сегменты нуклеиновых кислот в конфигурации, которая в противном случае не встречается в природе или является синтетической.

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

Термин «контрольная последовательность» или «генетический контрольный элемент» по тексту настоящей заявки включает в себя любые последовательности, влияющие на экспрессию полинуклеотида, включая, помимо прочего, экспрессию полинуклеотида, кодирующего полипептид. Любая контрольная последовательность может быть нативной или чужеродной по отношению к полинуклеотиду или нативной или чужеродной друг для друга. Такие контрольные последовательности помимо прочего, включают в себя последовательность промотора, 5'-UTR (также именуемую лидерной последовательностью), сайт связывания рибосомы (RBS), 3'-UTR и сайты начала и остановки транскрипции.

Термин «функциональная связь» или «функционально связанный» по отношению к регуляторным элементам обозначает последовательное расположение регуляторного элемента (включая, помимо прочего, промотор) с последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей экспрессии и, при необходимости, дополнительных регуляторных элементов (включая, помимо прочего, терминатор) таким образом, чтобы каждый из регуляторных элементов мог выполнять свою целевую функцию, обеспечивая, модифицируя, облегчая или иным образом влияя на экспрессию последовательности указанной нуклеиновой кислоты. Например, контрольную последовательность помещают в соответствующее положение относительно кодирующей последовательности

полинуклеотидной последовательности таким образом, чтобы контрольная последовательность регулировала экспрессию кодирующей последовательности полипептида.

«Промотор» или «промоторная последовательность» представляет собой нуклеотидную последовательность, расположенную выше гена на той же нити, что и ген, который обеспечивает транскрипцию данного гена. За промотором обычно идет сайт начала транскрипции гена. Промотор распознается РНК-полимеразой (вместе с необходимыми факторами транскрипции), которая инициирует транскрипцию. Функциональный фрагмент или функциональный вариант промотора представляет собой нуклеотидную последовательность, которая распознается РНК-полимеразой и способна инициировать транскрипцию.

По тексту настоящей заявки термин «изолированная молекула ДНК» относится к молекуле ДНК, по меньшей мере, частично отделенной от других молекул, обычно связанных с ней в нативном или естественном состоянии. Термин «изолированный» предпочтительно обозначает молекулу ДНК, которая, по меньшей мере, частично отделена от некоторых нуклеиновых кислот, которые обычно фланкируют молекулу ДНК в ее нативном или естественном состоянии. Таким образом, молекулы ДНК, слитые с регуляторными или кодирующими последовательностями, с которыми они обычно не связаны, например, в результате рекомбинантных методов, по тексту настоящей заявки считаются изолированными. Такие молекулы считаются изолированными, когда они интегрированы в хромосому клетки-хозяина или присутствуют в растворе нуклеиновой кислоты вместе с другими молекулами ДНК, поскольку не находятся в нативном состоянии.

Для выделения и манипулирования полинуклеотидом или его фрагментом, как указано по тексту настоящей заявки, можно использовать любое количество способов, хорошо известных специалистам в данной области. Например, технология полимеразной цепной реакции (ПЦР) может использоваться для амплификации конкретной исходной полинуклеотидной молекулы и/или для получения вариантов исходной молекулы. Полинуклеотидные молекулы или их фрагменты также можно получить другими методами, например, путем прямого синтеза фрагмента химическими средствами, например, традиционным способом с использованием автоматического синтезатора олигонуклеотидов.

Полинуклеотид может быть одноцепочечным (оц) или двухцепочечным (дц). Термин «двухцепочечный» обозначает спаривание оснований, которое происходит между достаточно комплементарными, антипараллельными нитями нуклеиновой кислоты с образованием структуры двухцепочечной нуклеиновой кислоты, как правило, в физиологически значимых условиях. Варианты осуществления способа включают в себя те, при которых полинуклеотид представляет собой, по меньшей мере, один полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из смысловой одноцепочечной ДНК (оцДНК), смысловой одноцепочечной РНК (оцРНК), двухцепочечной РНК (дцРНК), двухцепочечной ДНК (дцДНК), гибрида двухцепочечной ДНК/РНК, антисмысловой оцДНК или антисмысловой оцРНК; также можно использовать смесь полинуклеотидов любого из указанных типов.

Используемый по тексту настоящей заявки термин «рекомбинантный», применительно к нуклеиновой кислоте или полипептиду, означает, что материал был изменен в результате применения человеком рекомбинантного метода, например, путем рестрикции и лигирования полинуклеотидов, перекрывания-удлинения полинуклеотидов или геномной вставки или трансформации. Открытая рамка считывания генной последовательности является рекомбинантной, если (а) данная нуклеотидная последовательность присутствует в контексте, отличном от естественного, например, в силу того что она (i) клонирована в любой тип вектора искусственной нуклеиновой кислоты или (ii) перемещена или скопирована в другое место исходного генома, либо если (b) нуклеотидная последовательность подвергается мутагенизации таким образом, что она отличается от последовательности дикого типа. Термин «рекомбинантный» также может относиться к организму, имеющему рекомбинантный материал, например, растение, которое содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, является рекомбинантным растением.

Термин «трансгенный» относится к организму, предпочтительно растению или его части, или нуклеиновой кислоте, которая содержит гетерологичный полинуклеотид. Предпочтительно гетерологичный полинуклеотид стабильно интегрирован в геном, таким образом, который обеспечивает передачу полинуклеотида следующим поколениям. Гетерологичный полинуклеотид может быть интегрирован в геном отдельно или являться частью рекомбинантной

экспрессионной кассеты. Термин «трансгенный» используется по тексту настоящей заявки для обозначения любой клетки, линии клеток, каллуса, ткани, части растения или растения, генотип которых был изменен присутствием гетерологичной нуклеиновой кислоты, включая указанные трансгенные организмы или клетки, первоначально измененные таким образом, как а также те, которые созданы путем скрещивания или бесполого размножения исходного трансгенного организма или клетки. «Рекомбинантный» организм предпочтительно представляет собой «трансгенный» организм. Термин «трансгенный», используемый по тексту настоящей заявки, не предусматривает изменение генома (хромосомного или внехромосомного) с помощью традиционных методов селекции растений (например, скрещивания) или в результате естественных событий, таких как, например, самооплодотворение, случайное перекрестное оплодотворение, нерекомбинантная вирусная инфекция, нерекомбинантная бактериальная трансформация, нерекомбинантная транспозиция или спонтанная мутация.

По тексту настоящей заявки термин «мутагенизированный» относится к организму или нуклеиновой кислоте, имеющим изменение(-я) в биомолекулярной последовательности своего нативного генетического материала по сравнению с последовательностью генетического материала соответствующего организма дикого типа или нуклеиновой кислоты, причем изменение(-я) в генетическом материале были индуцированы и/или селекционированы в результате действий человека. Примеры действий человека, которые могут быть использованы для получения мутагенизированного организма или ДНК, помимо прочего, включают в себя обработку химическим мутагеном, таким как ЭМС, и последующую селекцию гербицидом(-ами) или обработку растительных клеток рентгеновскими лучами и последующую селекцию гербицидом(-ами). Для индукции мутаций можно использовать любой метод, известный в данной области. Способы индукции мутаций могут вызывать мутации в случайных положениях генетического материала или мутации в определенных участках генетического материала (т.е. могут представлять собой методы направленного мутагенеза), например, с использованием генопластики. Помимо неспецифических мутаций, согласно изобретению, нуклеиновая кислота также может быть мутагенизирована с использованием средств мутагенеза с предпочтением или даже специфичностью

к определенному сайту, тем самым создавая искусственно индуцируемый наследуемый аллель по настоящему изобретению. Такие средства, например, сайт-специфические нуклеазы, включая, например, нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), мегануклеазы, эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALENs) (Malzahn et al., Cell Biosci, 2017, 7:21) и кластеризованные короткие палиндромные повторы с регулярными промежутками/CRISPR-ассоциированная нуклеаза (CRISPR/Cas) сконструированной Crispr-РНК/транс-активационной РНК (например, в виде одиночной направляющей РНК или модифицированных молекул Crispr-РНК и транс-активационной РНК, которые образуют двойную направляющую молекулу), при этом методы использования данных нуклеаз для воздействия на известные участки генома хорошо известны специалистам в данной области (см. обзорные работы Bortesi and Fischer, 2015, Biotechnology Advances 33: 41-52; и Chen and Gao, 2014, Plant Cell Rep 33: 575-583, и приведенные в них ссылки).

По тексту настоящей заявки «генетически модифицированный организм» (ГМО) представляет собой организм, чьи генетические характеристики включают в себя изменения, обусловленные действиями человека, вызывающими трансфекцию, которая приводит к трансформации целевого организма генетическим материалом из другого или «исходного» организма или синтетическим или модифицированным нативным генетическим материалом, или организмом, который является его потомком и сохраняет внедренный генетический материал. Исходный организм может принадлежать к другому типу организма (например, ГМО-растение может содержать бактериальный генетический материал) или относиться к тому же типу организма (например, ГМО-растение может содержать генетический материал другого растения).

По тексту настоящей заявки «дикий тип» или «соответствующее растение дикого типа» означает типичную форму организма или его генетический материал, в том виде, в котором он встречается в естественных условиях, в отличие, например, от мутагенизированных и/или рекомбинантных формы. Аналогичным образом, «контрольная клетка», «дикий тип», «контрольное растение, растительная ткань, растительная клетка или клетка-хозяин» обозначает растение, растительную ткань, растительную клетку или клетку-хозяин, в которых, соответственно, отсутствует конкретный полинуклеотид по

изобретению, предусмотренный настоящей заявкой. Таким образом, использование термина «дикий тип» не обозначает, что растение, растительная ткань, растительная клетка или другая клетка-хозяин не имеют рекомбинантной ДНК в своем геноме и/или не обладают характеристиками резистентности к грибам, отличными от тех, которые предусмотренный настоящей заявкой.

Используемый по тексту настоящей заявки термин «потомок» относится к любому растению следующего поколения. Потомство или растение-потомок может происходить из любого дочернего поколения, например, F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 и т.д. В некоторых вариантах осуществления растение-потомок или потомство представляет собой растение первого, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого или десятого поколения.

Термин «растение» используется по тексту настоящей заявки в самом широком смысле, поскольку обозначает органический материал и включает в себя эукариотические организмы, которые являются членами таксономического царства растений, примеры которых, помимо прочего, включают в себя однодольные и двудольные растения, сосудистые растения, овощи, зерновые, цветы, деревья, травы, кусты, виноградные лозы, папоротники, мхи, грибы и водоросли и т.д., а также клоны, отводки и части растений, используемые для бесполого размножения (например, черенки, отводки, побеги, корневища, подземные стебли, комки, кроны, луковицы, клубнелуковицы, клубни, корневища, растения/ткани, полученные в культуре тканей и т.д.). За исключением случаев, когда указано иное, термин «растение» обозначает целое растение, любую его часть или культуру клеток или тканей, полученную из растения, и состоящее любое из целых растений, компонентов или органов растения (например, листьев, стеблей, корней, и т.д.), растительных тканей, семян, растительных клеток и/или их потомства. Растительная клетка представляет собой биологическую клетку растения, взятую из растения или полученную посредством культуры из клетки, взятой из растения.

Изобретение, в частности, применимо к растениям, принадлежащим к надсемейству *зеленых растений*, в частности, к однодольным и двудольным растениям, включая кормовые или кормовые бобовые, декоративные растения, продовольственные культуры, деревья или кустарники, выбранные из списка, в который входят *Acer spp.*, *Actinidia spp.*, *Abelmoschus spp.*, *Agave sisalana*,

Agropyron spp., *Agrostis stolonifera*, *Allium* spp., *Amaranthus* spp., *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium graveolens*, *Arachis* spp., *Artocarpus* spp., *Asparagus officinalis*, *Avena* spp. (например, *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Vambusa* sp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsea*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (например, *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [канола, масличный рапс, репчатый рапс]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya* spp., *Carthamus tinctorius*, *Castanea* spp., *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum* spp., *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Colocasia esculenta*, *Cola* spp., *Corchorus* sp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp., *Crocus sativus*, *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp., *Cynara* spp., *Daucus carota*, *Desmodium* spp., *Dimocarpus longan*, *Dioscorea* spp., *Diospyros* spp., *Echinochloa* spp., *Elaeis* (например, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus* sp., *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus* sp., *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp., *Fagus* spp., *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp. (например, *Glycine max*, *Soja hispida* или *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus* spp. (например, *Helianthus annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp. (например, *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp., *Lactuca sativa*, *Lathyrus* spp., *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus* spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus* spp., *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon* spp. (например, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), *Macrotyloma* spp., *Malus* spp., *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus* spp., *Mentha* spp., *Miscanthus sinensis*, *Momordica* spp., *Morus nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp. (например, *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus* spp., *Phleum pratense*, *Phoenix* spp., *Phragmites australis*, *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp., *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Tagetes* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale rimpaii*,

Triticum spp. (например, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum*, *Triticum monococcum* или *Triticum vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp., амарант, артишок, спаржа, брокколи, брюссельская капуста, капуста, канола, морковь, цветная капуста, сельдерей, листовая капуста, лен, капуста, чечевица, рапс, бамия, лук, картофель, рис, соя, клубника, сахарная свекла, сахарный тростник, подсолнечник, помидоры, тыква, чай и водоросли и другие. Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения растение представляет собой культурное растение. Примеры сельскохозяйственных растений, помимо прочего, включают в себя сою, подсолнечник, канолу, люцерну, рапсовое семя, хлопок, томат, картофель и табак. Растение предпочтительно не принадлежит к таксономическому семейству *Solanaceae*, более предпочтительно не принадлежит к подсемейству *Solanoideae* (насленовые). Наиболее предпочтительно растение относится к роду *soja*, как описано по тексту настоящей заявки.

Согласно изобретению растение выращивают для получения растительного материала. Условия культивирования выбираются с учетом растения и могут, например, включать в себя выращивание в теплице, выращивание в поле, выращивание в гидрокультуре и гидропонное выращивание.

Растение, далее по тексту именуемое «растением с повышенной урожайностью», предпочтительно содержит ген *Pti5* и ген *SAR8.2*, предпочтительно каждый в своей собственной кассете экспрессии, как указано ниже. Неожиданно обнаружено, что указанные гены, объединенные в одной растительной клетке, могут обеспечивать повышение урожайности, предпочтительно даже супераддитивное повышение урожайности (по тексту настоящей заявки – «синергическое» повышение урожайности). Обратите внимание на то, что предпочтительно синергическое повышение урожайности происходит как в стандартных условиях роста, сформированных в соответствующем регионе полевого выращивания, так и в условиях роста при поражении патогенами, в частности, при преобладании грибковых патогенов в регионе, где растения выращиваются в полевых условиях. Согласно настоящему изобретению предпочтительно, чтобы давление патогена определялось в

соответствии со средней площадью пораженных листьев растений и предпочтительно выражалось в виде площади под кривой развития заболевания.

Ввиду того что растения выращиваются путем деления клеток, используемые по тексту настоящей заявки ссылки с указанием одного или более генов Pti5 и одного или более генов SAR8.2 и/или, по меньшей мере, одного гибридного гена Pti5-SAR8.2 (далее совместно именуемые «комбинацией Pti5-SAR8.2» или «стеком») во всех случаях также обозначают (1) одну или более клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую стек Pti5-SAR8.2, и (2) части растений, в частности, органы, предпочтительно листья таких растений, содержащие указанные клетки.

Растения, содержащие ген Pti5 или SAR8.2, были описаны ранее, помимо прочего, в заявках WO2013001435 и WO2014076614. Тем не менее, на основе указанных заявок нельзя сделать вывод о повышении урожайности. Вместо этого основное внимание уделяется обеспечению резистентности к грибам. Тем не менее, как указано по тексту настоящей заявки, резистентность к грибам автоматически не обозначает повышение урожайности. Таким образом, указанные документы содержат лишь общую техническую информацию, касающуюся некоторых растений, содержащих вышеупомянутые гены, но не подразумевают и даже не предполагают вероятность повышения урожайности, как это предусмотрено настоящим изобретением.

Для целей изобретения ген Pti5 кодирует белок, содержащий, среди прочего, домен *arpetala 2*, как описано в записи PFAM PF00847, и связывающийся с блоком Pti5 GCC, как описано в работе Gu et al. 2002 *The Plant Cell*, Vol. 14, 817–831. Предпочтительно ген Pti5 кодирует белок, аминокислотная последовательность которого, по меньшей мере, на 40%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 43%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 50%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 58%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 67%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 70%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 71% идентична SEQ ID NO. 1, причем идентичность последовательности SEQ ID NO. 1 предпочтительно не более 80%, более предпочтительно не более 79%. Таким образом, особенно предпочтительными являются растения, экспрессирующие ген Pti5, чья соответствующая полипептидная последовательность на 58-80% идентична

последовательности SEQ ID NO. 1, более предпочтительно на 67-79% идентична последовательности SEQ ID NO. 1. Следует понимать, что SEQ ID NO. 1 представляет собой искусственную аминокислотную последовательность, специально сконструированную в качестве матрицы для целей отжига аминокислотной последовательности. Таким образом, последовательность может быть использована для идентификации генов Pti5 независимо от того факта, что настоящей заявкой не предусмотрена активность Pti5 полипептида SEQ ID 1. Особенно предпочтительной в качестве гена Pti5 в способе или растении по настоящему изобретению является любая из аминокислотных последовательностей, определенных следующими идентификаторами Uniprot: PTI5_SOLLC, M1AQ94_SOLTU, A0A2G3A6U8_CAPAN, A0A2G2XEI7_CAPBA, A0A2G3D5K5_CAPCH, A0A1S4BF73_TOBAC, A0A1U7WC00_NICSY, A0A1S4A5G9_TOBAC, A0A1J6J1M1_NICAT, A0A1S2X9U7_CICAR, G7IFJ0_MEDTR, A0A2K3KXT4_TRIPR, V7BQ20_PHAVU, A0A1S3VIX3_VIGRR, A0A0L9VF85_PHAAN, A0A445GQU3_GLYSO, A0A0R0G4Q5_SOYBN, A0A061GM02_THECC, A0A445I8U7_GLYSO, A0A0D2S2G5_GOSRA, A0A4P1QVV4_LUPAN, A0A151SAR8.21_CAJCA, A0A2J6MBZ7_LACSA, A0A2K3LDZ4_TRIPR, A0A2U1QDE9_ARTAN, A0A444WYK6_ARAHY. Особенно предпочтительными согласно изобретению являются гены Pti5 и экспрессирующие их растения, которые кодируют полипептид, который, по меньшей мере, на 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 71%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 75%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 79%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 82%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 90%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 95% идентичен аминокислотной последовательности, заданной идентификатором Uniprot PTI5_SOLLC, и предпочтительно отличается от данной последовательности на 0-20 аминокислот, более предпочтительно на 1 - 15 аминокислот, еще более предпочтительно 1 - 10 аминокислот, еще более предпочтительно 1 - 5 аминокислот. Предпочтительно отклонения от последовательности белка Pti5 соответствуют ограничениям, указанным на Фиг. 8. Если последовательность Pti5 при выравнивании с последовательностью согласно идентификатору Uniprot PTI5_SOLLC длиннее, чем указанная последовательность, то каждое С- или N-концевое удлинение, предпочтительно не длиннее 10 аминокислот, более предпочтительно 0-5 аминокислот.

Для целей изобретения ген SAR8.2 кодирует белок, содержащий или состоящий из домена SAR8.2, как указано в записи PFAM PF03058. Предпочтительно ген SAR8.2 кодирует белок, аминокислотная последовательность которого содержит, по меньшей мере, на 35%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 45%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 55%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 72%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 77%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 82%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 84%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 86%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 88%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 89% идентична последовательности SEQ ID NO. 2, причем идентичность последовательности SEQ ID NO. 2 предпочтительно составляет не более 98%, более предпочтительно не более 95%. Таким образом, особенно предпочтительными являются растения, экспрессирующие ген SAR8.2, чья соответствующая полипептидная последовательность на 72 - 98% идентична последовательности SEQ ID NO. 2, более предпочтительно на 74-92% идентична последовательности SEQ ID NO. 2. Следует понимать, что SEQ ID NO. 2 представляет собой искусственную аминокислотную последовательность, специально сконструированную в качестве матрицы для отжига аминокислотной последовательности. Таким образом, последовательность может применяться для идентификации генов SAR8.2 независимо от того, что по тексту настоящей заявки не указано наличие гена SAR8.2 полипептида SEQ ID NO.2. Особенно предпочтительной в качестве гена SAR8.2 в способе или растении по настоящему изобретению является любая из аминокислотных последовательностей, определенная следующими идентификаторами Uniprot: Q8W2C1_CAPAN, Q9SEM2_CAPAN, A0A2G2X990_CAPBA, Q947G6_CAPAN, Q947G5_CAPAN, A0A2G2X9U8_CAPBA, A0A2G3CEJ1_CAPCH, A0A2G2X931_CAPBA, M1BEK3_SOLTU, A0A3Q7J4M2_SOLLC, A0A2G2ZTB6_CAPAN, A0A2G3CRF6_CAPCH, A0A2G2W296_CAPBA, A0A2G2WZ87_CAPBA, M1BIQ9_SOLTU, M1D489_SOLTU, M1D488_SOLTU, A0A2G2ZQ02_CAPAN, A0A1S4AM24_TOBAC, A0A1U7XJ42_NICSY, A0A1S4CJX7_TOBAC. Особенно предпочтительными согласно изобретению являются гены SAR8.2 и экспрессирующие их растения, которые кодируют полипептид, который, по меньшей мере, на 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 68%, более

предпочтительно, по меньшей мере, на 88%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 91%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 95% идентичен аминокислотной последовательности, заданной идентификатором Uniprot Q8W2C1_CAPAN, и предпочтительно отличается от указанной последовательности на 0 - 20 аминокислот, более предпочтительно на 1 - 15 аминокислот, еще более предпочтительно на 1 - 10 аминокислот, еще более предпочтительно на 1 - 5 аминокислот. Предпочтительно отклонения от последовательности белка Pti5 соответствуют ограничениям согласно Фиг. 9. Если последовательность SAR8.2 при выравнивании с последовательностью по идентификатору Uniprot Q8W2C1_CAPAN длиннее указанной последовательности, то каждое C- или N-концевое удлинение предпочтительно не превышает 10 аминокислот, более предпочтительно 0-5 аминокислот.

Предпочтительными согласно изобретению являются клетки, в частности, растительные клетки или растительная клетка, содержащая части растений или целые растения, которые содержат

а) ген, кодирующий полипептид, который, по меньшей мере, на 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 71%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 75%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 79%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 82%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 90%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 95% идентичен аминокислотной последовательности, заданной идентификатором Uniprot PTI5_SOLLC, и предпочтительно отличается от указанной последовательности на 0-20 аминокислот, более предпочтительно на 1 - 15 аминокислот, еще более предпочтительно на 1 - 10 аминокислот, еще более предпочтительно 1 - 5 аминокислот в соответствии с ограничениями, приведенными на Фиг. 8, а также

б) ген, кодирующий полипептид, который, по меньшей мере, на 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 68%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 88%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 91%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 95% идентичен указанной аминокислотной последовательности по идентификатору Uniprot Q8W2C1_CAPAN и предпочтительно отличается от данной последовательности на 0-20 аминокислот, более предпочтительно на 1 - 15 аминокислот, еще более

предпочтительно на 1 - 10 аминокислот, еще более предпочтительно на 1 - 5 аминокислот, согласно ограничениям, приведенным на Фиг. 9.

Еще более предпочтительными согласно изобретению являются клетки, в частности, растительные клетки или растительная клетка, содержащая части растений или целые растения, которые содержат

а) ген, кодирующий полипептид, который, по меньшей мере, на 79%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 82%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 90%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 95% идентичен аминокислотной последовательности, которая задана идентификатором Uniprot PTI5_SOLLС и предпочтительно отличается от данной последовательности на 0-20 аминокислот, более предпочтительно на 1 - 15 аминокислот, еще более предпочтительно на 1 - 10 аминокислот, еще более предпочтительно на 1 - 5 аминокислот, в соответствии с ограничениями, приведенными на Фиг. 8, и

б) ген, кодирующий полипептид, который, по меньшей мере, на 88%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 91%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 95% идентичен аминокислотной последовательности, заданной идентификатором Uniprot Q8W2C1_CAPAN, и предпочтительно отличается от данной последовательности на 0-20 аминокислоты, более предпочтительно 1 - 15 аминокислот, еще более предпочтительно 1 - 10 аминокислот, еще более предпочтительно на 1 - 5 аминокислот в соответствии с ограничениями, приведенными на Фиг.9.

Экспрессию белков Pti5 и SAR8.2 можно осуществлять в клетке путем транскрипции и трансляции гена Pti5 и гена SAR8.2, отделенного от гена Pti5, по меньшей мере, 1 стоп-кодоном. Гены Pti5 и SAR8.2 могут содержаться в одной экспрессионной кассете. Предпочтительно гены, кодирующие Pti5 и SAR8.2, содержатся в клетке в отдельных кассетах экспрессии, как описано по тексту настоящей заявки.

Кроме того, на экспрессию белков Pti5 и SAR8.2 можно влиять путем транскрипции и трансляции гибридного гена Pti5-SAR8.2, который кодирует гибридный белок Pti5-SAR8.2. В рамках такого гибридного белка участки, кодирующие фрагмент Pti5 и фрагмент SAR8.2, связаны линкерной последовательностью. Предпочтительно линкерная последовательность кодирует линкер из 1 - 30 аминокислот, более предпочтительно из 1 - 20 аминокислот.

Предпочтительно линкерная последовательность содержит сайт расщепления протеазой, действующий в рамках клетки. Таким образом, в процессе экспрессии гибридного гена в клетках растения по настоящему изобретению пре-белок, образующийся в результате транскрипции и трансляции гибридного гена, расщепляется с высвобождением зрелого белка Pti5 и зрелого белка SAR8.2. В случае такого гибридного белка описанную выше степень идентичности последовательностей определяют на основе зрелых белков Pti5 и SAR8.2 соответственно. В гибридном белке последовательность фрагментов Pti5 и SAR8.2 на соответствующей мРНК особых вопросов не вызывает. Таким образом, гибридный белок может содержать в направлении C-N, фрагмент Pti5, примыкающий к линкеру, примыкающему к фрагменту SAR8.2, или, в направлении C-N, примыкающий к фрагменту SAR8.2. линкер, примыкающий к фрагменту Pti5. Поскольку способ генерации белков Pti5 и SAR8.2 не имеет значения, все отсылки в соответствии с изобретением на комбинацию генов или белков Pti5 и SAR8.2 косвенно также включают в себя гибридный ген Pti5-SAR8.2, а отсылки на набор белков Pti5 и SAR8.2 также косвенно включают в себя набор зрелых белков Pti5 и SAR8.2, полученных в результате расщепления гибридного белка Pti5-SAR8.2.

Согласно настоящему изобретению клетка, часть растения или растение предпочтительно содержат кассету экспрессии гена Pti5 и кассету экспрессии гена SAR8.2. Согласно изобретению кассета экспрессии содержит соответствующий ген (или гибридный ген), а также контрольные последовательности, необходимые для экспрессии гена. Предпочтительно кассета экспрессии содержит, по меньшей мере, промотор и функционально связанный с ним соответствующий ген, выбранный из Pti5 и SAR8.2. Более предпочтительно, кассета экспрессии также содержит терминатор в 3'-направлении ниже соответствующего гена. Типичные кассеты экспрессии для отдельных генов Pti5 и SAR8.2 описаны, например, в указанных выше документах WO2013001435 и WO2014076614, в частности, речь идет о кассетах, содержащих последовательности SEQ ID NO. 6 и 3 соответственно. Эти кассеты экспрессии и соответствующее описание включены в текст настоящей заявки посредством ссылки.

Каждая из кассет экспрессии Pti5 и SAR8.2 предпочтительно представляет собой гетерологичную кассету экспрессии. Согласно изобретению

экспрессионная кассета является «гетерологичной», если выполняется одно или несколько из следующих условий: (1) Ген кодирует полипептид (Pti5 или SAR8.2 соответственно) с последовательностью, отличной от последовательности растения дикого типа; (2) ген контролируется промотором, отсутствующим в растении дикого типа или не связанным с геном в растении дикого типа; (3) экспрессионная кассета интегрирована в другом локусе генома растения по сравнению с растением дикого типа, причем экспрессионная кассета дикого типа может находиться в инактивированной форме, или гетерологично интегрированная экспрессионная кассета дополняет экспрессирующую кассету дикого типа. Таким образом, растения повышения урожайности, используемые согласно настоящему изобретению, предпочтительно представляют собой трансгенные растения. Кроме того, способы согласно настоящему изобретению предпочтительно исключают растения, полученные посредством существенно биологического процесса, например, путем скрещивания гамет, которое встречается в природе. Для такого предпочтительного исключения отсутствуют технические причины, при этом оно предназначено исключительно для получения основы для изменения формулы изобретения в тех странах, где исключение является обязательным. Тем не менее, предпочтительно не исключаются растения, полученные путем скрещивания и селекции, по меньшей мере, одного трансгенного растения и другого растения, при условии, что потомство содержит как гены Pti5, так и SAR8.2 (и/или гибридный ген Pti5-SAR8.2), при этом предпочтительно ген Pti5 или SAR8.2 присутствует у потомства в форме гетерологичной экспрессионной кассеты, независимо от того, содержит ли потомство также экспрессионную кассету Pti5 или SAR8.2 дикого типа. Наиболее предпочтительно потомство содержит гетерологичный Pti5 и гетерологичную экспрессионную кассету SAR8.2 и еще более предпочтительно не содержит ген Pti5 и SAR8.2 дикого типа.

Согласно настоящему изобретению клетка, часть растения или растение предпочтительно содержат кассету экспрессии Pti5 дикого типа и гетерологичную кассету экспрессии SAR8.2, независимо от присутствия кассеты экспрессии SAR8.2 дикого типа. При необходимости, но также предпочтительно, растение содержит кассету экспрессии SAR8.2 дикого типа и гетерологичную кассету экспрессии Pti5 независимо от присутствия кассеты экспрессии Pti5 дикого типа.

Более предпочтительно, растение содержит кассету экспрессии Pti5 дикого типа и кассету экспрессии гетерологичного SAR8.2 и лишено функциональной кассеты экспрессии SAR8.2 дикого типа, или растение содержит кассету экспрессии SAR8.2 дикого типа и кассету экспрессии гетерологичного Pti5 и лишено функциональной кассеты экспрессии Pti5 дикого типа. Еще более предпочтительно, когда растение содержит гетерологичную экспрессионную кассету Pti5 и гетерологичную экспрессионную кассету SAR8.2, независимо от наличия экспрессионной кассеты Pti5 дикого типа, а также независимо от наличия экспрессионной кассеты SAR8.2 дикого типа. Наиболее предпочтительно растение содержит (1) гетерологичную экспрессионную кассету Pti5 и гетерологичную экспрессионную кассету SAR8.2 и/или (2) кассету экспрессии гибридного гена Pti5-SAR8.2 и не имеет как функциональной кассеты экспрессии Pti5 дикого типа, так и функциональной кассеты экспрессии SAR8.2 дикого типа.

Гетерологичная экспрессионная кассета слияния Pti5, SAR8.2 или Pti5-SAR8.2, соответственно, может быть введена в растительную клетку с использованием вектора, содержащего только одну из вышеупомянутых экспрессионных кассет, две из вышеупомянутых экспрессионных кассет или даже три из вышеупомянутых экспрессионных кассет. Предпочтительно вектор содержит 1 кассету экспрессии для экспрессии белка Pti5 и 1 кассету экспрессии для экспрессии гена SAR8.2. Предпочтительно белки Pti5 и SAR8.2 кодируются отдельными кассетами экспрессии. Когда указанные отдельные кассеты экспрессии расположены на одном векторе, они имеют ориентацию «голова-хвост», «голова-голова» или «хвост-хвост».

Гетерологичные кассеты экспрессии Pti5 и SAR8.2 также можно вводить путем трансформации растительной клетки с использованием двух отдельных векторов, при этом один вектор не содержит кассету экспрессии SAR8.2, а другой вектор не содержит кассету экспрессии Pti5. Трансформация отдельными векторами может осуществляться путем котрансформации или супертрансформации. При совместной трансформации оба гена будут расположены на двух разных Т-ДНК либо в одном, либо в разных штаммах агробактерий, которые используются для трансформации. В случае с супертрансформацией растительная клетка, уже содержащая один из генов, впоследствии трансформируется вторым геном.

Растительные клетки, способные экспрессировать как Pti5, так и SAR8.2, также можно получить путем скрещивания родительских растений, при этом одно родительское растение содержит, по меньшей мере, кассету экспрессии Pti5, а другое родительское растение содержит, по меньшей мере, кассету экспрессии SAR8.2, и селекции потомства таких клеток, содержащего как экспрессионную кассету Pti5, так и SAR8.2. Полученное поколение F1 будет содержать оба гена гемизиготно. Дальнейшее самоопыление приведет к появлению растений, содержащих обе экспрессионные кассеты гомозиготно и, соответственно, они будут зафиксированы для следующих поколений.

Согласно изобретению растения – гибридные, гомозиготные, гетерозиготные или гемизиготные по гену Pti5 и SAR8.2 или гибриднему гену как таковому – выращивают в соответствующих условиях. Выращивание растений согласно настоящему изобретению приводит к повышению урожайности, в частности, в условиях выращивания в поле, в отличие от тепличных условий. Как видно из примеров, особенно обращает на себя внимание тот факт, что повышение урожайности может быть достигнуто синергическим, супераддитивным путем под воздействием патогенов даже при минимальной обработке пестицидами или без таковой. Особым преимуществом настоящего изобретения является то, что растения можно выращивать с использованием любого из применимых методов выращивания, известных специалистам в данной области. Таким образом, изобретением преимущественно предусмотрены способы, применимые в самых разнообразных условиях выращивания, включая полевые и тепличные условия. Таким образом, использование комбинации генов Pti5 и SAR8.2 для повышения урожайности в любых условиях воздействия патогенов является неожиданно универсальным.

Согласно изобретению урожайность предпочтительно представляет собой один или более следующих параметров:

- биомасса на единицу посевной площади,
- масса зерна на единицу посевной площади,
- масса семян на единицу посевной площади,

при этом последний вариант является наиболее предпочтительным с точки зрения определения урожайности.

По тексту настоящей заявки термин «урожайность» обозначает количество сельскохозяйственной продукции, собранной с единицы площади. Урожайность может представлять собой общую биомассу на единицу площади, общую массу зерна на единицу и общую массу семян на единицу площади. Урожайность измеряется в любых единицах, например, в метрических тоннах на гектар или бушелях на акр. Урожайность корректируется с учетом влажности собранного материала, при этом влажность измеряют соответственно в собранной биомассе, зерне или семенах в процессе сбора урожая. Например, влажность семян сои предпочтительно составляет 15%.

Как указано выше, повышение урожайности определяют по сравнению с урожайностью, полученной для контрольного растения. Контрольное растение представляет собой растение, лишённое указанных выше кассет экспрессии, при этом в остальном культивируемое в аналогичных условиях. Повышение урожайности определяется на основе урожайности «растения с повышенной урожайностью», содержащего указанные гетерологичные кассеты экспрессии, по сравнению с контрольным растением того же вида или, в соответствующих случаях, сорта, причем контрольное растение не содержит указанную гетерологичную кассету экспрессии.

Следует понимать, что в случаях, когда приводится ссылка на урожайность, выращивание или культивацию или обработку «растения», предпочтительно не определяют урожайность или обработку одного растения по сравнению с одним контрольным растением. Вместо этого урожайность определяют на основе урожайности, полученной от множества растений, предпочтительно множества из, по меньшей мере, 1000 растений, предпочтительно, когда растения выращивают на полевых или, менее предпочтительно, в тепличных условиях. Наиболее предпочтительно урожайность определяют для поля монокультуры растения площадью, по меньшей мере, 1 га и поля монокультуры контрольного растения площадью, по меньшей мере, 1 га соответственно. Соответственно, обработка предпочтительно выполняется на указанном множестве растений. Особым преимуществом является то, что использование комбинации, по меньшей мере, одного гена Pti5 и, по меньшей мере, одного гена SAR8.2 позволяет обеспечить повышение урожайности по сравнению с нетрансгенным контрольным растением дикого типа, по меньшей

мере, на 10%. Более предпочтительно, повышение урожайности является синергическим, то есть превышает дополнительные изменения урожайности, вызванные индивидуально генами Pti5 и SAR8.2, при этом изменение урожайности (предпочтительно массы семян), обусловленное каждым из генов Pti5 и SAR8.2, измеряется в сравнении с соответствующим контрольным растением без соответствующей кассеты экспрессии Pti5 или SAR8.2. Особым преимуществом настоящего изобретения, которое также продемонстрировано, в частности, в приведенных ниже примерах, является то, что повышение урожайности, по меньшей мере, на 10%, более предпочтительно синергетическое увеличение урожайности, можно получить даже без обработки пестицидами, предпочтительно без обработки фунгицидами, но также и без обработки пестицидами, если растения периодически обрабатывают одним или более пестицидами, предпочтительно одним или более фунгицидами, в течение сезона роста от момента посева до сбора урожая.

Ввиду вышеуказанных преимуществ изобретением также предусмотрен способ культивации для повышения урожайности растения по сравнению с контрольным растением, включающий культивацию растения, содержащего ген Pti5 и SAR8.2, при этом в процессе выращивания растения количество обработок пестицидами за сезон роста снижается, по меньшей мере, на одну по сравнению с контрольным растением, предпочтительно, по меньшей мере, на две. Предпочтительно способ культивации включает в себя выращивание растения, (a) которое обеспечивает гиперэкспрессию Pti5 и SAR8.2, и/или (b) содержит гетерологичную экспрессионную кассету Pti5 и/или гетерологичную экспрессионную кассету SAR8.2, и/или (c) экспрессирует гетерологичный Pti5 и /или гетерологичный ген SAR8.2 и/или (d) экспрессирует гибридный ген Pti5-SAR8.2. Схемы обработки пестицидами обычно распространены в стандартной сельскохозяйственной практике каждого региона, в котором выращивают растения. Например, в Бразилии традиционно проводят первую обработку фунгицидами растений сои на 8-й день после посева, а вторую обработку – на 18-й день после посева. В других регионах такая схема может применяться не только в зависимости от времени роста, но и, например, с учетом регистрации первых признаков появления вредного организма или прохождения порога заболеваемости. Особым и неожиданным преимуществом настоящего

изобретения является то, что количество обработок пестицидами за сезон выращивания по сравнению с контрольным растением может быть уменьшено. Особенно неожиданно, что такое сокращение количества обработок возможно не только без снижения урожайности; способ культивации по изобретению позволяет преимущественно поддерживать или даже увеличивать урожайность, несмотря на сокращение количества обработок. Это значительно повышает экономическую эффективность выращивания растений, предусмотренных настоящим изобретением. Таким образом, изобретением предусмотрены способы культивации или способы повышения урожайности, описанные по тексту настоящей заявки, причем предпочтительно проводят не более двух обработок фунгицидами в течение вегетационного периода, то есть в течение периода времени между посевом и сбором урожая, более предпочтительно в течение вегетационного периода проводят не более одной обработки фунгицидами. В соответствующих условиях способы не включают в себя обработку фунгицидами в вегетационный период. Очевидно, что пестицид предпочтительно применяют в пестицидно эффективных количествах.

Согласно изобретению способы, указанные по тексту настоящей заявки, предпочтительно обеспечивают повышенную урожайность по сравнению с контрольным растением в отсутствие или, что более предпочтительно, в присутствии патогена (также по тексту настоящей заявки именуемого «вредителем»). Особым преимуществом является то, что повышение урожайности согласно изобретению может обеспечиваться не только в определенном разнообразии климатических условий, являющихся благоприятными для культивации растений; повышение урожайности согласно изобретению также последовательно прослеживалось в большинстве условий. Таким образом, согласно изобретению признак «повышение урожайности» является чрезвычайно устойчивым в условиях стресса, вызванного вредителями. Согласно изобретению, факторы стресса, отличные от стресса, вызванного вредителями, предпочтительно устраняются с помощью общепринятых технологий культивации. Например, стресс в виде азотного голодания предпочтительно устраняется при помощи удобрений, а стресс в виде ограниченной доступности воды предпочтительно смягчается поливом.

Согласно изобретению вредитель предпочтительно представляет собой или, по меньшей мере, содержит грибковый вредитель, предпочтительно биотрофный или геминкротрофный гриб, более предпочтительно ржавчинный гриб. Если в процессе культивации растение также находится под угрозой стресса со стороны других возбудителей, например, нематод и насекомых, с такими другими вредителями предпочтительно борются с помощью соответствующих обработок пестицидами. Таким образом, согласно изобретению предпочтительно количество обработок фунгицидами уменьшают, как описано выше, независимо от других обработок пестицидами. Фунгицид предпочтительно применяют в фунгицидно эффективных количествах. Фунгицид можно смешивать с другими пестицидами и ингредиентами, предпочтительно выбранными из числа инсектицидов, нематицидов и акарицидов, гербицидов, регуляторов роста растений, удобрений. Предпочтительными совместимыми составами для смешивания являются инсектициды, нематициды и фунгициды. Особенно предпочтительно в процессе культивации растения сократить количество обработок фунгицидами в течение вегетационного периода, по меньшей мере, на одну по сравнению с контрольным растением, предпочтительно, по меньшей мере, на две. Фунгициды могут включать в себя 2-(тиоцианатометилтио)бензотиазол, 2-фенилфенол, 8-гидроксихинолинсульфат, аметоктрадин, амисулбром, антимицин, *Ampelomyces quisqualis*, азаконазол, азоксистробин, *Bacillus subtilis*, штамм *Bacillus subtilis* QST713, беналаксил, беномил, бентиаваликарб-изопропил, бензиламинобензен - сульфатную (BABS) соль, бикарбонаты, бифенил, бисмертиазол, битертанол, биксафен, бластицидин-S, бура, бордосскую смесь, боскалид, бромуконазол, бупиримат, полисульфид кальция, каптафол, каптан, карбендазим, карбоксин, карпропамид, карвон, хрзафенон, хлоронеб, хлороталонил, хлзолинат, *Coniothyrium minitans*, гидроксид меди, октаноат меди, оксихлорид меди, сульфат меди, сульфат меди (трехосновный), оксид меди, циазофамид, цифлуфенамид, цимоксанил, ципроконазол, ципродинил, дазамет, дебакарб, диаммоний этиленбис-(дитиокарбамат), дихлофлуанид, дихлорфен, диклоцимет, дикломезин, дихлоран, дитофенкарб, дифеноконазол, дифензокват-ион, дифлуметорим, диметоморф, димоксистробин, диниконазол, диниконазол-М, динобутон, динокап, дифениламин, дитианон, додеморф, додеморф ацетат, додин, свободное основание додина, эдифенфос, энстробин, энстробуриин, эпоксиконазол,

этабоксам, этоксихин, этридиазол, фамоксадон, фенамидон, фенаримол, фенбуконазол, фенфурам, фенгексамид, феноксанил, фенпиклонил, фенпропидин, фенпропиморф, фенпиразамин, фентин, ацетат фентина, гидроксид фентина, фербам, феримзон, флуазинам, грипп диоксонил, флуиндапир, флуморф, флуопиколид, флуопирам, фторимид, флуоксастробин, флухинконазол, флузилазол, флусульфамид, флутианил, флутоланил, флутриафол, флюксапироксад, фолпет, формальдегид, фосетил, фосетилалюминий, фуберидазол, фуралаксил, фураметпир, гуазатин, ацетаты гуазатина, GY-81, гексахлорбензол, гексаконазол, гимексазол, имазалил, имазалил сульфат, имибенконазол, иминоктадин, иминоктадина триацетат, иминоктадин трис (альбезилат), йодокарб, ипконазол, ипфенпиразолон, ипробенфос, ипродион, ипроваликарб, изопротиолан, изофетамид, изопиразам, изотианил, касугамицин, гидрат гидрохлорида касугамицина, крезоксим-метил, ламинарин, манмедь, манкоцеб, мандипропамид, манеб, мефеноксам, мепанипирим, мепронил, мептилдинокап, хлорид ртути, оксид ртути, хлорид ртути, металаксил, металаксил-М, метам, метаммоний, метам-калий, метам-натрий, метконазол, метасульфоккарб, метилйодид, метилизотиоцианат, метирам, метоминостробин, метрофенон, милдиомицин, миклобутанил, набам, нитротал-изопротил, нуаримол, октилинон, офураце, олеиновую кислоту (жирные кислоты), оризастробин, оксадилсил, оксатиапипролин, оксин -медь, окспоконазол фумарат, оксикарбоксин, пефуразоат, пенконазол, пенцикурон, пенфлуфен, пентахлорфенол, пентахлорфенил лаурат, пентиопирад, ацетат фенилртути, фосфоновую кислоту, фталид, пикоксистробин, полиоксин В, полиоксины, полиоксорим, бикарбонат калия, гидроксихинолинсульфат калия, пробеназол, прохлораз, процимидон, пропамокарб, пропамокарб гидрохлорид, пропиконазол, пропинеб, проквиназид, пидифлуметофен, протиокконазол, пиракlostробин, пираметостробин, пираоксиостробин, пиразифлумид, пиразофос, пирибенкарб, пирибутикарб, пирифенокс, пириметанил, пириофенон, пироквилон, хинокламин, хиноксифен, квинтозен, экстракт рейнтурии сахалинской, седаксан, силтиофам, симеконазол, 2-фенилфеноксид натрия, бикарбонат натрия, пентахлорфеноксид натрия, спироksamин, серу, SYP-Z048, дегтярные масла, тебуконазол, тебуфлохин, текназен, тетраконазол, тиабендазол, тифлузамид, тиофанат-метил, тирам, тиадинил, толклофос- метил, толилфлуанид, триадимефон, триадименол, триазоксид, трициклазол, тридеморф, трифлуксистробин, трифлумизол,

трифорин, тритиконазол, валидамицин, валифеналат, валифенал, винклозолин, зинеб, зирам, зоксамид, *Candida oleophila*, *Fusarium oxysporum*, *Gliocladium* spp., *Phlebiopsis gigantea*, стрептомицеты *griseoviridis*, *Trichoderma* spp., (RS)-N-(3,5-дихлорфенил)-2-(метоксиметил)-сукцинимид, 1,2-дихлорпропан, гидрат 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетрафторацетона, 1-хлор-2,4-динитронафталин, 1-хлор-2-нитропропан, 2-(2-гептадецил-2-имидазолин-1-ил)этанол, 2,3-дигидро-5-фенил-1,4- дитиин 1,1,4,4-тетраоксид, 2-метоксиэтилацетат ртути, 2-метоксиэтилхлорид ртути, 2-метоксиэтилсиликат ртути, 3-(4-хлорфенил)-5-метилроданин, 4-(2-нитропроп-1-енил))фенилтиоцианатем, аминопирифен, ампропилфос, анилазин, азитирам, полисульфид бария, Bayer 32394, беноданил, бенхинокс, бенталурон, бензамакрил; бензамакрил-изобутил, бензаморф, бензовиндифлупир, бинапакрил, сульфат бис(метилртути), оксид бис(трибутилолова), бутиобат, сульфат хромата кадмия, кальция, меди и цинка, карбаморф, СЕСА, хлобентиазон, хлораниформетан, хлорфеназол, хлорхинокс, климбазол, бис(3- меди) фенилсалицилат), хромат меди-цинка, кумоксистеробин, куфранеб, сульфат меди-гидразиния, купробам, циклафурамид, ципендазол, ципрофурам, декафентин, дихлобентиазокс, диклон, дихлозолин, диклобутразол, диметиримол, диноктон, диноссульфон, динотербон, дипиметитрон, дипиритион, диталимфос, додицин, дразоксолон, ЕВР, эноксастробин, ЕSBP, этаконазол, этем, этирим, фенаминосульф, фенаминстробин, фенапанил, фенитропан, фенпиоксамид, флуиндапир, флуопимид, флуотримазол, флуфеноксистеробин, фуркарбанил, фурконазол, фурконазол-цис, фурмециклокс, фуорофанат, глиодин, гризеофульвин, галакринат, геркулес 3 944, гексилтиофос, ICIA0858, инпирфлуксам, ипфентрифлуконазол, ипфлуфенохин, изофетамид, изофлюципрам, изопамфос, изоваледион, мандестробин, мебенил, мекарбинзид, мефентрифлуконазол, метазоксолон, метфуроксам, метилртутидициандиамид, метсульфовакс, метилтетрапрол, милнеб, мукохлорный ангидрид, миклозолин, Н-3, 5-дихлорфенилсукцинимид, N-3-нитрофенилтаконимид, натамицин, N-этилртуть-4-толуолсульфонанилид, бис(диметилдитиокарбамат) никеля, ОСН, оксатиапипролин, диметилдитиокарбамат фенилртути, нитрат фенилртути, фосдифен, пикарбутразокс, протиокарб; протиокарба гидрохлорид, пидифлуметофен, пиракарболид, пирапропоин, пиразифлумид, пиридахлометил, пиридинитрил, пиризоксазол, пироксихлор, пироксифур, хинацетол, хинацетолсульфат, хиназамид, хинконазол, хинофумелин, рабензизол,

салициланилид, SSF-109, сультропен, текорам, тиадифтор, тициофен, тиохлорфенфим, тиофанат, тиохинокс, тиоксимид, триамифос, триаримол, триазбутил, трихламид, триклопирикарб, трифлумезопирим, урбацид, зариламид и их комбинации.

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

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

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

Phakopsora ampelopsidis, Phakopsora apoda, Phakopsora argentinensis, Phakopsora cherimoliae, Phakopsora cingens, Phakopsora coca, Phakopsora crotonis,

Phakopsora *euvitis*, *Phakopsora* *gossypii*, *Phakopsora* *hornotina*, *Phakopsora* *jatrophiicola*, *Phakopsora* *meibomiae*, *Phakopsora* *meliosmae*, *Phakopsora* *meliosmaemyrianthae*, *Phakopsora* *montana*, *Phakopsora* *muscadinae*, *Phakopsora* *myrtacearum*, *Phakopsora* *nishidana*, *Phakopsora* *orientalis*, *Phakopsora* *pachyrhizi*, *Phakopsora* *phyllanthi*, *Phakopsora* *tecta*, *Phakopsora* *uva*, *Phakopsora* *vitis*, *Phakopsora* *ziziphivulgaris*,

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

septentrionalis, *Puccinia setariae*, *Puccinia silvatica*, *Puccinia stipina*, *Puccinia stobaeae*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia striiformoides*, *Puccinia stylidii*, *Puccinia substriata*, *Puccinia suzutake*, *Puccinia taeniatheri*, *Puccinia tageticola*, *Puccinia tanacetii*, *Puccinia tatarinovii*, *Puccinia tetragoniae*, *Puccinia thaliae*, *Puccinia thlaspeos*, *Puccinia tillandsiae*, *Puccinia tiritea*, *Puccinia tokyensis*, *Puccinia trebouxii*, *Puccinia triticina*, *Puccinia tubulosa*, *Puccinia tulipae*, *Puccinia tumidipes*, *Puccinia turgida*, *Puccinia urticae-acutae*, *Puccinia urticae-acutiformis*, *Puccinia urticae-caricis*, *Puccinia urticae-hirtae*, *Puccinia urticae-inflatae*, *Puccinia urticata*, *Puccinia vaginatae*, *Puccinia virgata*, *Puccinia xanthii*, *Puccinia xanthosiae*, *Puccinia zoysiae*,

более предпочтительно видов *Phakopsora pachyrhizi*, *Puccinia graminis*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia hordei* или *Puccinia recondita*,

более предпочтительно рода *Phakopsora* и наиболее предпочтительно *Phakopsora pachyrhizi*. Как указывалось выше, грибы указанных таксонов ответственны за серьезные потери урожая сельскохозяйственных культур. В частности, это касается ржавчинных грибов рода *Phakopsora*. Таким образом, преимуществом настоящего изобретения является то, что способ позволяет уменьшить количество обработок фунгицидами против *Phakopsora pachyrhizi*, как описано по тексту настоящей заявки.

Согласно изобретению предпочтительно, чтобы растение представляло собой культурное растение, предпочтительно двудольное, более предпочтительно не принадлежащее к подсемейству *Solanoideae*, более предпочтительно не принадлежащее к семейству *Solanaceae*, более предпочтительно растение отряда *Fabales*, более предпочтительно растение семейства *Fabaceae*, более предпочтительно растение трибы *Phaseoleae*, более предпочтительно рода *Amphicarpeae*, *Cajanus*, *Canavalia*, *Dioclea*, *Erythrina*, *Glycine*, *Arachis*, *Lathyrus*, *Lens*, *Pisum*, *Vicia*, *Vigna*, *Phaseolus* или *Psophocarpus*, еще более предпочтительно видов *Amphicarpeae bracteata*, *Cajanus cajan*, *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia ensiformis*, *Canavalia gladiata*, *Dioclea grandiflora*, *Erythrina latissima*, *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus maculatus*, *Psophocarpus tetragonolobus*, *Vigna angularis*, *Vigna mungo*, *Vigna unguiculata*, *Glycine albicans*, *Glycine aphyonota*, *Glycine arenaria*, *Glycine argyrea*, *Glycine canescens*, *Glycine clandestina*, *Glycine curvata*, *Glycine cyrtoloba*, *Glycine dolichocarpa*, *Glycine falcata*, *Glycine gracei*, *Glycine hirticaulis*, *Glycine lactovirens*, *Glycine latifolia*, *Glycine latrobeana*,

Glycine microphylla, *Glycine peratosa*, *Glycine pindanica*, *Glycine pullenii*, *Glycine rubiginosa*, *Glycine stenophita*, *Glycine syndetika*, *Glycine tabacina*, *Glycine tomentella*, *Glycine gracilis*, *Glycine max*, *Glycine max* x *Glycine soja*, *Glycine soja*, более предпочтительно видов *Glycine gracilis*, *Glycine max*, *Glycine max* x *Glycine soja*, *Glycine soja*, наиболее предпочтительно видов *Glycine max*. Как указано по тексту настоящей заявки, особенно хорошее повышение урожайности получено в случае с соей.

Помимо гетерологичной экспрессионной кассеты культивируемое растение один или более дополнительных гетерологичных элементов. Например, к трансгенным объектам сои, содержащим гены устойчивости к гербицидам, например, помимо прочего относятся GTS 40-3-2, MON87705, MON87708, MON87712, MON87769, MON89788, A2704-12, A2704-21, A5547-127, A5547-35, DP356043, DAS44406-6, DAS68416-4, DAS-81419-2, GU262, SYHT0H2, W62, W98, FG72 и CV127; к трансгенным объектам сои, содержащим гены инсектицидных белков, например, помимо прочего относятся MON87701, MON87751 и DAS-81419. Культурные растения с модифицированным содержанием масла были получены с использованием трансгенов: gm-fad2-1, Pj.D6D, Nc.Fad3, fad2-1A и fatb1-A. Примерами объектов сои, содержащих, по меньшей мере, один из таких генов, являются: 260-05, MON87705 и MON87769. Специалистам в данной области хорошо известны растения, обладающие такими единичными или комплексными признаками, а также гены и объекты, обеспечивающие такие признаки. Например, подробная информация о мутагенизированных или интегрированных генах и соответствующих событиях доступна на веб-сайтах Международной службы по сбору сведений о применении биотехнологий в сельском хозяйстве (<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase>) и Центра оценки экологических рисков (<http://cera-qmc.org/GMCropDatabase>). Дополнительную информацию о конкретных объектах и способах их обнаружения можно найти в разделе по объектам сои H7-1, MON89788, A2704-12, A5547-127, DP305423, DP356043, MON87701, MON87769, CV127, MON87705, DAS68416-4, MON87708, MON87712, SYHT0H2, DAS81419, DAS81419 x DAS44406-6, MON87751 в WO04/074492, W006/130436, W006/108674, W006/108675, W008/054747, W008/002872, W009/064652, W009/102873,

W010/080829, W010/037016, W011/066384, W011/034704, W012/051199, W012/082548, W013/016527, W013/016516, W014/201235.

Гетерологичная кассета экспрессии согласно изобретению предпочтительно содержит соответствующий ген Pti5 и/или SAR8.2 или гибридный ген Pti5-SAR8.2, функционально связанный с

- a) конститутивно активным промотором,
- b) тканеспецифическим или тканепредпочтительным промотором,
- c) промотором, индуцируемым воздействием на растение вредителя, предпочтительно грибкового вредителя.

Конститутивно активный промотор обеспечивает экспрессию гена Pti5 или SAR8.2 в растении преимущественно в любых обстоятельствах и условиях окружающей среды и преимущественно на всех стадиях развития растения (например, в зародыше, зрелом растении или во время цветения. Промотор может привести к повсеместной или тканеспецифичной экспрессии соответственно гена Pti5 или SAR8.2. Повсеместная экспрессия означает, что рассматриваемый ген экспрессируется преимущественно во всех тканях растения (таких как корень, стебель, лист или цветок). Промотор с тканевой специфичностью или предпочтительностью обеспечивает такую базальную экспрессию только или преимущественно в соответствующей ткани. А индуцибельный промотор позволяет быстро активировать экспрессию при воздействии на растение вредителя, тем самым обеспечивая быструю реакцию. Наиболее предпочтительно растение в способе по настоящему изобретению содержит ген Pti5 и/или SAR8.2 в двух копиях, причем одна копия контролируется конститутивно активным промотором, тканеспецифического или тканепредпочтительного промотора, а другая копия контролируется индуцибельным промотором, предпочтительно промотором, индуцируемым воздействием грибкового патогена, наиболее предпочтительно *Phakopsora pachyrhizi*. Таким образом, обеспечивается сравнительно низкая базальная экспрессия гена, что позволяет сохранить метаболические ресурсы, в то время как при необходимости усиливается защита от значительного воздействия вредителей, тем самым обеспечивая потребление метаболических ресурсов для экспрессии гена, главным образом, в условиях значительного стресса.

Изобретением также предусмотрен способ получения гибридного растения с повышенной урожайностью по сравнению с контрольным растением, включающий:

- i) получение
 - i-a) первого растительного материала, содержащего ген Pti5 и ген SAR8.2, предпочтительно содержащий гетерологичную экспрессионную кассету Pti5 и гетерологичную экспрессионную кассету SAR8.2, и второго растительного материала, не содержащего ни ген Pti5, ни ген SAR8.2, либо
 - i-b) первого растительного материала, содержащего ген Pti5, предпочтительно содержащий гетерологичную экспрессионную кассету Pti5, и второго растительного материала, содержащего ген SAR8.2, предпочтительно содержащий гетерологичную экспрессионную кассету SAR8.2,
- ii) получение поколения F1 от скрещивания первого и второго растительного материала, а также
- iii) селекцию одного или более представителей поколения F1, которое содержит указанную гетерологичную экспрессионную кассету.

Как описано по тексту настоящей заявки, такие гибриды позволяют реализовать преимущества, которые дают растения по настоящему изобретению, в частности, увеличить урожайность, предпочтительно выход массы семян, в нормальных полевых условиях, более предпочтительно, по меньшей мере, при низком воздействии патогена, более предпочтительно при наименьшем уровне воздействия грибковых патогенов в период вегетации.

Особым преимуществом настоящего изобретения является то, что способы по настоящему изобретению не требуют наличия гомозиготных растений, экспрессирующих гены Pti5 и SAR8.2, при этом они также применимы для гемизиготных или гетерозиготных растений. Соответственно, способ получения гибридов по настоящему изобретению преимущественно предусматривает гибридные растения, содержащие как выгодную гетерологичную экспрессионную кассету настоящего изобретения, так и выгодные признаки второго растительного материала. Таким образом, способ получения гибридов согласно настоящему изобретению позволяет с минимальными усилиями получать гибриды,

адаптированные к ожидаемым условиям роста для следующего периода вегетации.

Далее по тексту настоящей заявки изобретение дополнительно описывается с использованием примеров и выбранных предпочтительных вариантов осуществления. Ни примеры, ни выбранные варианты осуществления не предусматривают для ограничение предмета формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение трансформированных растений сои

Все этапы, ведущие к получению и первой оценке трансформированных растений сои, экспрессирующих одногенные конструкции, описаны в настоящей заявке, такие как:

- Выделение или синтез соответствующих генов
- Создание векторов трансформации растений
- Трансформация соответствующих векторов в растения сои
- Оценка резистентности трансформированных растений к ржавчинному грибу сои

описаны в

WO2014118018 (ген резистентности: EIN2), примеры 2, 3 и 6

WO2013001435 (ген резистентности: Pti5), примеры 2, 3 и 6 (здесь: SEQ ID NO. 3)

WO2014076614 (ген резистентности: CaSAR = SAR8.2), примеры 2, 3 и 6

(здесь: SEQ ID NO. 5)

WO2014024079 (ген резистентности: RLK2), примеры 2, 3 и 6.

WO2012023099 (ген резистентности: ADR1)

Клонирование конструкций с двойным стеком генов

- a) SAR8.2 и Pti5
- b) SAR8.2 и RLK2
- c) Pti5 и ADR1
- d) Pti5 и EIN2
- e) Pti5 и RLK2

Кассеты с одним геном (терминатор промоторного гена) клонировали в соответствии с алгоритмами, описанными в указанных выше патентах. Ввиду того, что все компоненты и вся кассета фланкированы уникальными рестрикционными ферментами с восьмью основаниями, мы вырезали всю экспрессионную кассету и перенесли ее в вектор p-Entry, совместимый с трехсторонним GATEWAY ((Gateway system, Invitrogen, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США).

Все двугенные конструкции получены с использованием тройной реакции. Для создания бинарного вектора трансформации растений, содержащего обе кассеты с одним геном, проводили тройную реакцию LR (Gateway system, Invitrogen, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) в соответствии с протоколом производителя с использованием:

- a) первой кассеты с одним геном, расположенной в векторе pENTRY между сайтами рекомбинации ATT4 и ATT1,
- b) пустого вектора PENTRY, имеющего сайты рекомбинации ATT1 и ATT2,
- c) второй кассеты с одним геном, расположенной в векторе pENTRY между сайтами рекомбинации ATT2 и ATT3, и
- d) мишени, в виде которой выступает бинарный вектор pDEST, содержащий сайты рекомбинации ATT4 и ATT3. Кроме того, вектор pDEST включал в себя: (1) кассету устойчивости к спектиномицину/стрептомицину для бактериальной селекции (2) точку начала репликации pVS1 для репликации в *Agrobacteria* (3) точку начала репликации ColE1 для стабильного поддержания в *E. coli* и (4) между правой и левой границами селекции ANAS под контролем промотора AtANASL.

Реакционную рекомбинацию трансформировали в *E. coli* (DH5alpha), выполняли мини-приготовление и подвергали скринингу с помощью специфического рестрикционного расщепления. Положительный клон из каждой векторной конструкции секвенировали и подвергали трансформации сои. Трансформацию сои проводили, как описано выше в патентах с одним геном.

Если в приведенных выше документах указано несколько методов трансформации в примере 3, результат в части урожайности и резистентности к

Phakopsora pachyrhizi устанавливался независимо от использованного метода трансформации.

На основании результатов оценки резистентности к соевой ржавчине в поколениях T0 и/или T1 для дальнейшего анализа отбирались 3-5 наиболее устойчивых и фенотипически наиболее выглядящих объектов.

Для полевых испытаний использовали гомозиготные семена T2 или T3. Для получения гомозиготных семян отдельно высевали семена T1 выбранных 3-5 событий на конструкцию. Отдельные растения, гомозиготные по трансгену, отбирали с помощью ПЦР-анализа TaqMan®, как описано производителем анализа (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США 02451).

По 10-30 гомозиготных растений на объект выращивали в стандартных условиях (длина светового дня 12 ч, 25°C) и обеспечивали их самоопыление (инбредные). Зрелые гомозиготные семена собирали через приблизительно 120 дней после посадки. Собранные семена всех 10-30 гомозиготных растений на объект объединяли вместе.

Пример 2: Полевые испытания

Гомозиготные семена T3 с 3-5 объектами на конструкт тестировали в полевых условиях на резистентность к соевой ржавчине, урожайность и сельскохозяйственные показатели.

Полевые испытания проводились в Бразилии на двух площадках в штатах Сан-Паулу и Минас-Жерайс соответственно. Полевые испытания проводились в зависимости от погодных условий в ноябре, начале декабря (сезон Сафра) или начале февраля (сезон Сафринья), чтобы обеспечить достаточное количество инокулята азиатской соевой ржавчины.

Материал тестировали на разделенных участках (длина 2 м, 4 ряда на участок), 3-4 повторности на объект и участок испытания. Полевые испытания для проверки эффективности признаков проводились с использованием стандартной практики культивирования, например, с точки зрения борьбы с сорняками и насекомыми и внесения удобрений.

В зависимости от испытания выполнялись 2 различных обработки фунгицидами:

1. Без обработки фунгицидами («без обработки»)
2. Одна обработка фунгицидом («Обработка А») при появлении азиатской ржавчины сои (~35–45 дней после посадки, в зависимости от местоположения, даты и года посадки). Обработка фунгицидами позволила снизить тяжесть заболевания азиатской ржавчины сои в начале сезона, что позволило проверить эффективность признака при разных уровнях поражения азиатской ржавчиной сои в одном и том же месте, имитируя год с меньшим уровнем интенсивности заболевания и более поздним началом заболевания.

В качестве контрольных использовали порядка 10% площадей. В зависимости от алгоритма исследования в качестве контрольной использовали нетрансформированную материнскую линию дикого типа (дт) или множество семян, собранных из нулевых сегрегантов, выращенных параллельно с трансгенными материнскими растениями (см. выше).

Пример 3: Оценка степени поражения APC

Степень поражения азиатской ржавчиной сои (АРС) оценивалась специалистами с использованием схемы, опубликованной Годой и др. (2006) (работа Godoy, C., Koga, L., Canteri, M. (2006) Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity, *Fitopatologia Brasileira* 31(1)).

В целях исключения эффектов вставки трансгена, которые зависели исключительно от локуса интеграции, оценивали от 3 до 5 независимых трансгенных объектов в каждом полевом испытании (объект = потомство одного растения, принявшее гетерологичные экспрессионные кассеты из того же векторного конструкта, но интегрированные в разные геномные локусы).

Три уровня листового полога (нижний, средний и верхний) оценивались независимо друг от друга, и среднее значение поражения всех трех уровней полога считается степенью поражения. Всего выполняли 4-7 оценок в течение всего вегетативного сезона, начиная с раннего начала заболевания и повторяя каждые 6-8 дней; если погода не способствовала прогрессированию заболевания, время между двумя оценками увеличивалось максимум до 22 дней.

Для того, чтобы исключить эффекты внедрения трансгена, которые зависели бы исключительно от локуса интеграции, в каждом полевом испытании оценивали от 3 до 5 независимых трансгенных объектов.

Для того, чтобы сравнить развитие заболевания у различных объектов в течение сезона, выполнялся расчет кривой изменения площади поражения на основе показателей оценки поражения (см.: M.J. Jeger and S.L.H. Viljanen-Rollinson (2001). Кривая изменения площади поражения используется для количественной оценки резистентности сортов сельскохозяйственных культур к заболеваниям, Theor Appl Genet 102:32–40.)

Кривая изменения площади поражения – это количественный показатель, который характеризует интенсивность заболевания в течение всего сезона. Для расчета кривой изменения площади поражения используется ряд показателей оценки заболеваемости в течение сезона. Кривая изменения площади поражения представляет собой сумму всех средних значений двух последовательных оценок, умноженных на время между оценками.

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

«t»: время оценки поражения в днях после посадки

«y»: процент площади пораженных листьев на всех уровнях полога

«n»: количество оценок поражения

Для расчета относительной резистентности к заболеваниям использовалась следующая формула:

Относительная резистентность к заболеванию = (кривая изменения площади поражения(контроль) / кривая изменения площади поражения(объект)) – 1)*100%

Относительную резистентность к заболеванию на уровне гена (конструкта) рассчитывали путем усреднения относительной резистентности к заболеванию (на основе приведенной выше формулы) 3-5 объектов, экспрессирующих один и тот же ген (= один и тот же конструкт).

Таблица 1: Средняя резистентность растений сои к *Phakopsora pachyrhizi* в 2 независимых полевых испытаниях

Обработка	Гены	Местоположение 1		Местоположение 2	
		Кривая изменения площади поражения	относительная резистентность [%]	Кривая изменения площади поражения	относительная резистентность [%]
Обработка А	Pti5	1815,7	25,6%	1689	3,7%
Обработка А	SAR8.2	2282,1	6,4%	1716	2,2%
Обработка А	Pti5::SAR8.2	1910,4	21,7%	1590	9,4%
Обработка А	WT	2439,1	0,0%	1754	0,0%
Без обработки	Pti5	2417,4	24,6%	2022	5,4%
Без обработки	SAR8.2	3178,5	0,9%	2029	5,1%
Без обработки	Pti5::SAR8.2	2729,2	14,9%	1847	13,6%
Без обработки	WT	3207,6	0,0%	2138	0,0%

Как отдельные гены Pti5, так и SAR8.2, а также молекулярный стек Pti5 + SAR8.2 повышали резистентность в обоих местоположениях и при обеих обработках (без обработки и при разовой обработке фунгицидом («Обработка А»)), при этом комбинация обоих генов прямо не привела к аддитивному или более чем аддитивному увеличению резистентности

Пример 4: Определение урожайности

Для определения урожайности собирали только два средних ряда на участке (см. выше), это позволяет снизить завышение оценки, обусловленное краевых эффектов. Использовался комбайн, позволяющий регистрировать общую массу зерна на участке и влажность зерна. После коррекции по влажности урожайность зерна рассчитывали от кг/участок до кг/га.

Гиперэкспрессия SAR8.2, Pti5 и RLK2 в виде одиночных генных конструкций значительно повышала урожайность сои при заражении соевой

ржавчиной. Кроме того, мы смогли продемонстрировать некоторое увеличение урожайности, обусловленное гиперэкспрессией гена ADR1 (см. рис. 4). Для того, чтобы определить эффект объединения эффективных ведущих генов в молекулярный стек, сравнительное испытание было проведено таким образом, чтобы сравнить растения, экспрессирующие стеки ведущих генов, с растениями, экспрессирующими соответствующие отдельные гены.

Неожиданно комбинация Pti5 и SAR8.2 привела к значительному увеличению урожайности, в среднем на 36% (среднее значение для обеих обработок и обоих местоположений, конкретные значения приведены в таблице ниже). Такое значительное увеличение не прогнозировалось на основании данных об резистентности к заболеваниям (см. пример 3 и Фиг. 1) или на основании увеличения урожайности обоих одногенных контрольных растений с SAR8.2.

Таблица 2: Увеличение урожайности соевых бобов, собранных в ходе 2 независимых полевых испытаний

Обработка	Гены	Местоположение 1		Местоположение 2	
		Урожайность (кг/га)	относительное увеличение урожайности	Урожайность (кг/га)	относительное увеличение урожайности
A	Pti5	2140	10%	2409	7%
A	SAR8.2	2276	17%	2586	15%
A	Pti5::SAR8.2	2658	36%	2828	25%
A	WT	1953	0%	2257	0%
Без обработки	Pti5	1420	16%	1713	8%
Без обработки	SAR8.2	1748	43%	1799	13%
Без обработки	Pti5::SAR8.2	1896	55%	2059	29%
Без обработки	WT	1224	0%	1591	0%

Измеренная урожайность каждого варианта (конструкт x обработка x местоположение) сравнивались с урожайностью нетрансгенного контрольного растения дикого типа (дт), что позволило рассчитать относительное увеличение урожайности на конструкт, обработку и местоположение при помощи формулы:

Относительное увеличение урожайности [%] = (урожайность по варианту [кг] / урожайность соответствующего растения дт [кг]-1) * 100%

Ожидаемое увеличение урожайности в результате комбинации двух генов определяли с использованием формулы Колби [Р.С. Колби, «Расчет синергетического и антагонистического ответа комбинаций гербицидов», Weeds 15, 20-22 (1967)] и сравнивали с наблюдаемым увеличением урожайности. Формула Колби позволяет спрогнозировать ценность комбинации на основе результата обоих отдельных факторов (по тексту настоящего раздела – гены), которое представляет собой полностью аддитивное взаимодействие обоих факторов. Значения, превышающие это значение, можно рассматривать как результат более чем аддитивного взаимодействия.

Формула Колби:

$$E = A + B - \frac{A \times B}{100}$$

E – ожидаемое относительное увеличение урожайности, выраженное в % увеличения по сравнению с контрольным растением дикого типа, при экспрессии комбинации генов А и В

A – относительное увеличение урожайности, выраженное в % увеличения по сравнению с контрольным растением дикого типа при экспрессии лишь гена А

B – относительное увеличение урожайности, выраженное в % увеличения по сравнению с контрольным растением дикого типа при экспрессии лишь гена В

Использование формулы Колби и расчет аддитивных значений для комбинации SAR8.2 и Pti5 дает следующие показатели:

- а) Местоположение 1, обработка А:
 - увеличение урожайности, прогнозируемое на основе формулы Колби: 24,6%
 - измеренное увеличение урожайности: 36,1%
- б) Местоположение 1, без обработки:
 - увеличение урожайности, прогнозируемое на основе формулы Колби: 51,9%
 - измеренное увеличение урожайности: 54,8 %

- c) Местоположение 2, обработка А:
 - увеличение урожайности, прогнозируемое на основе формулы Колби: 20,3%
 - измеренное увеличение урожайности: 25,3%
- d) Местоположение 2, без обработки:
 - увеличение урожайности, прогнозируемое на основе формулы Колби: 19,8%
 - измеренное увеличение урожайности: 29,4%

Из приведенных выше разделов и Фиг. 3а, 3б становится очевидно, что комбинация SAR8.2 и Pti5 в любом местоположении и при любых обработках приводит к увеличению урожайности, которое превышает значение, прогнозируемое на основе формулы Колби и, следовательно, превышает аддитивное значение.

Этот результат оказался весьма неожиданным и непредвиденным, поскольку механизм действия Pti5 и SAR8.2 в корне отличается. Как указано, белок SAR8.2 действует как противогрибковый белок, в то время как Pti5 представляет собой фактор транскрипции, участвующий в регуляции защитных реакций.

Ни одна из других комбинаций ведущих генов, протестированных параллельно, не показала сопоставимый результат, что указывает на то, что увеличение урожайности, обусловленное экспрессией комбинации SAR8.2 и Pti5, является исключительным преимуществом настоящего изобретения.

В рамках анализа дальнейших результатов сравнительного полевого испытания было установлено, что, несмотря на то, что большинство выбранных индивидуальных генов резистентности приводят к увеличению урожайности почти любом местоположении и при любых обработках по сравнению с нетрансгенным растением дикого типа (см. таблицу 3-6 и Фиг. 4-7), ни одна комбинация (набор) генов резистентности не показала увеличение урожайности, которое можно было бы считать аддитивным (или более чем аддитивным) по результатам использования одногенных конструкторов.

Таблица 3: Урожайность растений сои, содержащих комбинацию генов SAR8.2 и RLK2

Обработка	Ген	Местоположение 1	Местоположение 2
Обработка А	SAR8.2	9%	19%
Обработка А	RLK2	27%	30%
Обработка А	SAR8.2::RLK2	10%	22%
	Аддитивное значение по Колби	34%	43%
Без обработки	SAR8.2	39%	15%
Без обработки	RLK2	59%	6%
Без обработки	SAR8.2::RLK2	21%	-3%
	Аддитивное значение по Колби	75%	21%

Таблица 4: Урожайность растений сои, содержащих комбинацию генов Pti5 и ADR1

Обработка	Ген	Местоположение 1	Местоположение 2
Обработка А	Pti5	6%	7%
Обработка А	ADR1	13%	18%
Обработка А	Pti5::ADR1	7%	2%
	Аддитивное значение по Колби	19%	24%
Без обработки	Pti5	12%	8%
Без обработки	ADR1	43%	6%
Без обработки	Pti5::ADR1	14%	-4%
	Аддитивное значение по Колби	50%	13%

Таблица 5 Урожайность растений сои, содержащих комбинацию генов Pti5 и EIN2(="AtEIN2Cterm")

Обработка	Ген	Местоположение 1	Местоположение 2
Обработка А	Pti5	12%	-
Обработка А	AtEIN2Cterm	22%	-
Обработка А	Pti5::AtEIN2Cterm	-12%	-
	Аддитивное значение по Колби	32%	-
Без обработки	Pti5	16%	-
Без обработки	AtEIN2Cterm	37%	-
Без обработки	Pti5::AtEIN2Cterm	3%	-
	Аддитивное значение по Колби	47%	-

Таблица 6: Урожайность растений сои, содержащих комбинацию генов Pti5 и RLK2

Обработка	Ген	Местоположение 1	Местоположение 2
Обработка А	Pti5	9%	19%
Обработка А	RLK2	34%	40%
Обработка А	Pti5::RLK2	19%	13%
	Аддитивное значение по Колби	40%	51%
Без обработки	Pti5	17%	15%
Без обработки	RLK2	64%	11%
Без обработки	Pti5::RLK2	42%	14%
	Аддитивное значение по Колби	70%	24%

Формула изобретения

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

- i) получение растения, содержащего ген Pti5 и SAR8.2 и/или гибридный ген Pti5-SAR8.2, причем предпочтительно гены Pti5 и/или SAR8.2 представлены в соответствующей гетерологичной экспрессионной кассете, и
- ii) культивирование растения.

2. Способ культивации для повышения урожайности растения по сравнению с контрольным растением, включающий культивацию растения, содержащего ген Pti5 и SAR8.2 и/или гибридный ген Pti5-SAR8.2, предпочтительно растения (a), гиперэкспрессирующего Pti5 и SAR8.2 и/или (b) содержащего гетерологичную экспрессионную кассету Pti5 и/или гетерологичную экспрессионную кассету SAR8.2 и/или (c) экспрессирующего гетерологичный ген Pti5 и/или гетерологичный ген SAR8.2, причем во время культивации растения количество обработок пестицидами за сезон роста сокращается, по меньшей мере, на одну по сравнению с контрольным растением, предпочтительно, по меньшей мере, на две.

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

- биомасса на площадь,
- масса зерна на площадь,
- масса семян на площадь.

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

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, **отличающийся тем**, что вредитель представляет собой или содержит, по меньшей мере, грибковый вредитель, предпочтительно биотрофный или геминекротрофный гриб, более

предпочтительно ржавчинный гриб, более предпочтительно гриб типа Basidiomycota, еще более предпочтительно подтипа Pucciniomycotina, еще более предпочтительно класса Pucciniomycetes, еще более предпочтительно отряда Pucciniales, еще более предпочтительно семейства Chaconiaceae, Coleosporiaceae, Cronartiaceae, Melampsoraceae, Mikronegeriaceae, Phakopsoraceae, Phragmidiaceae, Pileolariaceae, Pucciniaceae, Pucciniastraceae, Puccinosiraceae, Raveneliaceae, Sphaerophragmiaceae или Uropyxidaceae,

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

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

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

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

urticae-acutiformis, *Puccinia urticae-caricis*, *Puccinia urticae-hirtae*, *Puccinia urticae-inflatae*, *Puccinia urticata*, *Puccinia vaginatae*, *Puccinia virgata*, *Puccinia xanthii*, *Puccinia xanthosiae*, *Puccinia zoysiae*,

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

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

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, **отличающийся тем**, что растение содержит гетерологичную экспрессионную кассету *Pti5* и/или гетерологичную экспрессионную кассету *SAR8.2*, причем в случае с каждой экспрессионной кассетой соответствующий ген *Pti5* или *SAR8.2* функционально связан с любым из следующих:

- a) конститутивно активного промотора,
- b) тканеспецифического или тканепредпочтительного промотора,

с) промотора, индуцируемого воздействием на растение вредителя, предпочтительно грибкового вредителя.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, **отличающийся тем**, что культивацию осуществляют с использованием множества из, по меньшей мере, 1000 растений, предпочтительно причем растения выращивают в полевых условиях, и/или увеличение выхода семян составляет, по меньшей мере, 4%.

9. Растительная клетка, часть растения или целое растение, содержащие ген Pti5 и SAR8.2 и/или гибридный ген Pti5-SAR8.2, **отличающиеся тем**, что растение предпочтительно содержит гетерологичную экспрессионную кассету Pti5 и/или гетерологичную экспрессионную кассету SAR8.2.

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

i) получение

i-a) первого растительного материала, содержащего ген Pti5 и SAR8.2 и/или гибридный ген Pti5-SAR8.2, предпочтительно содержащего гетерологичную экспрессионную кассету Pti5 и гетерологичную экспрессионную кассету SAR8.2, и второго растительного материала, не содержащего ни ген Pti5 и SAR8.2, ни гибридный ген Pti5-SAR8.2, или

i-b) первого растительного материала, содержащего ген Pti5, предпочтительно содержащего гетерологичную экспрессионную кассету Pti5, и второго растительного материала, содержащего ген SAR8.2, предпочтительно содержащего гетерологичную экспрессионную кассету SAR8.2,

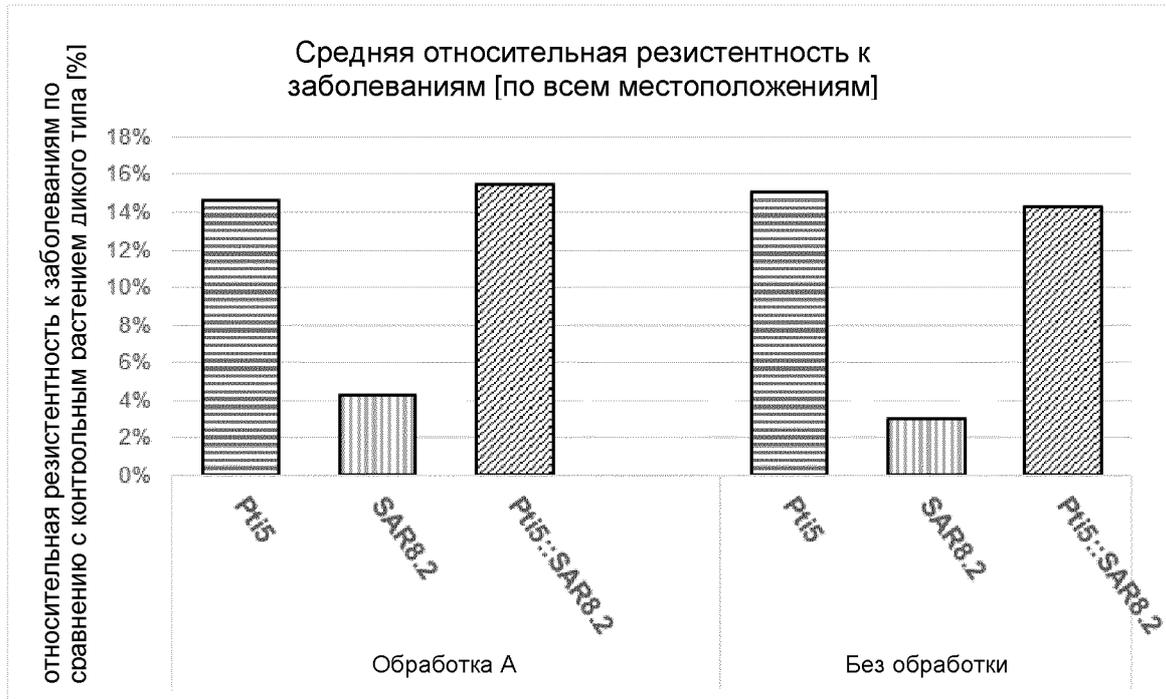
ii) получение поколения F1 путем скрещивания первого и второго растительного материала, и

iii) селекцию одного или более представителей поколения F1, способных экспрессировать Pti5 и SAR8.2.

11. Применение комбинации, по меньшей мере, гена Pti5 и гена SAR8.2, гибридного гена Pti5-SAR8.2 или растения, части растения или растительной клетки по п. 9 для повышения урожайности растения, предпочтительно в

естественных полевых условиях, более предпочтительно в условиях воздействия патогенов, более предпочтительно причем на одной стадии роста растения средняя площадь пораженных листьев составляет 2 - 100%, более предпочтительно 5 - 50%, более предпочтительно 10 - 50%.

12. Способ синергетического повышения урожайности, включающий обеспечение наличия в растительной клетке, части растения или растении, по меньшей мере, белка Pti5 и белка SAR8.2.



Фигура 1

Формула Колби:

$$E = A + B - \frac{A \times B}{100}$$

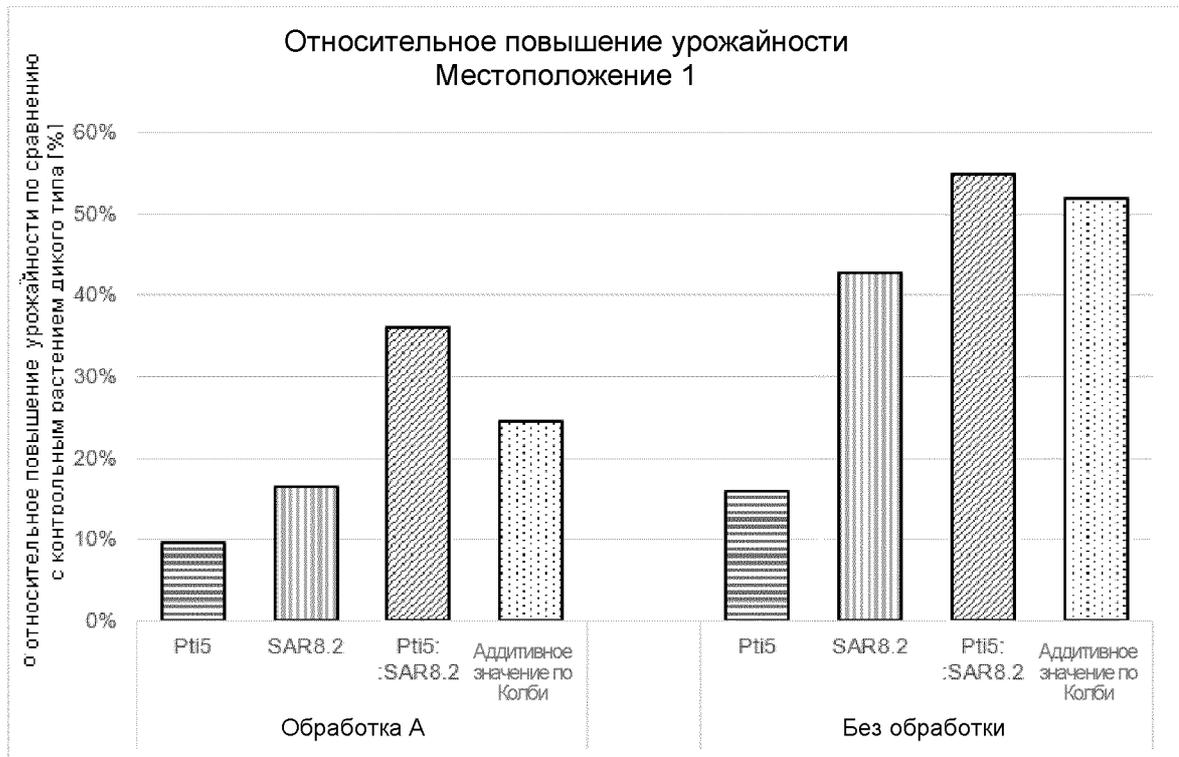
E — ожидаемое относительное увеличение урожайности [%], выраженное в % увеличении по сравнению с контрольным растением дикого типа, при экспрессии комбинации генов A и B

A — относительное увеличение урожайности, выраженное в % увеличении по сравнению с контрольным растением дикого типа при экспрессии лишь гена A

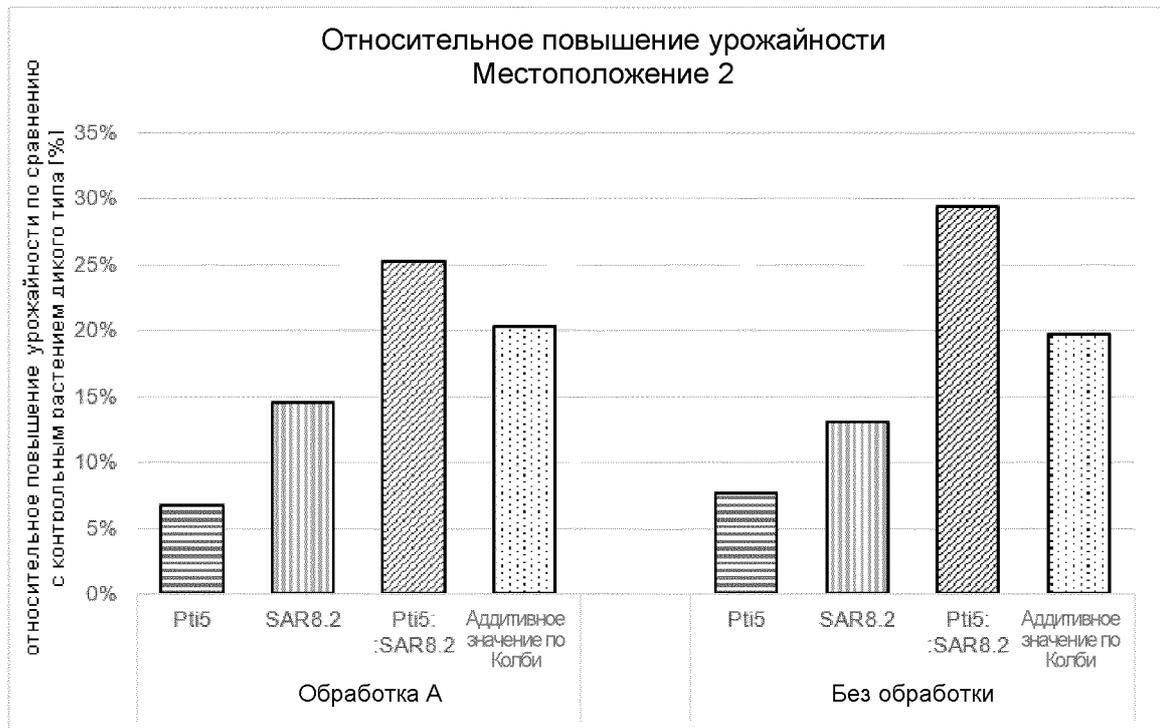
B — относительное увеличение урожайности, выраженное в % увеличении по сравнению с контрольным растением дикого типа при экспрессии лишь гена B

R.S. Colby, "Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations", Weeds 15, 20-22 (1967)]

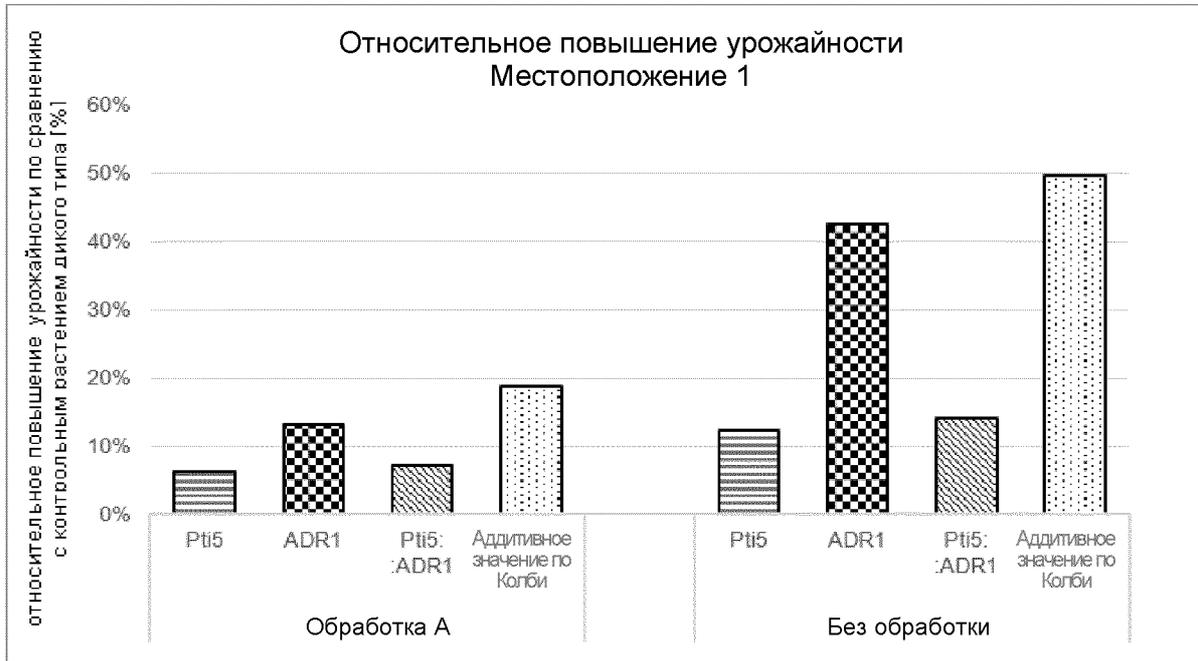
Фигура 2



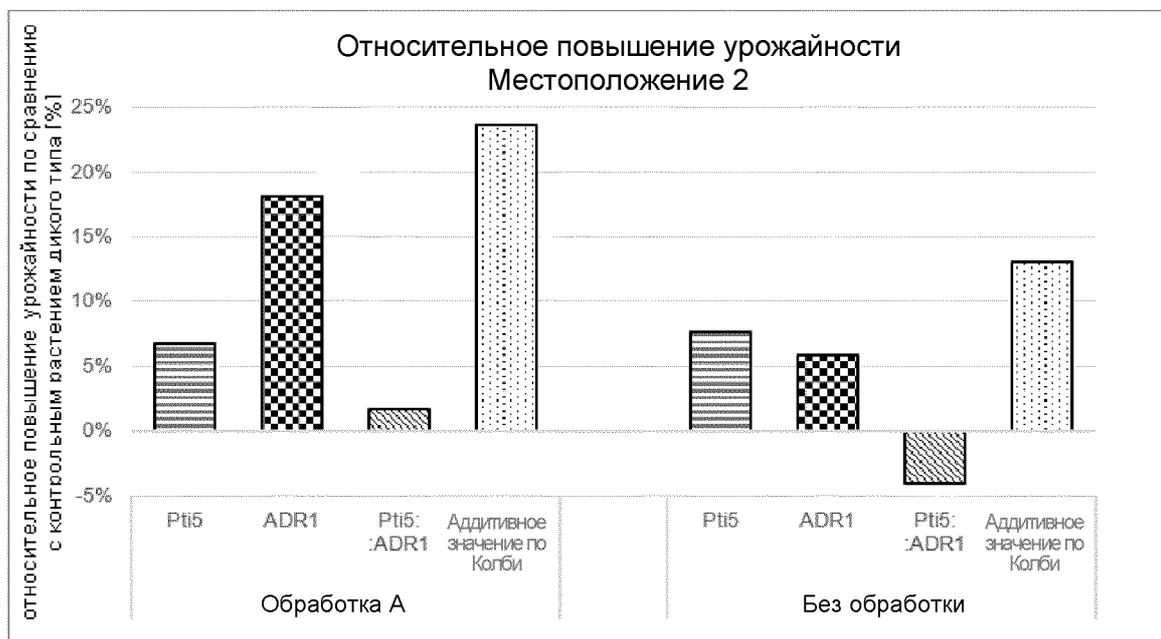
Фигура 3а



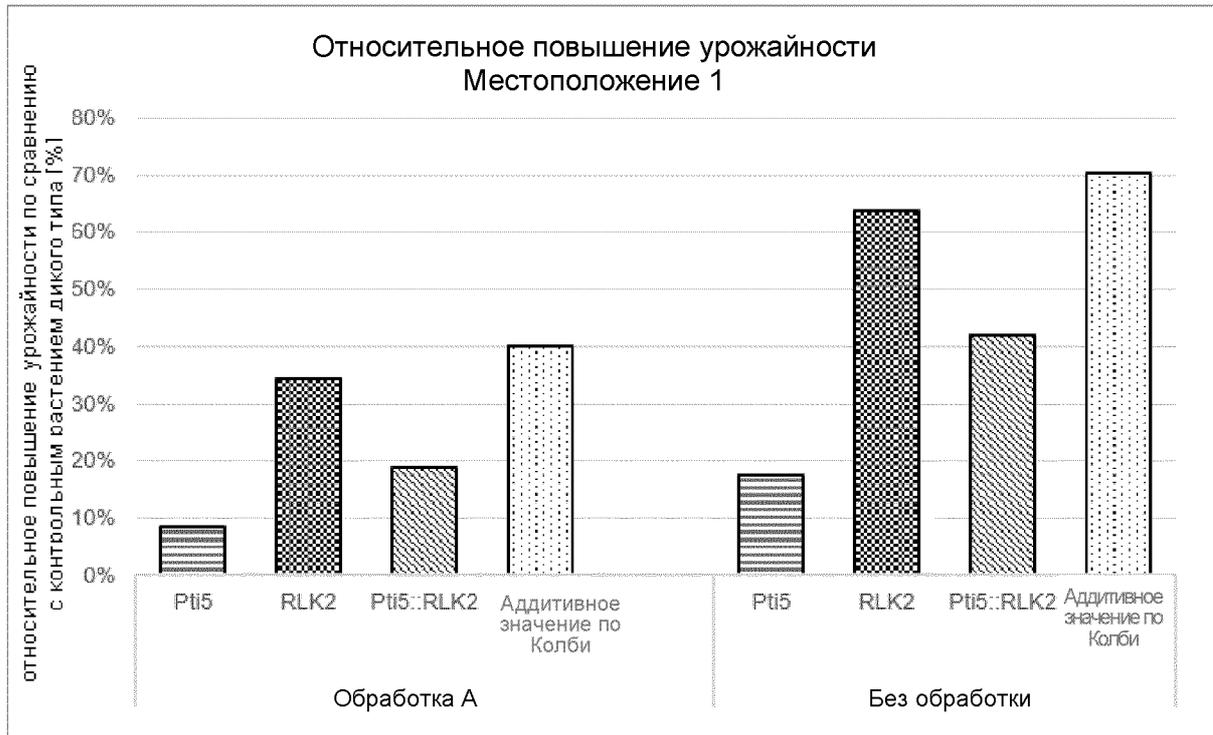
Фигура 3б



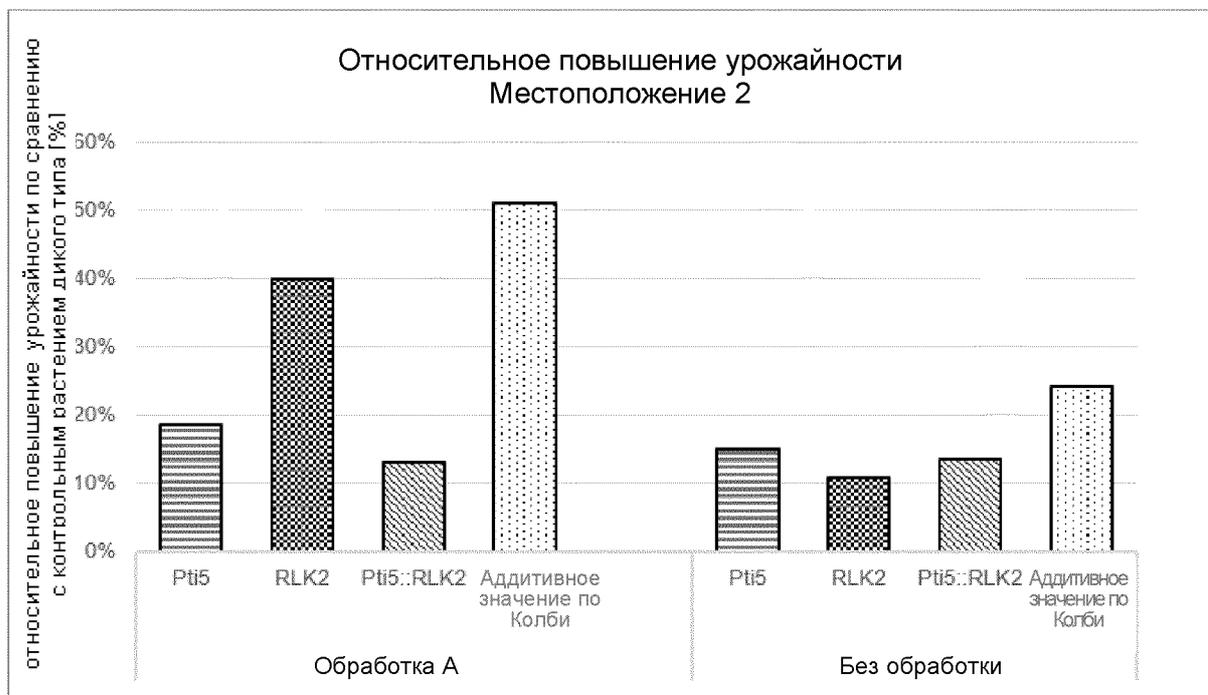
Фигура 4а



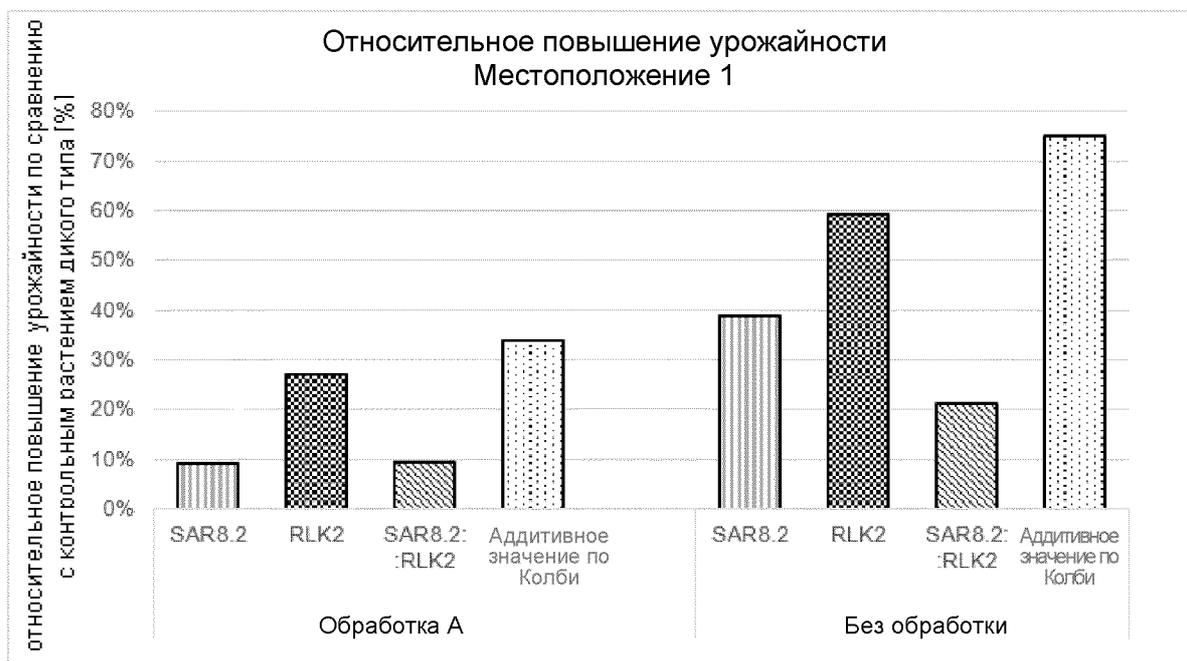
Фигура 4б



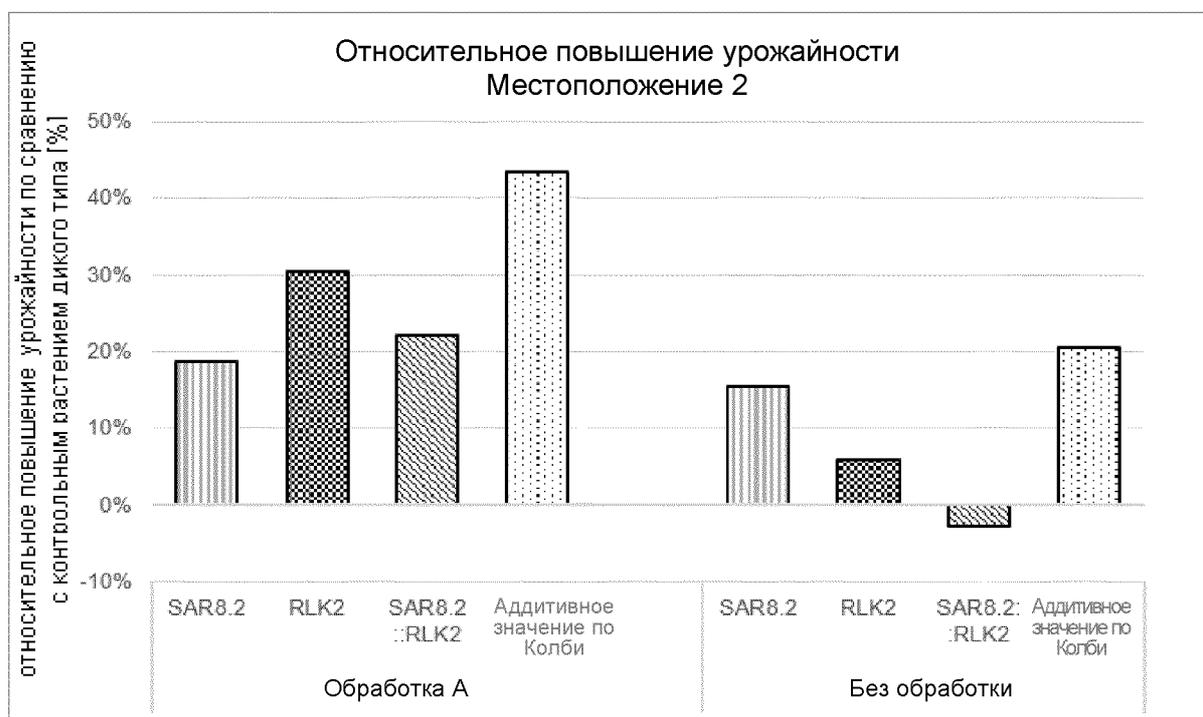
Фигура 5а



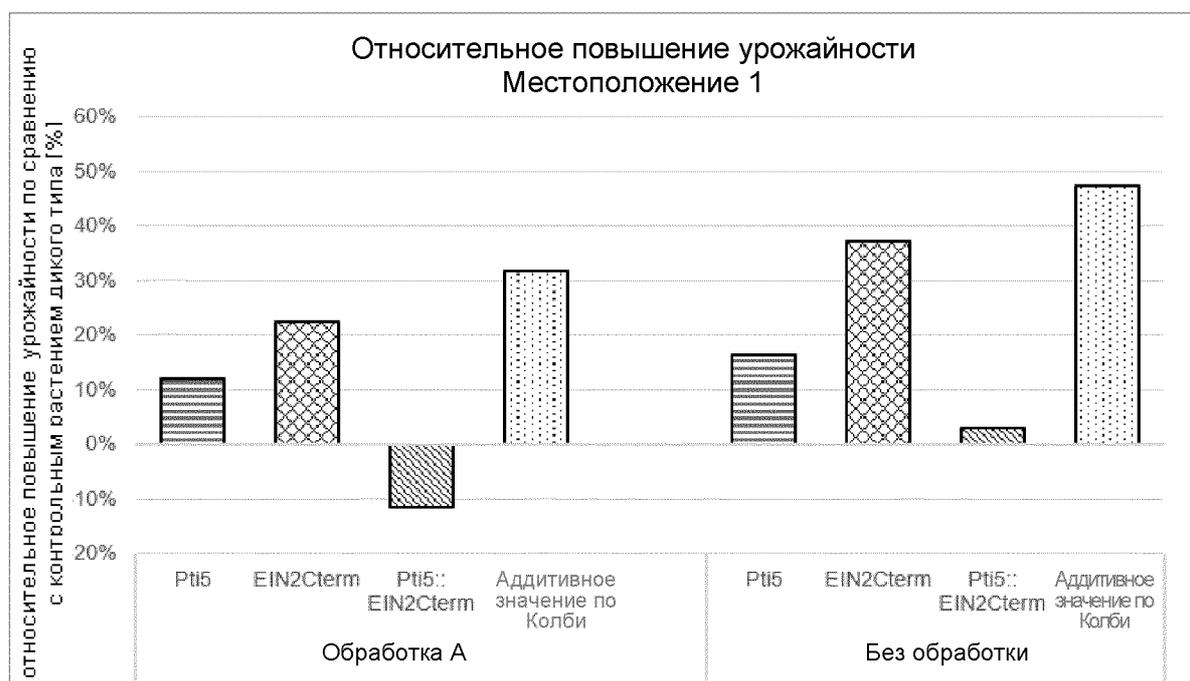
Фигура 5б



Фигура 6а



Фигура 6б



Фигура 7

1 - 100

```

* * * * *
***** * * *
** * ** *
** ***** ** * *
* ***** * *
* ***** * *
** * * ***** * *****
***** ***** *
*****
*****
MVPTPQSDLPLNENDSQEMVLYEVLNEANALNIPYLPQRNQLLPRNNILRPLQCI GK KYRGVRRRPWGKYAAEIRDSARHGARVWLGT FETAEEAALAYD
MVPTSQSELPLNENDSQDMVIYQVLNEANALNNSFLPQRNQQISKNS-LEPTRNIGK KYRGVRRRPWGKYAAEIRDSARHGARVWLGT FETAEEAALAYD
WLGAFDTAFKFSDSNPKEKLLFEIIASSMGASITYV-SQPHINTQSNS-D-SKT-ASRLI IKQQRDRFGCVTTEPTKNK-QICI MYDCVVD SMRHF
DALSPNDVNIPNDGFNVEIFIHYASVTL SITTPS-RPPSNLHPS-P-GIGSAHAVTREFG LK RS WVSRVH -IQKAKKL Q PIA VRS L
-MSLYEISEQVAQQHIDGIFVLRMGTOR-NMNSAHISHSGRKLNPAVEFR TKQIL-VHAK C CT KK QST M N EKG QV
FSQPKKG-HD-EAESLRAGK--DAVKD-S---PNNMAATHSSGAATKRVQECGSAS-N L I NG T- RTV K A QK I
NE-QAP-Q-LATIP-VVPLGGCSLSRRNTPQAQ-WAGEAETTPHR-GHM-AVAPKVDS T N S AIQ T T M K
QFF-H-QTA-T-S-A-ESRMRHKFTDTPDDTGGFIFQNELEHAQTDMKDNCRDVF DN- N NI G Q A
GGTCLARVDA GVAEALYS-TSGSDEKVAEFDHHL SLKLPVKILGTVHKQETGMKWC D L S S
IQDGNHYTE K-FIRS-VDAPTFH DEVSEAITTNLIQAAELHHEAESRL-HEPGD L S P
LKEH-RLH QGGLT-N-PMR HML FFCVILL-EDTKD-GQ--QDFKH -ECGRPQ H V
PRHICHAP RLRP FQCQP RNP KGHPP-DGNTD-RGCSDERLMNL FIEPE T R
SDINDLDN VTYT GTFRQ W V LIKERDEMPEFCAKRVVIKQNRM HPQRI V W
VIMVETPI V P Q S MKMNVMGVQMIDTL-TKNCATTP MSRSN
NNEMVVG Y T W QVQ RRARVMG-DD-RDEHIYT NV-TQ
YVFQC L Y YT V CY RHIYMFEFIIP P K
KRF Y D VMM NMGGLRQ
YTI K WNW R VMP
VY R YVY C VC
W

```

Фигура 8

