

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393463** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.04.24

(22) Дата подачи заявки
2022.07.22

(51) Int. Cl. *A01H 1/00* (2006.01)
A01H 1/04 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(54) РАСТЕНИЯ, УСТОЙЧИВЫЕ К ЧЕРНОЙ НОЖКЕ, И СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К ЧЕРНОЙ НОЖКЕ

(31) **21187390.6**

(32) **2021.07.23**

(33) **EP**

(86) **PCT/US2022/074073**

(87) **WO 2023/004429 2023.01.26**

(71) Заявитель:

**БАСФ АГРИКУЛЬЧУРАЛ
СОЛЮШНС СИД УС ЛЛСИ (US)**

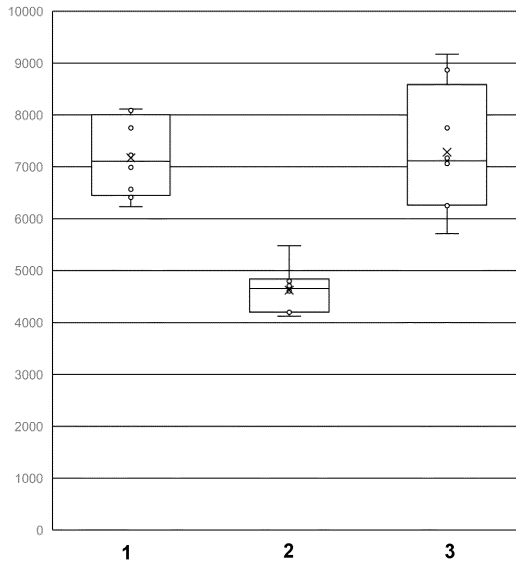
(72) Изобретатель:

**Энгелен Стивен, Ван Тоурноут
Михель (BE)**

(74) Представитель:

Беляева Е.Н. (BY)

(57) Настоящее изобретение относится к способам получения растений, устойчивых к черной ножке, а также к способам идентификации растений, устойчивых к черной ножке. Кроме того, предусмотрены растения, устойчивые к черной ножке, а также наборы для оценки устойчивости к черной ножке в растениях.



**202393463
A1**

**202393463
A1**

Растения, устойчивые к черной ножке, и способы идентификации растений, устойчивых к черной ножке

Настоящее изобретение относится к способам получения растений, устойчивых к черной ножке, а также к способам идентификации растений, устойчивых к черной ножке. Кроме того, предусмотрены растения, устойчивые к черной ножке, а также наборы для оценки устойчивости к черной ножке в растении.

Известный уровень техники

Черная ножка, или рак стебля, является основным заболеванием *Brassica napus* L. (масличный рапс или канола), которое ежегодно приводит к крупным экономическим убыткам во всем мире, в частности, в Европе, Австралии и Северной Америке. Черная ножка вызывается грибковым возбудителем *Leptosphaeria maculans* (анаморф *Phoma lingam* Tode ex. Fr.). Симптомы *L. maculans* могут развиваться на семядолях, листьях, стручках и стеблях. Поражения листьев развиваются после заражения аскоспорами, разносимыми ветром, и/или конидиоспорами, разносимыми водой (брызгами). Симптомы на стебле (или язвы) могут возникать в результате прямого заражения стеблей или в результате системного роста гриба из поражений листьев через сосудистую ткань в стебель (Hammond et al. (1985), *Plant Pathology* 34: 557-565). Язвы на стебле могут опоясывать стебель, что может привести к полеганию растений и их гибели. Менее серьезные язвы могут вызвать ограничение поступления воды и питательных веществ, что, в свою очередь, может привести к сморщиванию семян и стручков. Заражение стручка может привести к его преждевременному растрескиванию и заражению семян.

Включение устойчивости к черной ножке в сорта *B. napus* является одной из основных целей селекционных программ во всем мире. Хотя для снижения потерь урожая, вызванных заражением черной ножкой, используются как опрыскивание фунгицидов, так и агротехника, наиболее надежным способом борьбы на сегодняшний день является генетическая устойчивость. *Brassica napus* (2n=38, геном ААСС) – это амфидиплоидный вид, возникший в результате спонтанной гибридизации *Brassica rapa* L. (син. *B. campestris*; 2n=20, АА) и

Brassica oleracea L. ($2n=18$, CC). *B. napus* содержит полные наборы хромосом этих двух диплоидных геномов.

Устойчивость растений – это мощный инструмент борьбы с черной ножкой. Устойчивость к черной ножке оценивают экспериментами в теплицах или в рамках полевых экспериментов. Далее ее можно оценить на разных стадиях развития растения. Поэтому, говоря об устойчивости к черной ножке, обычно различают различные типы устойчивости в зависимости от стадии растения и оцениваемой ткани, такие как устойчивость проростков («ранняя» устойчивость) и устойчивость взрослых растений («поздняя» или «стеблевая» устойчивость). Анализируемые на устойчивость ткани растений включают, например, семядоли, листья и основания стеблей. Согласно имеющейся информации, генетическая устойчивость к черной ножке бывает моногенной (под контролем основного гена) или полигенной (под контролем нескольких второстепенных генов).

В *B. napus* картирован ряд локусов устойчивости. Устойчивость к гембиотрофному грибковому патогену *Leptosphaeria maculans* в значительной степени регулируется расоспецифичными R-генами. По имеющейся информации более 15 R-генов, идентифицированных у нескольких видов *Brassica*, передают расоспецифическую устойчивость к *L. maculans*. Двенадцать из этих R-генов расположены в геноме А *B. napus* или *B. rapa* (*Rlm1*, *Rlm2*, *Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm7*, *Rlm9*, *LepR1*, *LepR2*, *LepR3*, *LepR4*) или the B genome of *B. juncea* (*LmJR1*, *LmJR2*) посредством картирования сцепления (Larkan et al. (2016) Линии интрогрессии одиночного R-гена для точного расчленения патосистемы *Brassica-Leptosphaeria*. *Front. Plant Sci.* 7:1771. doi: 10.3389/fpls.2016.01771). Предполагается, что *Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm7* и *Rlm9* являются аллельными R-генами, которые взаимодействуют с *L. maculans* генами авирулентности *AvrLm3* (*Rlm3*), *AvrLm4-7* (*Rlm4* и *Rlm7*) и *AvrLm5-9* (*Rlm9*) (Dolatabadian et al. (2022) *Canadian Journal of Plant Pathology*, 44:2, 157-190).

US 7,893,325 описывает растение *Brassica napus*, содержащее на хромосоме 8 *Leptosphaeria maculans*. ген устойчивости, полученный из *Brassica rapa*, причем указанный ген устойчивости связан с маркерами AFLP E32/M50-M362 и P34/M48-M283 на хромосоме 8.

WO 2008/101343 A1 описывает способ придания растению устойчивости к черной ножке, включающий: введение молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую LepR3.

WO 2015/038469 A1 описывает молекулярные маркеры гена устойчивости к черной ножке *Rlm2* у *Brassica napus*.

WO 2015/038470 A1 описывает молекулярные маркеры гена устойчивости к черной ножке *Rlm4* у *Brassica napus*.

WO 2020/036950 A1 описывает молекулярные маркеры гена устойчивости к черной ножке *Rlm1* у *Brassica napus*.

WO2020/036954 A1 описывает молекулярные маркеры гена устойчивости к черной ножке *Rlm7* у *Brassica napus*.

Эталонная последовательность NCBI XP_013589432.1 представляет собой предполагаемую киназу 10, подобную рецептору, связанному с клеточной стенкой (частично) из *Brassica oleracea*.

Целесообразно выявить новые генетические источники устойчивости, способы их перевода в сорта с высокими агротехническими показателями и способы увеличения длительности устойчивости.

Настоящее изобретение, включая различные варианты его осуществления, представленные в описании и формуле изобретения, предоставляет растения, содержащие ген устойчивости к черной ножке, *Rlm3*, а также способы и средства для переноса *Rlm3* в растения и способы обнаружения наличия/отсутствия *Rlm3* в растениях.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение предоставляет способ производства растения, устойчивого к черной ножке, включающий этап введения в геном растения полинуклеотида, содержащего локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке, причем указанный локус *Rlm3* содержит, по меньшей мере, один полинуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из:

- a) последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44; и

- b) последовательности нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44, и
- c) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 80%, или, по меньшей мере, 85%, или, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности последовательности с nt 2106 - 9496 последовательности SEQ ID NO: 1, с nt 2106-4688 последовательности SEQ ID NO: 1, или nt 5908-9496 последовательности SEQ ID NO: 1.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет способ производства растения, устойчивого к черной ножке, включающий этап введения в геном растения, по меньшей мере, одного полинуклеотида, содержащего R1m3-ассоциированную открытую рамку считывания, причем указанная R1m3-ассоциированная открытая рамка считывания кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45;
- b) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
- c) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере,

на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;

- d) частичной последовательности любого из пунктов а) - с), причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке.

В одном из вариантов осуществления вышеуказанные способы по настоящему изобретению дополнительно включают:

- i) идентификацию растения, в геном которого интегрирован указанный полинуклеотид; и
ii) получение потомства от указанного растения, причем указанному потомству была придана устойчивость к черной ножке.

Настоящее изобретение также предоставляет способ придания устойчивости к черной ножке растению, включающий этап генетического модифицирования молчащего аллеля гена, кодирующего полипептид, содержащий Rlm3-ассоциированную открытую рамку считывания, таким образом, что молчащий аллель способен экспрессировать указанный полипептид, причем указанная Rlm3-ассоциированная открытая рамка считывания кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45;
b) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
c) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по

меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;

- d) частичной последовательности любого из пунктов а) - с), причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке.

В одном варианте осуществления вышеуказанного способа, молчащий аллель модифицируется путем гомологичной рекомбинации или с помощью технологии редактирования генома.

Настоящее изобретение также предусматривает способ производства растения, устойчивого к черной ножке, включающий этап введения в геном растения, по меньшей мере, одного полинуклеотида, содержащего R1m3-ассоциированную открытую рамку считывания, причем указанная R1m3-ассоциированная открытая рамка считывания кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45;
- b) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
- c) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в

любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;

- d) частичной последовательности любого из пунктов а) - с), причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке.

В одном варианте осуществления вышеуказанного способа, используют гомологичную рекомбинацию или технологию редактирования генома.

Кроме того, настоящее изобретение касается способа производства продуктов питания (таких как масло, шрот, крахмал, мука или белок), кормов (таких как масло, шрот, крахмал, мука или белок) или промышленных продуктов (таких как биотопливо, волокно, промышленные химикаты, лекарственные средства или питательные вещества), включающего:

- i) придание растению устойчивости к черной ножке способом по настоящему изобретению, и
- ii) приготовление продуктов питания, кормов или промышленных продуктов из растения, полученного на этапе i).

Настоящее изобретение дополнительно касается способа оценки устойчивости к черной ножке, включающего следующие этапы:

- I) определение наличия или отсутствия локуса Rlm3 устойчивости к черной ножке или полинуклеотида, содержащего Rlm3-ассоциированную открытую рамку считывания в образце указанного растения, содержащего геномную ДНК, причем
 - i) указанный локус Rlm3 содержит, по меньшей мере, один полинуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из:
 - a) последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44; и
 - b) последовательности нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99%

идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44;

- с) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 80%, или, по меньшей мере, 85%, или, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности последовательности с nt 2106 - 9496 последовательности SEQ ID NO: 1, с nt 2106-4688 последовательности SEQ ID NO: 1, или nt 5908-9496 последовательности SEQ ID NO: 1,

и

- ii) указанная Rlm3-ассоциированная открытая рамка считывания кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- а) аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45;
- б) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
- с) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44, причем

указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;

- d) частичной последовательности любого из пунктов а) - с), причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;

и

- II) оценку устойчивости к черной ножке растения на основании наличия или отсутствия указанного локуса Rlm3 устойчивости к черной ножке в указанном растении.

Настоящее изобретение также охватывает способ оценки устойчивости к черной ножке, включающий следующие этапы:

- i) определение наличия или отсутствия полипептида, кодируемого Rlm3-ассоциированной открытой рамкой считывания в образце указанного растения, содержащего белок, причем указанная Rlm3-ассоциированная открытая рамка считывания кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:
 - a) аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45;
 - b) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
 - c) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности

нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;

- d) частичной последовательности любого из пунктов а) - с), причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;

и

- ii) оценку устойчивости к черной ножке растения на основе наличия или отсутствия указанного полипептида, кодируемого Rlm3-ассоциированной открытой рамкой считывания.

Кроме того, настоящее изобретение касается применения локуса Rlm3 устойчивости к черной ножке для оценки устойчивости к черной ножке или полинуклеотида, содержащего Rlm3-ассоциированную открытую рамку считывания, в растении, причем

- i) указанный локус Rlm3 содержит, по меньшей мере, один полинуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из:
- a) последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44,
- b) последовательности нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44; и
- c) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 80%, или, по меньшей мере, 85%, или, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности последовательности с nt 2106 - 9496 последовательности SEQ

ID NO: 1, с nt 2106-4688 последовательности SEQ ID NO: 1, или nt 5908-9496 последовательности SEQ ID NO: 1, и

- ii) указанная Rlm3-ассоциированная открытая рамка считывания кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:
- a) аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45;
 - b) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
 - c) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
 - d) частичной последовательности любого из пунктов а) - с), причем указанный полипептид предпочтительно способен придавать растению устойчивость к черной ножке.

Настоящее изобретение дополнительно касается полинуклеотида, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из:

- a) последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44; и

- b) последовательности нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44, и
- c) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 80%, или, по меньшей мере, 85%, или, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, на 99%, или 100% идентичности последовательности с nt 2106 - 9496 последовательности SEQ ID NO: 1, с nt 2106-4688 последовательности SEQ ID NO: 1, или nt 5908-9496 последовательности SEQ ID NO: 1

Кроме того, настоящее изобретение предусматривает полинуклеотида, кодирующего полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45;
- b) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
- c) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;

- d) частичной последовательности любого из пунктов а) - с), причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, полинуклеотид функционально связан с гетерологичным промотором.

Настоящее изобретение дополнительно касается олигонуклеотида, который специфически гибридизуется с полинуклеотидом и который может быть использован в качестве праймера или зонда.

Настоящее изобретение также касается вектора или генной конструкции, содержащей полинуклеотид по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также касается клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид по настоящему изобретению или вектор или генную конструкцию по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также касается клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид по настоящему изобретению или вектор или генную конструкцию по настоящему изобретению. В еще одном варианте осуществления это растение содержит в своем геноме, по меньшей мере, один дополнительный ген устойчивости к черной ножке, выбранный из группы, состоящей из *Rlm4*, *Rlm7* и *Rlm9*.

Настоящее изобретение также касается полипептида, кодируемого полинуклеотидом согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также касается антитела, которое специфически распознает полипептид по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также касается набора для оценки устойчивости к черной ножке в растении, содержащего олигонуклеотид по настоящему изобретению или антитело по настоящему изобретению.

Кроме того, настоящее изобретение касается способа определения наличия или отсутствия полинуклеотида *Rlm3* настоящего изобретения в биологическом образце (таком как образец растительной ткани), включающего получение ДНК из указанного биологического образца и анализ указанной ДНК на наличие или отсутствие указанного полинуклеотида *Rlm3*.

Кроме того, настоящее изобретение касается способа определения наличия или отсутствия Rlm3 полипептида согласно настоящему изобретению в биологическом образце (таком как образец растительной ткани), включающего предоставление полипептидов из указанного биологического образца, и анализ указанных полипептидов на наличие или отсутствие указанного Rlm3-полипептида.

Также предусмотрен способ защиты культурных растений в полевых условиях, причем указанные растения представляют собой растения по настоящему изобретению, указанные растения дополнительно содержат, по меньшей мере, один ген устойчивости, придающий устойчивость к гербицидам, и указанный способ включает нанесение указанного гербицида на культурные растения с целью борьбы с сорняками.

В одном варианте осуществления гербицид представляет собой глюфосинат, глюфосинат аммония или глифосат.

Краткое описание чертежей

Фигура 1: Измерение устойчивости к болезням по флуоресценции ЗФБ (ОЕФ) в протопластах *Brassica napus*: 1: контрольные клетки ЗФБ; 2: Клетки, экспрессирующие *AvrLm3-WT*, 3: Клетки, экспрессирующие *AvrLm3-SP*.

Фигура 2: Визуализация устойчивости к болезням в виде флуоресценции ЗФБ в протопласте *Brassica napus*: 1: контрольные клетки ЗФБ; 2: Клетки, экспрессирующие *AvrLm3-WT*.

Подробное описание настоящего изобретения

Настоящее изобретение основано на идентификации гена *Rlm3* устойчивости к черной ножке, у *Brassica*. Ген кодирует полипептид, обладающий гомологией с белками WAKL10 (Wall-associated receptor kinase-like (киназоподобный рецептор, ассоциированный со стенкой)¹⁰). В частности, были выявлены три открытые рамки считывания, которые участвуют в устойчивости к черной ножке. Идентификация гена *Rlm3* устойчивости к черной ножке является преимуществом, поскольку она позволяет получать растения, такие как трансгенные растения, устойчивые к болезни черной ножки. Кроме того, ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке или полипептид, кодируемый указанным геном, можно использовать в качестве маркера для выявления растений, устойчивых к

болезни черной ножки. Кроме того, детектирующее средство, которое распознает указанный ген устойчивости к черной ножке (такое как праймер или зонд, который связывается с геном) или указанный полипептид (такой как антитело), может использоваться для выявления растений, устойчивых к черной ножке.

Геномная последовательность выявленного гена *Rlm3* устойчивости к черной ножке показана в SEQ ID NO: 1. Ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке имеет различные варианты сплайсинга: один более длинный вариант и два более коротких.

Кодирующая последовательность самой длинной открытой рамки считывания показана в SEQ ID NO: 42 (в настоящем документе она обозначается как *Rlm3-19* или первая открытая рамка считывания). Последовательность кДНК показана в SEQ ID NO: 46. Аминокислотная последовательность полипептида *Rlm3-19* показана в SEQ ID NO: 43.

Кодирующая последовательность второй открытой рамки считывания показана в SEQ ID NO: 4 (в настоящем документе обозначается как *Rlm3-19a*). Последовательность кДНК показана в SEQ ID NO: 9. Аминокислотная последовательность полипептида *Rlm3-19a* показана в SEQ ID NO: 5.

Кодирующая последовательность третьей открытой рамки считывания показана в SEQ ID NO: 44 (в настоящем документе обозначается как *Rlm3-19b*). Последовательность кДНК показана в SEQ ID NO: 47. Аминокислотная последовательность полипептида *Rlm3-19b* показана в SEQ ID NO: 45.

Как указано ниже по тексту настоящего документа, вышеуказанная геномная область, кодирующая последовательности, кДНК и полипептиды могут использоваться для создания растений, устойчивых к черной ножке, путем введения генов в растения, например, путем скрещивания или трансформации. Кроме того, эти гены можно использовать в качестве маркера для выявления растений, устойчивых к черной ножке.

Изобретение относится к последовательностям локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке и к последовательностям, кодирующим белок, придающий устойчивость к черной ножке у Brassicaceae. Белок может содержать аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43, до SEQ ID NO: 5, или с SEQ

ID NO: 45, или функциональный фрагмент этих аминокислотных последовательностей.

Это первый вариант осуществления изобретения, обеспечивающий растение или растительную клетку Brassicaceae, содержащую ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке в виде трансгена, причем указанный ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке содержит кодирующую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 44; или кодирует белок, имеющий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 45.

В еще одном варианте осуществления, указанный ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Например, указанный ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с nt 2106-9496 последовательности SEQ ID NO: 1. Этот участок содержит кодирующую последовательность гена 19, см. Примеры. Альтернативно, указанный ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с nt 2106-4688 последовательности SEQ ID NO: 1. Этот участок содержит кодирующую последовательность гена 19a. Альтернативно, указанный ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с nt 5908-9496 последовательности SEQ ID NO: 1. Этот участок содержит кодирующую последовательность гена 19b.

«Белок Rlm3» или «полипептид Rlm3», при использовании по тексту настоящего документа, обозначает белок, кодированный геном *Rlm3* устойчивости к черной ножке. А Белок Rlm3 может иметь аминокислотную последовательность, который имеет, по меньшей мере, 80%, или, по меньшей мере, 85%, или, по меньшей мере, на 90%, или, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43, с SEQ ID NO: 5, или с SEQ ID NO: 45.

«Функциональный фрагмент» аминокислотной последовательности, имеющий, по меньшей мере, 80% идентичности последовательность с SEQ ID NO: 43, обозначает белок или пептид, содержащий фрагмент или частичную последовательность аминокислотных последовательностей, как показано выше, который по-прежнему выполняет желаемую функцию, т.е. увеличивает устойчивость к черной ножке, при его присутствии в растении Brassicaceae. Анализ на предмет того, повышает ли функциональный фрагмент устойчивость к черной ножке, представлен в настоящем документе в разделе «Примеры», см. Пример 2.

«Черная ножка», при использовании по тексту настоящего документа, относится к заболеванию, вызываемому грибковым патогеном *Leptosphaeria maculans*. или *Phoma lingam* (анаморф). Определение одновременно охватывает изоляты Tox⁰ и Tox⁺, независимо от того, может ли быть установлена их принадлежность к разным видам в ходе более поздних таксономических исследований.

Изоляты *L. maculans* можно отнести к различным группам патогенности (ГП) в зависимости от их конкретного взаимодействия с сортами *B. napus* cultivars Westar, Galcier and Quinta (Mengistu et al. (1991), *Plant Disease* 75: 1279-1282). Изоляты PG4 вызывают появление поврежденных участков в фазе спороношения на всех трех сортах, изоляты PG3 вызывают реакцию устойчивости на семядолях Quinta, а изоляты PG2 вызывают реакцию устойчивости на семядолях Quinta и Glacier. Изоляты PG1 непатогенны для этих хозяев. В источниках изоляты PG2, PG3 и PG4 также называют «высокоагрессивными», «высоковирулентными» или «высокопатогенными» изолятами, а изоляты PG1 называют «неагрессивными», «невирулентными» или «слабопатогенными», при этом высокоагрессивную группу иногда также называют «А», а слабоагрессивную группу называют «NA» (Badawy and Horpe (1989), *J Phytopathology* 127: 146-157). Высокоагрессивная группа отличается от слабоагрессивной выработкой токсинов (изоляты Tox⁺ или изоляты Tox⁰). Было установлено, что изоляты Tox⁰ вызывают некроз сердцевин, не сопровождающийся внешними симптомами, и при этом было высказано предположение, что влияние на потерю урожайности, которое оказывается изолятами Tox⁰, было недооценено (Johnson and Lewis (1994), *Plant Pathology* 43: 269-277). Изоляты Tox⁰ далее делятся еще на три группы: NA1, NA2 и NA3, и при

этом было высказано предположение, что изоляты NA1 преобладают в Европе, а изоляты NA2 имеют большее значение в Канаде (Gall et al. (1995), *Mycol Res* 99: 221-229).

«Ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке» или «ген *Rlm3* устойчивости», или «ген *Rlm3*», при использовании по тексту настоящего документа, представляет собой ген, который придает повышенную устойчивость к *Leptosphaeria maculans* по сравнению с растением, лишенным гена(ов) устойчивости или имеющим нефункциональную (или инактивированную) форму гена(ов). Таким образом, этот ген должен придавать устойчивость к *Leptosphaeria maculans*, в частности, к штамму *Leptosphaeria maculans*, несущему ген авирулентности *AviLm3*, такой как изолят Lm1033-1. Этот ген устойчивости можно перенести в разные сорта *B. napus* и даже в разные виды растений Brassica, например, в *B. juncea*, например, с использованием молекулярных маркеров по настоящему изобретению.

«Повышенная устойчивость» растений, содержащих определенный ген устойчивости, относится к уменьшению повреждений, вызванных грибковой инфекцией (например, *Leptosphaeria maculans*), по сравнению с повреждениями, возникшими в контрольных растениях. Повреждение можно оценить, например, по количеству и размеру листьев, частоте и выраженности стеблевых симптомов, полеганию растений из-за стеблевой инфекции и т.д. В частности, снижение повреждений проявляется в снижении потерь урожайности при выращивании растений под воздействием болезней в полевых условиях по сравнению с контрольными растениями. Такое снижение потерь урожайности может быть, например, связано с тем, что заражение, размножение, распространение или выживание грибка снижается или предотвращается у растений с повышенной устойчивостью. Повышенная устойчивость может также относиться к растениям, которые полностью устойчивы, т.е. к растениям, на которых не обнаружено никаких симптомов заболевания, или к растениям, которые получили самые высокие оценки устойчивости в рамках доступных оценочных или рейтинговых анализов на поражение черной ножкой, например, Kangura et al. (2003 г., Министерство сельского хозяйства Западной Австралии, Farmnote № 6/2003, ISSN 0726-934×).

В одном варианте осуществления ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке, упомянутый в настоящем документе, придает устойчивость к одному или нескольким изолятам *L. maculans*, содержащим ген авирулентности *AvrLm3*, выбранным из группы, включающей изоляты *L. maculans* Lm1033-1, Lm1086-2, Lmu36, Lmu52, Lmu37, Lmu38, Lmu58, Lmu60, Lmu65 и Lmu77-3. Ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке, упомянутый в настоящем документе, придает устойчивость к штамму *Leptosphaeria maculans*, несущему ген авирулентности *AvrLm3*, такому как изолят *Leptosphaeria maculans* Lm1033-1.

Повышенную устойчивость также можно оценить с помощью биоанализов, проводимых в контролируемых средах, таких как камеры выращивания, но в идеале они подтверждаются в ходе полевых испытаний, поскольку оценки в контролируемой среде часто не отражают полевых условий. Это может быть связано с тем, что в биоанализах обычно проверяются лишь немногие отдельные споровые изоляты гриба, в то время как в полевых условиях существует гораздо большее разнообразие популяций патогенов.

Ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке, или ген *Rlm3* может кодировать *Rlm3*-аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, или, по меньшей мере, 85%, или, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43, или с SEQ ID NO: 5, или с SEQ ID NO: 45. Ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке, или ген *Rlm3*, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую, по меньшей мере, 80%, или, по меньшей мере, 85%, или, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 42, или с SEQ ID NO: 4, или с SEQ ID NO: 44. Указанный ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке, или ген *Rlm3* может дополнительно содержать один или более интронов. Кроме того, он может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую, по меньшей мере, 80%, или, по меньшей мере, 85%, или, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности последовательности с nt 2106 -

9496 последовательности SEQ ID NO: 1, с nt 2106-4688 последовательности SEQ ID NO: 1, или nt 5908-9496 последовательности SEQ ID NO: 1.

Для целей предлагаемого изобретения термин «идентичность» или «идентичность последовательности» двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, выраженная в процентном соотношении, относится к количеству позиций в двух оптимально выравниваемых последовательностях с идентичными остатками ($\times 100$), которое делится на количество сравниваемых позиций. Разрыв, то есть положение в выравнивании, где в одной последовательности какой-либо остаток присутствует, а в другой отсутствует, рассматривается как положение с неидентичными остатками. «Оптимальное выравнивание» двух последовательностей находят путем выравнивания двух последовательностей по всей длине в соответствии с алгоритмом глобального выравнивания Нидлмана и Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, *J Mol Biol* 48(3):443-53) в Европейском пакете открытого программного обеспечения для молекулярной биологии (EMBOSS, Rice *et al.*, 2000, *Trends in Genetics* 16(6): 276–277; см., например, <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>) с использованием настроек по умолчанию (штраф за открытие разрыва = 10 (для нуклеотидов) / 10 (для белков) и штраф за расширение пробела = 0,5 (для нуклеотидов) / 0,5 (для белков)). Для нуклеотидов используется матрица замен по умолчанию EDNAFULL, а для белков используется матрица замен по умолчанию EBLOSUM62. Очевидно, что всякий раз, когда нуклеотидные последовательности молекул РНК определяются со ссылкой на нуклеотидные последовательности соответствующих молекул ДНК, тимин (Т) в нуклеотидной последовательности должен быть заменен урацилом (U). Делается ли ссылка на молекулы РНК или ДНК, будет ясно из контекста заявки.

Термин “по меньшей мере, 80%” означает 80% или более, например, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 87%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100%.

Термин “по меньшей мере, 90%” означает 90% или более, например, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% или 100%.

«Жесткие условия гибридизации» можно использовать для идентификации нуклеотидных последовательностей, которые по существу идентичны данной нуклеотидной последовательности. Жесткие условия зависят от последовательности и отличаются в разных ситуациях. Обычно жесткие условия выбирают таким образом, чтобы они были примерно на 5°C ниже температуры плавления (T_m) для конкретных последовательностей при определенной ионной силе и pH. T_m представляет собой температуру (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% целевой последовательности гибридизируется с абсолютно совпадающим зондом. Обычно выбираются строгие условия, при которых концентрация соли составляет порядка 0,02 моля при pH 7 и температуре, по меньшей мере, 60°C. Снижение концентрации соли и/или повышение температуры повышает жесткость. Жесткие условия гибридизации РНК-ДНК (нозерн-блоттинг с использованием зонда размером, например, 100 нуклеотидов) включают в себя, например, такие условия, которые предусматривают, по меньшей мере, одну промывку в 0,2X SSC при 63°C в течение 20 минут или аналогичные условия.

«Условия высокой жесткости» можно обеспечить, например, путем гибридизации при 65°C в водном растворе, содержащем 6x SSC (20x SSC содержит 3,0 М NaCl, 0,3 М натрий-цитрата, pH 7,0), 5x Денхардта (100X Денхардта содержат 2% фикола, 2% поливинилпиролонда, 2% альбумина бычьей сыворотки), 0,5% додецилсульфат натрия (SDS) и 20 мкг/мл денатурированной ДНК-носителя (одноцепочечная ДНК спермы рыб со средней длиной 120–3000 нуклеотидов) в виде неспецифического конкурента. После гибридизации можно провести промывку в условиях высокой строгости в несколько этапов с окончательной промывкой (около 30 мин) при температуре гибридизации в 0,2-0,1× SSC, 0,1% SDS.

«Условия умеренной жесткости» относятся к условиям, эквивалентным гибридизации в описанном выше растворе, но примерно при 60-62°C. Промывку в условиях умеренной жесткости можно проводить при температуре гибридизации в 1x SSC, 0,1% SDS.

«Низкая жесткость» относится к условиям, эквивалентным гибридизации в описанном выше растворе при температуре около 50-52°C. Промывку при низкой жесткости можно проводить при температуре гибридизации в 2x SSC, 0,1% SDS. См. также Sambrook *et al.* (1989) и Sambrook and Russell (2001).

«Локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке», при использовании по тексту настоящего документа, относится к генетическому локусу, который включает ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке. «Локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке» относится к позиции на хромосоме, в которой находится «ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке». Эту позицию можно определить по расположению на генетической карте хромосомы. В это определение включен фрагмент (или сегмент) геномной ДНК хромосомы, на котором расположен локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке. Указанный ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке может быть нативным геном *Rlm3* устойчивости к черной ножке в его нативной хромосомной позиции или трансгеном в хромосомной позиции, в которой он не встречается в природе.

Локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке может включать гены *Rlm3* устойчивости к черной ножке согласно изобретению. В частности, локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке может включать последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, или, по меньшей мере, 85%, или, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, а 92%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Последовательности могут прерываться нетранслируемыми последовательностями, такими как интроны. В одном варианте осуществления, локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с nt 2106 - 9496 последовательности SEQ ID NO: 1, с nt 2106-4688 последовательности SEQ ID NO: 1, или nt 5908-9496 последовательности SEQ ID NO: 1.

В еще одном варианте осуществления, локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке содержит два полинуклеотида:

- a) первый полинуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере,

на 98%, по меньшей мере, на 99% или 100% идентична последовательности нуклеиновой кислоты последовательности SEQ ID NO: 4 или nt 2106-4688 последовательности SEQ ID NO: 1; и

- b) второй полинуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, по меньшей мере, на 99% или 100% идентична последовательности нуклеиновой кислоты последовательности SEQ ID NO: 44 или nt 5908-9496 последовательности SEQ ID NO: 1.

При использовании по тексту настоящего документа, «локус» обозначает позицию, которую ген занимает на хромосоме. «Локус устойчивости к черной ножке» относится к позиции на хромосоме, в которой находится «ген устойчивости к черной ножке». Эту позицию можно определить по расположению на генетической карте хромосомы. В это определение включен фрагмент (или сегмент) геномной ДНК хромосомы, на котором расположен локус устойчивости к черной ножке. Указанный ген устойчивости к черной ножке может быть нативным геном *Rlm3* устойчивости к черной ножке в его нативной хромосомной позиции или трансгеном в хромосомной позиции, в которой он не встречается в природе. Указанный ген устойчивости к черной ножке может представлять собой ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке или другой ген устойчивости к черной ножке. Локус, не содержащий ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке согласно изобретению, который находится в позиции на хромосоме, соответствующем положению, где ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке расположен в устойчивой линии и может называться «локусом *Rlm3* предрасположенности к черной ножке».

Полинуклеотид, содержащий «*Rlm3*-ассоциированную открытую рамку считывания *Rlm3*», кодирует полипептид по настоящему изобретению. Полинуклеотид может содержать экзоны, интроны, нетранслируемые области и т.д. Таким образом, полинуклеотид может содержать нетранслируемые последовательности, такие как интроны и 5'- и 3'-нетранслируемые области. Согласно полинуклеотиду, содержащему «ассоциированную открытую рамку считывания», должен кодировать транскрипт, преобразуемый в мРНК (например,

посредством сплайсинга), которая кодирует полипептиды настоящего изобретения.

Термин «введение» понятен специалистам в данной области. При использовании по тексту настоящего документа этот термин включает любой способ введения гена в растение. В одном варианте осуществления ген *Rlm3* вводится в растение путем скрещивания двух растений. В другом варианте осуществления полинуклеотид *Rlm3* и/или белок *Rlm3* вводят в растение путем скрещивания двух растений, тогда как одно растение содержит полинуклеотид *Rlm3* и/или белок *Rlm3* по настоящему изобретению. Во втором растении может отсутствовать указанный полинуклеотид *Rlm3* и/или белок *Rlm3*. В альтернативном варианте ген вводят путем редактирования гена. Этот термин описан в другом разделе по тексту настоящего документа. В третьем варианте ген вводят путем трансформации. Термин «трансформация», при его использовании в настоящем документе, включает перенос экзогенного полинуклеотида в клетку-хозяин. В настоящее время трансформация растительных видов является широко распространенной технологией. Преимущественно, любой из способов трансформации может использоваться для внедрения интересующего гена в подходящую клетку-предка. Описанные способы трансформации и регенерации растений из тканей и клеток растения могут использоваться для переходной или устойчивой трансформации. Способы трансформации включают использование липосом, электропорацию, химикаты, увеличивающие поглощение свободной ДНК, ввод ДНК непосредственно в растение, обстрел из генной пушки, трансформацию с использованием вирусов, пыльцы или микропроекции. Также может применяться один из способов использования кальция/полиэтиленгликоля для протопластов (Krens, F. A. et al., (1982) Nature 296, 72-74; Negrutiu I et al. (1987) Plant Mol Biol 8: 363-373); электропорация протопластов (Shillito RD et al. (1985) Bio/Technol 3, 1099-1102); микроинъекция в растительный материал (Crossway A et al., (1986) Mol. Gen Genet 202: 179-185); Бомбардировка частицами, покрытыми ДНК или РНК (Klein TM et al., (1987) Nature 327: 70), инфицирование (неинтегративными) вирусами и т.п. Трансгенные растения предпочтительно получают посредством трансформации, опосредованной *Agrobacterium*. Генетически модифицированные клетки растений могут быть регенерированы с помощью любых способов, известных специалистам. После интродукции

растение может быть выбрано на наличие полинуклеотида *Rlm3* и/или белка Rlm3 по настоящему изобретению.

В настоящем документе термин «экспрессируемый в растениях промотор» означает последовательность ДНК, которая способна контролировать (инициировать) транскрипцию в растительной клетке. Сюда включается любой промотор растительного происхождения, а также любой промотор нерастительного происхождения, который способен направлять транскрипцию в растении клетки, т.е. определенные промоторы вирусного или бактериального происхождения, такие как CaMV35S (Harpster *et al.* (1988) *Mol Gen Genet.* 212(1):182-90, промотор вируса клевера подземного № 4 или № 7 (WO9606932) или промоторы гена Т-ДНК, а также тканеспецифичные или органоспецифические промоторы, включая, помимо прочего, семяспецифичные промоторы (например, WO89/03887), промоторы, специфичные для зачатков органов (An *et al.* (1996) *Plant Cell* 8(1):15 - 30), специфичные для стебля промоторы (Keller *et al.*, (1988) *EMBO J.* 7(12): 3625-3633), специфичные для листьев промоторы (Hudspeth *et al.* (1989) *Plant Mol Biol.* 12: 579-589), специфичные для мезофила промоторы (такие как индуцируемые светом промоторы Рубиско), специфичные для корня промоторы (Keller *et al.* (1989) *Genes Dev.* 3: 1639-1646), специфичные для клубней промоторы (Keil *et al.* (1989) *EMBO J.* 8(5): 1323-1330), специфичные для сосудистой ткани промоторы (Peleman *et al.* (1989) *Gene* 84: 359-369), селективные к тычинкам промоторы (WO 89/10396, WO 92/13956), промоторы, специфичные для зоны раскрытия (WO 97/13865) и т.п.

Подходящими для изобретения промоторами являются конститутивные промоторы, экспрессируемые в растениях. Конститутивные промоторы, экспрессируемые в растениях, хорошо известны в данной области и включают промотор CaMV35S (Harpster *et al.* (1988) *Mol Gen Genet.* 212(1):182-90), актиновые промоторы, такие как, например, промотор из гена актина риса (McElroy *et al.*, 1990, *Plant Cell* 2:163), промотор вируса мозаики прожилок маниоки (Verdaguer *et al.*, 1996 *Plant Mol. Biol.* 31: 1129), промотор галактоолигосахариды (de Pater *et al.*, 1992, *Plant J.* 2:837), промотор гистона H3 (Chaubet *et al.*, 1986, *Plant Mol Biol* 6:253), промотор нопалинсинтазы (Nos) *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker *et al.*, 1982, *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 561), или

промоторы убиквитина, такие как, например, промотор гена убиквитин-1 кукурузы (Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18:675).

Дополнительным промотором, подходящим для настоящего изобретения, является эндогенный промотор, управляющий экспрессией гена, кодирующего белок Rlm3.

Термин «область терминации транскрипции и полиаденилирования», при использовании по тексту настоящего документа, обозначает последовательность, которая управляет расщеплением образующейся РНК, после чего к 3'-концу полученной РНК добавляется поли(А)-хвост, который является функциональным в растительных клетках. Сигналы терминации транскрипции и полиаденилирования, являющиеся функциональными в растительных клетках, включают, помимо прочего, 3'nos, 3'35S, 3'his и 3'g7.

Термин «растение», при использовании по тексту настоящего документа, предпочтительно относится к растению Brassicaceae, такому как растение Brassica.

«Brassicaceae» или «растение Brassicaceae», при использовании по тексту настоящего документа, относится к растениям, принадлежащим к семейству растений Brassicaceae, также известному как крестоцветные или семейство горчичных. Примерами Brassicaceae являются, помимо прочего, виды *Brassica*, такие как *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Brassica carinata*, *Brassica nigra*, и *Brassica juncea*; виды *Raphanus*, такие как *Raphanus caudatus*, *Raphanus raphanistrum*, и *Raphanus sativus*; виды *Matthiola*; виды *Cheiranthus*; виды *Camelina*, такие как *Camelina sativa*; виды *Crambe*, такие как *Crambe abyssinica* и *Crambe hispanica*; виды *Eruca*, такие как *Eruca vesicaria*; виды *Sinapis* такие как *Sinapis alba*; виды *Diplotaxis*; виды *Lepidium*; виды *Nasturtium*; виды *Orychophragmus*; виды *Armoracia*, виды *Eutrema*; виды *Lepidium*; и виды *Arabidopsis*.

«Растение *Brassica*» относится к аллотетраплоиду или амфидиплоиду *Brassica napus* (ААСС, 2n=38), *Brassica juncea* (ААВВ, 2n=36), *Brassica carinata* (ВВСС, 2n=34) или к диплоиду *Brassica rapa* (син. *B. campestris*) (АА, 2n=20), *Brassica oleracea* (СС, 2n=18) или *Brassica nigra* (ВВ, 2n=16).

В одном из вариантов осуществления растением является *Brassica napus*. Например, растение может быть представлено сортом *Brassica napus* (сорт) Вестар или сортом *Brassica napus* Дармор. Оба сорта восприимчивы к черной ножке (см. Примеры). В другом варианте осуществления растением является *Brassica oleracea*. В другом варианте осуществления растением является *Brassica rapa*. В другом варианте осуществления растением является *Brassica nigra*. В другом варианте осуществления растением является *Brassica juncea*. В другом варианте осуществления растением является *Brassica carinata*.

Как указано выше, выявленные белки Rlm3 демонстрируют гомологию с белками WAKL10 (Киназоподобные рецепторы, связанные со стенками 10). Белки WALK10 представляют собой серин/треонин-протеинкиназу, которая может действовать как сигнальный рецептор компонента внеклеточного матрикса. Соответственно, белок Rlm3, как указано в настоящем документе, такой как белок, содержащий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 45 (или их варианты), может обладать киназной активностью. В частности, он может обладать серин/треонин-протеинкиназной активностью. Серин/треонин-протеинкиназа (EC 2.7.11.-) представляет собой киназный фермент, который фосфорилирует группу ОН серина или треонина.

Не привязываясь к теории, считается, что полипептид *Rlm3* по изобретению действует как рецептор, который распознает возбудителя черной ножки и активирует механизм устойчивости посредством своей киназной активности.

Другой целью изобретения является создание способа повышения устойчивости к черной ножке у растения Brassicaceae, причем указанный способ включает введение или предоставление гена *Rlm3* устойчивости к черной ножке по изобретению в качестве трансгена растительной клетки Brassicaceae для создания трансгенных клеток; и регенерацию трансгенных растений из указанных трансгенных клеток.

Трансген может быть введен в растение или растительную клетку с использованием способов, хорошо известных в данной области. Способы введения генов в растительные клетки для создания трансгенных растений не

считаются критически важными для настоящего изобретения, в связи с чем может использоваться любой способ обеспечения растительных клеток трансгеном, подходящим для конкретного вида растений. Такие способы хорошо известны в данной области техники и включают опосредованную *Agrobacterium* трансформацию, доставку частиц пистолетом, микроинъекцию, электропорацию интактных клеток, опосредованную полиэтиленгликолем трансформацию протопластов, электропорацию протопластов, опосредованную липосомами трансформацию, трансформацию, опосредованную кремниевыми усами и т.д. Указанный трансген может стабильно интегрироваться в геном указанной растительной клетки, в результате чего происходит ее трансформация. Полученные таким образом трансформированные растительные клетки затем можно регенерировать в зрелые фертильные трансформированные растения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения ген *Rlm3* устойчивости по настоящему изобретению вводят в растение с помощью редактирования генома. Соответственно, предусмотрен способ производства растения, устойчивого к черной ножке, (например, растение Brassica), включающий введение гена *Rlm3* устойчивости в растение, не содержащее функционального гена *Rlm3* устойчивости, с применением редактирования генома.

В другом варианте осуществления, растение, устойчивое к черной ножке, получают путем введения в геном этого растения двух полинуклеотидов, содержащих *Rlm3*-ассоциированную открытую рамку считывания. Первый полинуклеотид, содержащий *Rlm3*-ассоциированную открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбран из группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, по меньшей мере, на 99% или, по меньшей мере, на 100% идентична аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 5;
- b) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей

мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 4;

с) частичной последовательности пункта а) или б).

В дополнение, второй полинуклеотид, содержащий *Rlm3*-ассоциированную открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, вводят в геном того растения, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, по меньшей мере, на 99% или, по меньшей мере, на 100% идентична аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 45;

б) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 44;

с) частичной последовательности пункта а) или б).

В одном варианте осуществления, растение, не содержащее функциональный ген *Rlm3* устойчивости, представляет собой растение, содержащее молчащий аллель гена, кодирующего полипептид, содержащий *Rlm3*-ассоциированную открытую рамку считывания.

Способ согласно настоящему изобретению, придающий растению устойчивость к черной ножке, включающий этап генетического модифицирования молчащего аллеля гена, кодирующего полипептид, содержащий *Rlm3*-ассоциированную открытую рамку считывания, таким образом, что молчащий аллель способен экспрессировать указанный полипептид,

причем указанная *Rlm3*-ассоциированная открытая рамка считывания кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 43, 5 и 45;
- b) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 43, 5 и 45, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
- c) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 42, 4 и 44, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
- d) частичной последовательности любого из пунктов а) - с), причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке.

В одном варианте осуществления вышеуказанного способа, молчащий аллель модифицируется путем гомологичной рекомбинации или с помощью технологии редактирования генома.

Термин «молчащий аллель», при использовании по тексту настоящего документа, относится к аллелю, который не придает устойчивости к черной ножке. Молчащий аллель может отличаться от аллеля *Rlm3* тем, что ген отсутствует, ген не экспрессируется, или ген кодирует другой белок.

Редактирование генома, также называемое редактированием гена, геномной инженерией, при использовании по тексту настоящего документа, относится к целенаправленной модификации геномной ДНК, при которой ДНК

может быть вставлена, удалена, модифицирована или заменена в геноме. При редактировании генома можно использовать специфичные для последовательности ферменты (такие как эндонуклеаза, нуклеазы, ферменты преобразования оснований) и/или донорские нуклеиновые кислоты (например, дцДНК, олигонуклеотиды) для внесения желаемых изменений в ДНК. Специфичные для последовательностей нуклеазы, которые можно запрограммировать на распознавание конкретных последовательностей ДНК, включают мегануклеазы (MGN), нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), TAL-эффекторные нуклеазы (TALEN) и РНК- или ДНК-ориентированные нуклеазы, такие как Cas9, Cpf1, CasX, CasY, C2c1, C2c3, некоторые системы на основе аргонатов (see e.g. Osakabe and Osakabe, *Plant Cell Physiol.* 2015 Mar;56(3):389-400; Ma et al, *Mol Plant.* 2016 Jul 6;9(7):961-74; Bortesi et al, *Plant Biotech J.* 2016, 14; Murovec et al, *Plant Biotechnol J.* 15:917- 926, 2017; Nakade et al, *Bioengineered* Vol 8, No.3:265-273, 2017; Burstein et al, *Nature* 542, 37-241; Komor et al, *Nature* 533, 420-424, 2016; все они включены в настоящий документ посредством отсылки). Донорские нуклеиновые кислоты можно использовать в качестве матрицы для восстановления разрыва ДНК, индуцированного нуклеазой, специфической для последовательности. Донорские нуклеиновые кислоты также можно использовать как таковые для редактирования генома без индукции разрыва ДНК, чтобы внести желаемые изменения в геномную ДНК.

В еще одном варианте осуществления предусмотрен способ повышения устойчивости к черной ножке у растения Brassicaceae, включающий этап введения локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке в указанное растение Brassicaceae и отбора указанного устойчивого к черной ножке растения Brassicaceae на наличие локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке путем анализа геномной ДНК указанного растения на наличие хотя бы одного молекулярного маркера, при этом указанный по крайней мере один молекулярный маркер связан с локусом *Rlm3* устойчивости к черной ножке, причем указанный локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке содержит ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке, причем указанный ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке содержит последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, или nt 2106 - 9496, или nt 2106-4688, или nt 5908-9496 последовательности SEQ ID NO: 1; кодирующая последовательность,

имеющую не менее 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 4, или с SEQ ID NO: 44; или кодирующая белок, имеющий, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 45, такой как локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке, содержащий последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Указанный способ может включать получение первого растения Brassicaceae, содержащего локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке, получение второго растения Brassicaceae, лишенного локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке, скрещивание первого растения Brassicaceae со вторым растением Brassicaceae для получения потомства растения Brassicaceae; анализ указанного потомства растения Brassicaceae для определения наличия локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке путем анализа геномной ДНК растения на наличие, по меньшей мере, одного молекулярного маркера, причем указанный, по меньшей мере, один молекулярный маркер связан с локусом *Rlm3* устойчивости к черной ножке; и отбор потомства Brassicaceae, которое дает положительный результат теста на наличие локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке, как растения Brassicaceae, в которое был интрогрессирован локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке. Указанное первое растение Brassicaceae можно получить путем скрининга популяции растений Brassicaceae на наличие локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке путем анализа геномной ДНК растения или, по меньшей мере, на один молекулярный маркер, причем указанный, по меньшей мере, один молекулярный маркер связан с локусом *Rlm3* устойчивости к черной ножке. Указанное первое растение Brassicaceae и указанное потомство Brassicaceae могут представлять собой *Brassica rapa*; и первое растение Brassicaceae, и указанное потомство растения Brassicaceae могут представлять собой *Brassica napus*, или указанное первое растение Brassicaceae может быть *Brassica rapa*, а указанное второе растение Brassicaceae может быть *Brassica oleracea*, и указанное потомство растения Brassicaceae может быть растением *Brassica napus*, полученным в результате межвидового скрещивания между указанными первым и указанным вторым растением Brassicaceae.

В еще одном варианте осуществления предложен способ получения устойчивого к черной ножке растения Brassicaceae, включающий этапы идентификации устойчивого к черной ножке растения Brassicaceae, содержащего

локус устойчивости к черной ножке согласно изобретению, путем анализа геномной ДНК указанного растения на наличие, по меньшей мере, одного молекулярного маркера, причем указанный, по меньшей мере, один молекулярный маркер связан с указанным локусом *Rlm3* устойчивости к черной ножке, и производит потомство от указанного устойчивого к черной ножке растения Brassicaceae, причем указанное потомство является устойчивым к черной ножке и содержит указанный локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке. В еще одном варианте осуществления указанный локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. В качестве альтернативы, указанный локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности 2106 - 9496, или nt 2106-4688, или nt 5908-9496 последовательности SEQ ID NO: 1.

«Молекулярный маркер» или «маркер», при использовании по тексту настоящего документа, относится к полиморфному локусу, т.е. полиморфному нуклеотиду (так называемый однонуклеотидный полиморфизм или ОНП) или полиморфной последовательности ДНК (которая может представлять собой вставку или удаление специфической последовательности ДНК в определенном локусе или полиморфные последовательности ДНК). Маркер относится к измеримой генетической характеристике с фиксированным положением в геноме, которая обычно наследуется по менделевскому принципу и которую можно использовать для картирования интересующего признака. Таким образом, молекулярный маркер может представлять собой короткую последовательность ДНК, такую как последовательность, окружающую изменение одной пары оснований, т.е. однонуклеотидный полиморфизм или ОНП, или длинную последовательность ДНК, такую как микросателлиты или простые повторяющиеся последовательности (ППП). Природа маркера зависит от используемого молекулярного анализа и может быть определена на уровне ДНК, РНК или белка. Генетическое картирование может выполняться с использованием молекулярных маркеров, таких как, помимо прочего, RFLP (полиморфизмы длины рестрикционных фрагментов; Botstein *et al.* (1980), *Am J Hum Genet* 32:314-331; Tanksley *et al.* (1989), *Bio/Technology* 7:257-263), RAPD [random amplified

polymorphic DNA; Williams *et al.* (1990), NAR 18:6531-6535], AFLP [Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos *et al.* (1995) NAR 23:4407-4414]. Подходящие праймеры или зонды определяются используемым методом картирования.

Термин «маркерный аллель» относится к версии маркера, которая присутствует в конкретном растении на одной из хромосом. Обычно маркер может существовать в виде или, как можно сказать, может иметь или содержать два маркерных аллеля. Термин «гаплотип», при использовании по тексту настоящего документа, относится к конкретной комбинации маркерных аллелей, присутствующих в определенном растении или группе (родственных) растений. Согласно описанию в настоящем документе, маркерный аллель может представлять собой версию маркера, которая присутствует в линии устойчивости (маркерный аллель *Rlm3* устойчивости к черной ножке). Вариант того же маркера, который присутствует в восприимчивой линии, можно назвать маркерным аллелем *Rlm3* предрасположенности к черной ножке.

Термин «AFLP®» (AFLP® является зарегистрированной торговой маркой KeyGene NV, Вагенинген, Нидерланды), «анализ AFLP» и «маркер AFLP» используются в соответствии со стандартной терминологией (Vos *et al.* (1995), NAR 23:4407-4414; EP0534858). Вкратце, анализ AFLP представляет собой фингерпринт-метод снятия отпечатков ДНК, который позволяет обнаружить несколько рестрикционных фрагментов ДНК посредством ПЦР-амплификации. Технология AFLP обычно включает следующие этапы: (i) рестрикция ДНК двумя рестрикционными энзимами, предпочтительно гекса- и тетра-каттером, такими как EcoRI, PstI и MseI; (ii) лигирование двухцепочечных адаптеров к концам рестрикционных фрагментов, таких как адаптеры EcoRI, PstI и MseI; (iii) амплификация подмножества рестрикционных фрагментов с использованием двух праймеров, комплементарных последовательностям адаптера и сайта рестрикции, удлиненных на их 3'-концах одним-трем «селективными» нуклеотидами, т.е. селективная амплификация достигается за счет использования праймеров, которые простираются до рестрикционных фрагментов, амплифицируя только те фрагменты, в которых удлинения праймеров соответствуют нуклеотидам, фланкирующим сайты рестрикции. Таким образом, праймеры AFLP имеют определенную последовательность, и каждый праймер AFLP имеет определенный код; (iv) гель-электрофорез амплифицированных

рестрикционных фрагментов на денатурирующих слоях геля или капиллярах; (v) визуализация отпечатков ДНК с помощью автордиографии, фосфорной визуализации или других методов. Используя этот метод, наборы рестрикционных фрагментов можно визуализировать с помощью ПЦР без знания нуклеотидной последовательности. Маркер AFLP, при использовании по тексту настоящего документа, представляет собой фрагмент ДНК определенного размера, который создается и визуализируется в виде полосы на геле при проведении анализа AFLP. Каждый маркер AFLP обозначается комбинацией праймеров, использованной для его амплификации, за которой следует приблизительный размер (в парах оснований) амплифицированного фрагмента ДНК. Предполагается, что размер этих фрагментов может незначительно варьироваться в зависимости от лабораторных условий и используемого оборудования. При любом упоминании в настоящем документе маркера AFLP посредством ссылки на комбинацию праймеров и конкретный размер фрагмента, следует понимать, что такой размер является приблизительным и включает или предусматривает включение небольших вариаций, наблюдаемых в разных лабораториях. Каждый отдельный маркер AFLP представляет собой определенный локус генома.

Термин «ППП» относится к простым повторяющимся последовательностям или микросателлитам [Tautz *et al.* (1989), *NAR* 17:6463-6471]. Участки коротких простых последовательностей встречаются как часто повторяющиеся элементы во всех геномах эукариот. Локусы простых последовательностей обычно демонстрируют обширные полиморфизмы длины. Эти простые полиморфизмы длины последовательности (SSLP) можно обнаружить с помощью анализа полимеразной цепной реакции (ПЦР) и использовать для проверки идентичности, популяционных исследований, анализа сцепления и картирования генома.

Предполагается, что молекулярные маркеры могут быть преобразованы в другие типы молекулярных маркеров. При упоминании конкретного молекулярного маркера в настоящем изобретении, следует понимать, что это определение охватывает другие типы молекулярных маркеров, используемых для обнаружения генетической вариации, первоначально идентифицированной с помощью конкретных молекулярных маркеров. Например, если маркер AFLP

конвертируется в другой молекулярный маркер с использованием известных методов, этот другой маркер включается в определение. Например, маркеры AFLP могут быть преобразованы в маркеры, специфичные для последовательности, такие как, помимо прочего, маркеры STS (секвенированный-меченный сайт) или SCAR (амплифицированная область, охарактеризованная последовательностью), используя стандартную технологию, как описано в Meksem *et al.* [(2001), *Mol Gen Genomics* 265(2):207-214], Negi *et al.* [(2000), *TAG* 101:146-152], Barret *et al.* (1989), *TAG* 97:828-833], Xu *et al.* [(2001), *Genome* 44(1):63-70], Dussel *et al.* [(2002), *TAG* 105:1190-1195] или Guo *et al.* [(2003), *TAG* 103:1011-1017]. Например, Dussel *et al.* [(2002), *TAG* 105:1190-1195], преобразованные маркеры AFLP, связанные с устойчивостью, в маркеры сайтов с меткой последовательностей на основе ПЦР, такие как маркеры indel (вставка/удаление) и маркеры CAPS (расщепленная амплифицированная полиморфная последовательность).

Подходящими молекулярными маркерами являются, например, маркеры ОНП (однонуклеотидные полиморфизмы), маркеры AFLP, микросателлиты, минисателлиты, маркеры случайной амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD), маркеры RFLP, маркеры амплифицированных областей, охарактеризованных последовательностью (SCAR) и другие, такие как маркеры TRAP, описанные в работе Hu *et al.* 2007, *Genet Resour Crop Evol* 54: 1667-1674).

Способы и анализы для обнаружения маркеров или анализа геномной ДНК на наличие маркера широко известны в данной области. Присутствие маркера можно, например, обнаружить методами, основанными на гибридизации (например, аллель-специфической гибридизацией), с использованием методов Taqman, Invader, методов на основе ПЦР, методов на основе лигирования олигонуклеотидов или методов на основе секвенирования.

Полезным анализом для обнаружения маркеров ОНП является, например, конкурентная аллель-специфическая ПЦР KBioscience. Для разработки анализа аллель-специфической ПЦР выбираются 70 пар оснований выше и 70 пар оснований ниже ОНП и разрабатываются два аллель-специфичных прямых праймера и один аллель-специфичный обратный праймер. Для получения информации по методу анализа аллель-специфической ПЦР см., например, Allen *et al.* 2011, *Plant Biotechnology J.* 9, 1086-1099, в частности, с. 1097-1098.

«Молекулярный маркер, связанный с локусом *Rlm3* устойчивости к черной ножке», или «молекулярный маркер, связанный с наличием локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке», при использовании по тексту настоящего документа, относится к молекулярному маркеру в области генома, который наследует локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке как единую генетическую единицу, по меньшей мере, в 50% случаев. Таким образом, в этом отношении термин «связанный» может означать расстояние около 50 сМ или меньше, например, около 40 сМ, около 30 сМ, около 20 сМ, около 10 сМ, около 7,5 сМ, около 6 сМ, около 5 сМ, около 4 сМ, около 3 сМ, около 2,5 сМ, около 2 сМ или даже меньше.

«Молекулярный маркер, связанный с локусом *Rlm3* устойчивости к черной ножке», или «молекулярный маркер, связанный с наличием локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке» также может быть маркером, расположенным в последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1, например, в области nt 2106 с nt 9496 последовательности SEQ ID NO: 1, или в области nt 2106-4688, или nt 5908-9496 последовательности SEQ ID NO: 1.

Подходящими являются маркеры, которые связаны с локусом *Rlm3* устойчивости к черной ножке, и которые можно разработать с использованием способов, известных в данной области. Новые маркеры, подходящие для настоящего изобретения, могут разрабатываться на основе последовательности *Rlm3*. Предполагается, что такие маркеры могут разрабатываться путем сравнения последовательности локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке из устойчивой линии Brassicaceae с последовательностью того же локуса в восприимчивой линии Brassicaceae; выявления специфической области последовательности в локусе *Rlm3* устойчивости к черной ножке, которая не встречается в соответствующем локусе восприимчивой линии Brassicaceae. Таким образом, молекулярный маркер, связанный с локусом *Rlm3* устойчивости к черной ножке, может представлять собой маркер, определяющий наличие локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке, или может быть маркером, непосредственно определяющим наличие последовательности по последовательности SEQ ID NO: 1. Молекулярный маркер, связанный с локусом *Rlm3* устойчивости к черной ножке, также может быть представлен маркером в последовательностях, фланкирующих локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке, который полиморфен

между линиями, содержащими локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке, и линиями, в которых отсутствует локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке, но при этом он наследует локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке как единую генетическую единицу, по меньшей мере, в 50% случаев.

Маркеры, подходящие для определения присутствия локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке, может быть представлен маркером, который связан с локусом *Rlm3* устойчивости к черной ножке.

Отсутствие локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке можно определить по отсутствию маркерных аллелей, связанных с наличием локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке (маркерные аллели *Rlm3* устойчивости к черной ножке). Кроме того, маркеры, подходящие для определения отсутствия локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке, могут быть представлены маркерными аллелями, привязанными к локусу *Rlm3* предрасположенности к черной ножке (маркерные аллели *Rlm3* предрасположенности к черной ножке).

Анализ на наличие маркеров по изобретению можно проводить с использованием первого и второго праймеров и, в некоторых случаях, зонда, выбранных из группы олигонуклеотидов, состоящей из первого праймера, состоящего из последовательности от 15 до 30 нуклеотидов, или от 15 до 25 нуклеотидов, или от 18 до 22 нуклеотидов генов *Rlm3* устойчивости к черной ножке согласно изобретению, причем второй праймер комплементарен последовательности из 15 - 30 нуклеотидов, или из 15 - 25 нуклеотидов, или из 18-22 нуклеотидов генов *Rlm3* устойчивости к черной ножке согласно изобретению, и причем расстояние между указанным первым и указанным вторым праймерами на гене *Rlm3* устойчивости к черной ножке находится в диапазоне между 1 и 400 основаниями или между 1 и 150 основаниями, и причем первый праймер расположен относительно кодирующей последовательности *Rlm3* выше указанного второго праймера, и зонд, который идентичен, по меньшей мере, 15 нуклеотидам, или, по меньшей мере, 18 нуклеотидам, но не более чем 25 нуклеотидам или не более 22 нуклеотидам последовательности гена *Rlm3* устойчивости к черной ножке между указанным первым и указанным вторым праймерами, при условии, что либо последовательность первого праймера, либо последовательность второго праймера, либо последовательность указанного зонда не присутствует в соответствующем локусе восприимчивого растения

Brassicaceae. Указанный зонд может быть помечен, например, согласно описанию в патенте США 5,538,848.

Анализ на наличие маркеров по изобретению можно проводить с использованием первого и второго праймеров согласно описанию выше, распознающих как последовательность *Rlm3*, так и соответствующий локус в восприимчивой линии Brassicaceae, первого зонда, распознающего последовательность гена *Rlm3* устойчивости к черной ножке согласно описанию выше, но не распознающего последовательность между указанным первым и указанным вторым праймером в восприимчивой линии Brassicaceae, и второго зонда, распознающего последовательность между указанным первым и указанным вторым праймером в восприимчивой линии Brassicaceae, но не гена *Rlm3* устойчивости к черной ножке, и причем указанная метка первого зонда отличается от метки второго зонда.

Другими подходящими праймерами для анализа присутствия маркеров согласно изобретению являются первый праймер, распознающий как последовательность *Rlm3*, так и соответствующий локус в восприимчивой линии Brassicaceae, второй праймер, распознающий последовательность *Rlm3*, но не соответствующий локус в восприимчивой линии Brassicaceae, и третий праймер, распознающий соответствующий локус в восприимчивой линии Brassicaceae, но не последовательность *Rlm3*. Указанный второй и третий праймеры могут быть помечены, как указано выше, и указанный второй праймер может содержать метку, отличную от указанного третьего праймера.

Идентификация продуктов ПЦР, специфичных для генов *Rlm3* устойчивости к черной ножке и соответствующего локуса в восприимчивой линии Brassicaceae может выполняться, например, посредством оценки размера после проведения гель- или капиллярного электрофореза (например, для локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке и для соответствующего локуса в восприимчивой линии Brassicaceae, содержащего ряд вставленных или удаленных нуклеотидов, что приводит к разнице в размерах между фрагментами, амплифицированными из локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке, и для соответствующего локуса восприимчивых Brassicaceae, так что указанные фрагменты можно визуально разделить на геле); посредством оценки наличия или отсутствия двух разных фрагментов после проведения гель- или капиллярного электрофореза, при этом

диагностическая ПЦР-амплификация локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке в некоторых случаях может выполняться отдельно от диагностической ПЦР-амплификации соответствующего локуса в восприимчивой линии; посредством прямого секвенирования амплифицированных фрагментов; или методами обнаружения на основе флуоресценции.

Дополнительный вариант осуществления относится к растениям или растительным клеткам Brassicaceae, полученным способами согласно изобретению, таким как растения *Brassica napus*, *Brassica juncea*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Brassica nigra* или *Brassica carinata*.

В еще одном варианте осуществления предложено устойчивое к черной ножке растение или растительная клетка Brassicaceae согласно изобретению, которые содержат ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке согласно изобретению, и, по меньшей мере, один другой ген устойчивости к заболеванию, причем указанный другой ген устойчивости к заболеванию выбран из группы, состоящей из гена устойчивости к киле, дополнительного гена устойчивости к черной ножке, гена устойчивости к белой гнили, гена устойчивости к вертициллезу, гена устойчивости к фузариозу, гена устойчивости к желтухе астр, гена устойчивости к альтернариозу и гена устойчивости к серой пятнистости стеблей. В еще одном варианте осуществления указанный ген устойчивости к другому заболеванию представляет собой трансген, который генетически связан с указанным геном *Rlm3* устойчивости к черной ножке по настоящему изобретению.

Указанным геном устойчивости к киле может быть *Crr2*, *Crr4*, *Crr3*, *CRk*, *CRc*, *CR2a*, *CR2b*, *pb-3*, *pb-4*, *Pb-Bo1*, *Pb-Bo2*, *Pb-Bo3*, *Pb-Bo4*, *Pb-Bo5a*, *Pb-Bo5b*, *Pb-Bo8*, *Pb-Bo9a*, *Pb-Bo9b*, *Pb-Bn1*, *PbBn-01:60-1*, *PbBn-01:60-2*, *PbBn-01:60-3*, *PbBn-01:60-4*, *PbBn-01:07-1*, *PbBn-01:07-2*, *PbBn-01:07-3*, *PbBn-e4x04-1*, *PbBn-a-1*, *PbBn-l-1*, *PbBn-l-2*, *PbBn-k-1*, *PbBn-k-2*, *PbBn-k-3*, *PbBn-Korp-1*, *PbBn-Korp-2*, *PbBn-Korp-3*, *PbBn-Korp-4*, *PbBn-Korp-5*, как описано в работе Piao (Piao et al., 2009, J Plant Growth Regul 28: 252), или же он может представлять собой ген *CRa*, как описано в работе Ueno et al. (Ueno et al., 2012, Plant Mol Biol 80: 621), ген *Crr1*, как описано в работе Hatakeyama et al., (Hatakeyama et al., 2013, PLOS one 8: e54745) и в WO2012/039445, или ген *CRb*, как описано в работе Kato et al., (Kato et al., 2013, Breeding Science 63: 116) (которые включены в настоящий документ посредством отсылки). Кроме того, указанный ген устойчивости к киле может

представлять собой ген CLR1 или CLR2, как описано в WO 2017/102923 A1 (включенной в настоящий документ посредством отсылки).

Указанный дополнительный ген устойчивости к черной ножке может, например, представлять собой BLMR1 и BLMR2 (WO 2011/044694), LepR3 (Larkan et al., 2013, New Phytol 197:595 и WO 2008/101343), или Lem-08-syl (EP 1547462 и US 2005/0142122). Кроме того, указанным дополнительным геном устойчивости к черной ножке может быть Rlm1, Rlm2, Rlm4, Rlm5, Rlm6, Rlm7, Rlm8, Rlm9, Rlm10, Rlm11, RlmJ1, RlmS, LepR1, LepR2, LepR4, LmJR1 или LmJR2 (Larkan et al., 2016, выше).

В одном варианте осуществления предусмотрено устойчивое к черной ножке растение Brassicaceae или растительная клетка согласно изобретению, содержащие ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке согласно изобретению и, по меньшей мере, один дополнительный ген устойчивости к черной ножке, выбранный из группы, состоящей из *Rlm4*, *Rlm7* и *Rlm9*. Введение дополнительных генов устойчивости к черной ножке в одно растение или растительную клетку имеет особые преимущества, поскольку по имеющейся информации гены R передают расоспецифическую устойчивость к *L. maculans* благодаря их взаимодействию со специфическими генами авирулентности *L. maculans*. При использовании по тексту настоящего документа ген *Rlm4* относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, по меньшей мере, на 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 32. При использовании по тексту настоящего документа ген *Rlm7* относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, по меньшей мере, на 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 35. При использовании по тексту настоящего документа ген *Rlm9* относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий аминокислотную

последовательность, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, по меньшей мере, на 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 38.

Ген устойчивости к белой гнили может представлять собой ген устойчивости к белой гнили согласно описанию в WO 2005/090578.

Указанный другой ген устойчивости к заболеванию может присутствовать в нативной хромосомной позиции. Например, указанные другие гены устойчивости к болезням могут быть введены путем интрогрессии в растение согласно изобретению из сорта или вида, от которого они произошли.

Ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке по изобретению может быть перенесен в другую позицию в геноме растения, в котором он генетически связан с другим представляющим интерес признаком, таким как другой ген устойчивости к заболеванию согласно описанию в настоящем документе.

Предполагается, что условия окружающей среды, такие как местоположение, погодные условия и уровень заболеваемости, а также индивидуальное восприятие человека, оценивающего симптомы заболевания, могут влиять на оценку устойчивости к черной ножке. Следовательно, изменение этих факторов в сравнительных испытаниях должно быть сведено к минимуму. Любые другие показатели устойчивости, известные в данной области, можно применять в соответствии с данным изобретением для сравнения растений по изобретению с контрольными растениями.

Способы оценки того, является ли растение устойчивым (или восприимчивым), хорошо известны в данной области. Кроме того, это описано в разделе «Примеры», см. Пример 2. Например, можно применять систему оценок по шкале от 1 до 9, где 1 – это предрасположенность, а 9 – устойчивость. Кроме того, система оценок описана в работе Kangura et al. (2003, Department of Agriculture, Western Australia, Farmnote No. 6/2003, ISSN 0726-934×).

В еще одном варианте осуществления указанный ген устойчивости к другому заболеванию представляет собой трансген, который генетически связан с геном устойчивости к черной ножке. При использовании по тексту настоящего

документа под трансгеном понимается ген, который стабильно интегрирован в растительную клетку в другой позиции по сравнению с той, в которой он встречается в природе. Трансген может, например, быть интегрирован в геном растительной клетки или присутствовать на искусственной хромосоме. Трансген может, например, представлять собой ген, введенный в вид или сорт растения, в котором он не встречается в природе, или это может быть ген, введенный в растительный вид или сорт, в котором он встречается в природе, но в другой хромосомной позиции. Трансген может, но не обязательно должен, быть химерным геном. Трансген может, например, содержать кассету экспрессии, содержащую кодирующую последовательность, связанную с его эндогенным промотором. Трансген также может, например, содержать кодирующую последовательность, связанную с гетерологичным промотором. Таким образом, ген устойчивости к черной ножке может быть функционально связан с указанным гетерологичным промотором.

Термин «гетерологичный» полинуклеотид, при использовании по тексту настоящего документа, относится к полинуклеотиду, который не является нативным для клетки-хозяина. Термин «гетерологичный» полинуклеотид также относится к полинуклеотиду, нативному для клетки-хозяина, но со структурными модификациями (например, удалениями, заменами и/или вставками) в результате манипуляций с ДНК клетки-хозяина методами рекомбинантной ДНК для изменения нативного полинуклеотида. «Гетерологичный» полинуклеотид также относится к полинуклеотиду, нативному для клетки-хозяина, экспрессия которого количественно изменена в результате манипулирования регуляторными элементами полинуклеотида с помощью методов рекомбинантной ДНК (например, более сильный промотор), а также к полинуклеотиду, нативному для клетки-хозяина, но интегрированному не в ее естественную генетическую среду в результате генетических манипуляций с помощью методов рекомбинантной ДНК. В отношении двух или более полинуклеотидных последовательностей или двух или более аминокислотных последовательностей термин «гетерологичный» используется для характеристики того, что две или более полинуклеотидные последовательности или две или более аминокислотные последовательности не встречаются в природе в конкретной комбинации друг с другом.

Термины «генетически связанный», «связанный», «связанный с» или «сцепление», при использовании по тексту настоящего документа, относятся к измеримой вероятности того, что гены или маркеры, расположенные на данной хромосоме, передаются вместе особям в следующем поколении. Таким образом, термин «связанный» может относиться к одному или нескольким генам или маркерам, которые передаются вместе с геном с вероятностью более 0,5 (что ожидается от независимого ассортимента, когда маркеры/гены расположены на разных хромосомах). Поскольку близость двух генов или маркеров на хромосоме напрямую связана с вероятностью того, что гены или маркеры будут переданы вместе особям в следующем поколении, термин «генетически связанный» в настоящем документе также может относиться к одному или нескольким генам или маркерам, которые расположены в пределах примерно 50 сантиморганов (сМ) или менее друг от друга на одной и той же хромосоме. Генетическая связь обычно выражается в единицах сМ. Сантиморган – это единица рекомбинантной частоты для измерения генетического сцепления, определяемая как такое расстояние между генами или маркерами, при котором один продукт мейоза из 100 является рекомбинантным, или, иными словами, сантиморган равен 1% вероятности того, что маркер в одном генетическом локусе на хромосоме будет отделен от маркера во втором локусе из-за кроссинговера в одном поколении. Его часто используют для определения расстояния на хромосоме. Число пар оснований, которым соответствуют сМ, широко варьируется в зависимости от генома (разные области хромосомы имеют разную склонность к кроссинговеру) и вида (т.е. общий размер генома). Таким образом, в этом отношении термин «связанный» может означать расстояние около 50 сМ или меньше, например, около 40 сМ, около 30 сМ, около 20 сМ, около 10 сМ, около 7,5 сМ, около 6 сМ, около 5 сМ, около 4 сМ, около 3 сМ, около 2,5 сМ, около 2 сМ или даже меньше.

Ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке и другой ген устойчивости к болезням могут быть генетически связаны, когда они пакетированы в виде трансгенов. Например, ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке и другой ген устойчивости к заболеванию могут присутствовать в одном конструкте, который используется для трансформации. В качестве альтернативы, ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке может быть трансформирован в виде *Brassica*, содержащем другой ген устойчивости к заболеванию. Другой ген устойчивости к

заболеванию может присутствовать в нативном хромосомном контексте либо в виде трансгена. Методы направленной геномной инженерии, например, основаны на гомологичной рекомбинации или целевой интеграции, индуцированной двухцепочечным разрывом, или сайт-специфической рекомбинации, как описано в, например, WO2011/154158 или WO2011/154159.

В качестве альтернативы, другой ген устойчивости к заболеванию можно трансформировать в виды *Brassica*, содержащим ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке, при условии, что он интегрирован в непосредственной близости от гена *Rlm3* устойчивости к черной ножке с использованием методов направленной геномной инженерии. В последнем случае другой ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке может присутствовать в нативном хромосомном контексте либо в виде трансгена. Ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке и ген устойчивости к другим заболеваниям также могут присутствовать на искусственной хромосоме. При использовании по тексту настоящего документа под «искусственными хромосомами» понимаются конструкции, которые содержат последовательности ДНК и выполняют критически важные функции природных хромосом, позволяющие им существовать независимо (автономно) от нативных хромосом. Автономия при делении клеток (митозе) и образовании гамет (мейозе) вытекает из собственных функциональных источников репликации и собственной функциональной центромеры.

В еще одном варианте растение по изобретению выбрано из группы, состоящей из *Brassica napus*, *Brassica juncea*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Brassica nigra* и *Brassica carinata*. В еще одном варианте осуществления предусмотрены семена, такие как гибридные семена растений согласно изобретению, содержащие ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке по настоящему изобретению.

Гибридные семена растений по изобретению могут быть получены путем скрещивания двух инбредных родительских линий, при этом одна из инбредных родительских линий содержит гены *Rlm3* устойчивости к черной ножке по изобретению. Для получения чистых гибридных семян одна из родительских линий является мужской стерильной и опыляется пыльцой другой линии. Путем выращивания родительских линий в рядах и сбора только семян родительского растения поколения F1 с мужской стерильностью получают чистые гибридные

семена. Для создания родительских линий с мужской стерильностью можно использовать систему, описанную в EP 0,344,029 или US 6,509,516, причем ген, кодирующий фитотоксический белок (барназу), экспрессируется под контролем специфичного для тапетума промотора, такого как TA29, обеспечивающего селективное разрушение клеток тапетума. Трансформация растений химерным геном pTA29:барназа приводит к появлению растений, у которых полностью прекращается образование пыльцы / Mariani *et al.* (1990), *Nature* **347**: 737-741). Цитохимический и гистохимический анализ развития пыльников растений *Brassica napus*, содержащих химерный ген pTA29-барназы описан в работе De Block and De Brouwer ((1993), *Planta* **189**:218-225). Для восстановления фертильности потомства растения с мужской стерильностью растение с мужской стерильностью (родитель MS) скрещивают с трансгенным растением (родитель RF), содержащим ген, который восстанавливает фертильность и при экспрессии способен ингибировать или предотвращать активность гена мужской стерильности (Патенты США №№ 5,689,041; 5,792,929; De Block and De Brouwer, выше). Использование корегулирующих генов при получении растений с мужской стерильностью для увеличения частоты трансформантов, имеющих хорошие агрономические показатели, описано в патенте WO96/26283. Обычно, когда ДНК стерильности кодирует барназу, совместно регулирующая ДНК будет кодировать барстар, предпочтительно используется оптимизированный ген барстара согласно описанию в опубликованной международной заявке WO 98/10081. Предполагается, что для стимулирования экспрессии барназы с целью придания растению мужской стерильности можно использовать различные промоторы. Аналогичным образом, барстар может быть функционально связан с различными промоторами, такими как 35S вируса мозаики цветной капусты.

Растения с мужской стерильностью также можно получить с использованием других методов, таких как системы цитоплазматической мужской стерильности/восстановителя [например, система Ogura, опубликованные патентные заявки США 20020032916, US 6,229,072, WO97/02737, US 5,789,566 или the Polima system в US 6,365,798, WO98/54340 или the Kosena system в WO95/09910, US 5,644,066].

Родитель MS или родитель RF, или они оба могут содержать ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке согласно изобретению. Этого можно добиться за счет введения гена *Rlm3* устойчивости к черной ножке в элитную линию *B. napus* с последующей трансформацией этой линии при помощи рТА29-барназы или рNOS-барстара с применением известных методов. В качестве альтернативы гены *Rlm3* устойчивости к черной ножке могут вводиться непосредственно в трансгенную родительскую линию MS или RF путем скрещивания растения, содержащего ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке с родителем MS или родителем RF, или путем трансформации родителя MS или родителя RF. Гибридные семена F1, полученные в результате скрещивания родителей MS и RF, будут тогда содержать ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке.

Еще один вариант осуществления предоставляет способы определения наличия или отсутствия в биологическом образце локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке, включающие предоставление геномной ДНК из указанного биологического образца и анализ указанной ДНК на наличие, по меньшей мере, одного молекулярного маркера, причем, по меньшей мере, один молекулярный маркер связан с наличием или отсутствием локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке, причем указанный локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке включает ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке, причем указанный ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке содержит последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, или nt 2106 - 9496, или nt 2106-4688, или nt 5908-9496 последовательности SEQ ID NO: 1 ; или имеет кодирующую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 4, или с SEQ ID NO: 44; или кодирует белок, имеющий, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 45.

Кроме того, настоящее изобретение касается способа определения наличия или отсутствия полинуклеотида *Rlm3* по настоящему изобретению в биологическом образце (таком как образец растительной ткани), включающего получение ДНК из указанного биологического образца и анализ указанной ДНК на наличие или отсутствие указанного полинуклеотида *Rlm3*. ДНК может быть геномной ДНК. В качестве альтернативы, это может быть ДНК, полученная путем обратной транскрипции РНК. Анализ на предмет присутствия или отсутствия

полинуклеотида *Rlm3* (локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке) можно выполнить в соответствии с описанием, которое приводится в других разделах настоящего документа. Например, такой анализ можно выполнить с использованием, по меньшей мере, одного праймера или зонда, который специфическим образом распознает указанный полинуклеотид. Кроме того, такой анализ можно выполнить с использованием двух праймеров, которые позволяют амплифицировать, по меньшей мере, часть указанного полинуклеотида, например, по меньшей мере, 50 п.о. По меньшей мере, на 100 п.о. или, по меньшей мере, на 500 п.о.

Кроме того, настоящее изобретение касается способа определения наличия или отсутствия *Rlm3* полипептида согласно настоящему изобретению в биологическом образце (таком как образец растительной ткани), включающего предоставление полипептидов из указанного биологического образца, и анализ указанных полипептидов на наличие или отсутствие указанного *Rlm3*-полипептида. Анализ на предмет наличия или отсутствия полипептида *Rlm3* можно выполнить хорошо известными методами. Например, его можно выполнить с использованием, по меньшей мере, одного антитела, которое специфическим образом распознает указанный полипептид *Rlm3*. Кроме того, анализ можно провести с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС), в частности, жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС). Для ЖХ-МС и ЖХ-МС/МС может потребоваться определенная предварительная обработка образца, например, расщепление содержащихся в образце полипептидов протеазой (например, трипсином). За счет проведения анализа образца на предмет наличия пептидов, специфичных для полипептида *Rlm3*, можно оценить наличие или отсутствие указанного полипептида.

В еще одном варианте осуществления предусмотрен набор для обнаружения локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке согласно изобретению в образцах ДНК Brassicaceae, причем указанный набор содержит, по меньшей мере, один праймер или зонд, который специфическим образом распознает молекулярный маркер, связанный с указанным локусом *Rlm3* устойчивости к черной ножке.

Предпочтительно комплект для оценки устойчивости к черной ножке в растении содержит олигонуклеотид по настоящему изобретению или антитело по настоящему изобретению.

В еще одном варианте осуществления предусмотрено использование молекулярного маркера, связанного с локусом *Rlm3* устойчивости к черной ножке согласно изобретению, для определения наличия или отсутствия указанного локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке у растений Brassicaceae, или использование любой из последовательностей SEQ ID NO: 1, 4, 42, 44 и 46 для определения наличия или отсутствия локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке согласно изобретению у растений Brassicaceae.

В частности, способы и наборы по изобретению подходят для определения наличия локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке. Наличие локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке можно определить с использованием хотя бы одного молекулярного маркера, причем указанный один молекулярный маркер связан с наличием локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке согласно определению в настоящем документе.

«Биологический образец» может представлять собой растение или часть растения, например, растительную ткань или растительную клетку.

«Предоставление геномной ДНК», при использовании по тексту настоящего документа, относится к предоставлению образца, содержащего геномную ДНК растения.

Под образцом может пониматься образец ткани, полученный из указанного растения, такой как, например, образец листа, содержащий геномную ДНК указанного растения. Образец может также относиться к геномной ДНК, полученной из образца ткани, такой как геномная ДНК, полученная из ткани, такой как образец листа. Предоставление геномной ДНК может, но не обязательно должно, включать очистку геномной ДНК из образца ткани. Таким образом, предоставление геномной ДНК также включает получение тканевого материала из растения или более крупного фрагмента ткани и приготовление из него неочищенного экстракта или лизата.

Термин «набор», при использовании по тексту настоящего документа, относится к набору реагентов, необходимых для осуществления способа по

изобретению, в частности, для идентификации генов *Rlm3* устойчивости к черной ножке в биологических образцах.

В одном варианте осуществления набор содержит, по меньшей мере, один олигонуклеотид для выявления гена *Rlm3* устойчивости к черной ножке по настоящему изобретению. По меньшей мере, один олигонуклеотид должен конкретно указывать на ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке по изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления набор по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, два специфичных праймера (т.е. олигонуклеотиды) для идентификации генов *Rlm3* устойчивости к черной ножке. Эти праймеры должны позволять амплифицировать гены *Rlm3* устойчивости к черной ножке, как указано в настоящем документе (например, SEQ ID NO: 1, 42, 4 или 44), или их фрагменты, такие как фрагменты размером, по меньшей мере, 100, 200, 500 или 1000 п.о. Подходящие пары праймеров (с двумя праймерами) показаны, например, в Таблице С в разделе «Примеры».

В некоторых случаях набор может дополнительно содержать любой другой реагент. В качестве альтернативы, согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения, набор может содержать, по меньшей мере, один специфичный зонд, который специфическим образом гибридизируется с нуклеиновой кислотой биологических образцов для выявления присутствия в нем гена *Rlm3* устойчивости к черной ножке.

В некоторых случаях набор может дополнительно содержать любой другой реагент (например, помимо прочего, гибридизационный буфер, метку) для идентификации генов *Rlm3* устойчивости к черной ножке в биологических образцах с использованием специфичного зонда.

Можно использовать набор по изобретению, и его компоненты можно специально отрегулировать для целей контроля качества (например, чистоты партий семян), обнаружения наличия или отсутствия генов *Rlm3* устойчивости к черной ножке в растительном материале или материале, содержащем растительный материал или полученном из него, таком как, помимо прочего, продукты питания или кормовые продукты. Статус зиготности генов *Rlm3* устойчивости к черной ножке можно определить с использованием альтернативных наборов праймеров и/или зондов, которые специфическим

образом связываются с локусом *Rlm3* и соответствующим локусом в восприимчивой линии Brassicaceae.

Термин «праймер» или «олигонуклеотид», при использовании по тексту настоящего документа, охватывает любую нуклеиновую кислоту, которая способна инициировать синтез возникающей нуклеиновой кислоты в матрично-зависимом процессе, таком как ПЦР. Обычно праймеры представляют собой олигонуклеотиды длиной от 10 до 30 нуклеотидов (например, от 15 до 30 нуклеотидов), но можно использовать и более длинные последовательности. Праймеры могут быть представлены в двухцепочечной форме, хотя предпочтительной является одноцепочечная форма. Зонды можно использовать в качестве праймеров, но они предназначены для связывания с целевой ДНК или РНК и не должны использоваться в процессе амплификации. Обычно зонд или праймер должен быть способен обнаружить полинуклеотид *Rlm3* по настоящему изобретению (например, путем связывания с ним).

Термин «распознающий», при использовании по тексту настоящего документа в отношении конкретных праймеров, относится к тому факту, что конкретные праймеры специфическим образом гибридизируются с конкретной последовательностью нуклеиновой кислоты в подходящих условиях, таких как условия, изложенные в рассматриваемом способе (например, условия протокола ПЦР-идентификации), при котором специфичность определяется наличием положительных и отрицательных контрольных свойств.

Термин «антитело» в настоящем документе используется в самом широком смысле и охватывает различные структуры антител, включая, помимо прочего, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и фрагменты антител, при условии, что они демонстрируют желаемую активность связывания антигена (т.е. их антигенсвязывающие фрагменты). Предпочтительно антитело представляет собой поликлональное антитело. Более предпочтительно антитело представляет собой моноклональное антитело. Следует понимать, что антитело, представленное в настоящем документе, специфическим образом связывает полипептид *Rlm3* по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно касается изолированного полинуклеотида, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из:

- a) последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 42, 4 и 44: и
- b) последовательности нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 42, 4 и 44.

Кроме того, настоящее изобретение предусматривает изолированный полинуклеотид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 43, 5 и 45;
- b) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 43, 5 и 45, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
- c) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;

- d) частичной последовательности любого из пунктов а) - с), причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке.

В одном варианте осуществления, полинуклеотид функционально связан с гетерологичным промотором.

Настоящее изобретение также касается олигонуклеотида, который специфическим образом распознает (т.е. связывается) полинуклеотид по настоящему изобретению. Предпочтительно указанный олигонуклеотид можно использовать в качестве праймера или зонда.

Другой задачей изобретения является получение химерного гена, содержащего следующие функционально связанные генетические элементы: экспрессируемый в растениях промотор, последовательность ДНК, кодирующую белок Rlm3, и, в некоторых случаях, область терминации транскрипции и полиаденилирования, являющуюся функциональной в растительных клетках, причем указанная последовательность ДНК, кодирующая белок Rlm3, включает последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 4, или с SEQ ID NO: 44; или кодирующую белок, имеющий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 45.

При использовании по тексту настоящего документа термин «химерный ген» относится к конструкту нуклеиновой кислоты, которая обычно не встречается у рассматриваемого вида растений. Химерный конструкт нуклеиновой кислоты может представлять собой ДНК или РНК. «Химерный конструкт ДНК» и «химерный ген» используются взаимозаменяемо для обозначения гена, в котором промотор или одна или несколько других регуляторных областей гена не связаны в природе с частью или всей транскрибируемой областью ДНК, или ген, который присутствует в локусе генома растения, в котором он не встречается в природе.

«Выделенная ДНК» или «изолированный полинуклеотид», при использовании по тексту настоящего документа, относятся к ДНК, которая не встречается в ее естественном геномном контексте, независимо от ее длины и

последовательности. Выделенная ДНК может, например, относиться к ДНК, которая физически отделена от геномного контекста, например, к фрагменту геномной ДНК. Выделенная ДНК также может представлять собой искусственно полученную ДНК, такую как химически синтезированная ДНК, или ДНК, полученную посредством реакций амплификации, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), хорошо известная в данной области. Выделенная ДНК может также относиться к ДНК, присутствующей в контексте ДНК, в котором она не встречается в природе. Например, выделенная ДНК может относиться к фрагменту ДНК, присутствующему в плазмиде. Кроме того, выделенная ДНК может относиться к фрагменту ДНК, присутствующему в хромосомном контексте, отличном от контекста, в котором она встречается в природе, например, в другой позиции в геноме по сравнению с естественной позицией, в геноме другого вида по сравнению с видом, в котором она встречается в природе, или в искусственной хромосоме.

Кроме того, экспрессию гена *Rlm3* устойчивости к черной ножке можно модулировать, например, усиливать, например, путем активирующего мечения T-ДНК или с помощью технологий целевой геномной инженерии, при использовании которых, например, эндогенный промотор модифицируется так, что он обеспечивает более высокие уровни экспрессии, или при которых эндогенный промотор заменяется более сильным промотором.

Подходящим для изобретения является способ получения устойчивых к черной ножке растений Brassicaceae, включающий этапы посева семян растений Brassicaceae согласно изобретению, содержащих ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке, выращивание растений в поле, в некоторых случаях опрыскивание растений фунгицидами и сбор урожая.

Еще одной целью является предоставление способа применения полинуклеотида или химерного гена согласно изобретению для повышения устойчивости к черной ножке у Brassicaceae, а также использование растений согласно изобретению для получения рапсового масла или жмыха семян рапса, или семян, или урожая масличного рапса.

Последовательность локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке может дополнительно использоваться для разработки молекулярных маркеров, связанных с локусом *Rlm3* устойчивости к черной ножке.

Полинуклеотид по настоящему изобретению можно использовать для разработки молекулярных маркеров локуса *Rlm3* устойчивости к черной ножке путем разработки праймеров, специфическим образом распознающих ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке. Кроме того, выделенную ДНК можно использовать для идентификации геномной последовательности, фланкирующей ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке и разработать праймеры и зонды на основе геномных последовательностей, фланкирующих ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке.

Настоящее изобретение также предоставляет вектор, содержащий полинуклеотид и/или химерный ген по настоящему изобретению.

Также настоящее изобретение касается клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид или химерный ген по настоящему изобретению и/или вектор по настоящему изобретению. Указанная клетка-хозяин может представлять собой любую клетку-хозяина, не являющуюся человеческой, например, бактериальную клетку (такую как *E.coli* или *Agrobacterium tumefaciens*), дрожжевую клетку (такую как клетка *Pichia*) или растительную клетку.

Настоящее изобретение также предоставляет полипептид, кодируемый полинуклеотидом согласно по-настоящему изобретению. Обычно указанный полипептид представляет собой изолированный полипептид.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет способ получения антитела, которое специфическим образом распознает полипептид *Rlm3* по настоящему изобретению.

Также предусмотрен способ получения продуктов питания, кормов или промышленной продукции, включающий получение растения по изобретению или его части; и приготовление продуктов питания, кормов или промышленной продукции из растения или его части. В рамках следующей цели указанные продукты питания или корм представляют собой масло, толокно, зерно, крахмал, муку или белок; или указанная промышленная продукция представляет собой биотопливо, волокно, промышленные химикаты, фармацевтические препараты

или нутрицевтики. В предпочтительном варианте осуществления продукт питания представляет собой масло.

Кроме того, предусмотрено использование полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 44, или полипептида, содержащего аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 45, для идентификации гомологичных генов устойчивости к черной ножке.

Гомологичные гены устойчивости к черной ножке можно выявить с использованием способов, известных в данной области. Гомологичную нуклеотидную последовательность может выявить и выделить путем гибридизации в жестких условиях с использованием в качестве зондов нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 44, или их часть. Другие последовательности, кодирующие Rlm3, также можно получить путем амплификации ДНК с использованием в качестве праймеров олигонуклеотидов, специфичных для генов, кодирующих Rlm3, таких как, помимо прочего, олигонуклеотиды, содержащие или состоящие из примерно 20-50 последовательных нуклеотидов из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 44, или ее комплемент. Гомологичные гены устойчивости к черной ножке можно выявить посредством компьютерного моделирования с использованием инструмента Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) для поиска гомологии с другими нуклеотидными или аминокислотными последовательностями. Функциональность выявленных гомологичных генов устойчивости к черной ножке можно подтвердить с использованием способов, описанных в настоящем документе, таких как трансформация гена устойчивости к черной ножке под контролем экспрессируемого в растениях промотора в растении, не являющемся устойчивым к черной ножке.

Также предусмотрен способ получения продуктов питания, кормов или промышленной продукции, включающий получение растения по изобретению или его части; и приготовление продуктов питания, кормов или промышленной продукции из растения или его части. В рамках следующей цели указанные продукты питания или корм представляют собой масло, толокно, зерно, крахмал,

муку или белок; или указанная промышленная продукция представляет собой биотопливо, волокно, промышленные химикаты, фармацевтические препараты или нутрицевтики.

Термин «урожай масличного рапса», при использовании по тексту настоящего документа, относится к рапсу, выращиваемому как культуре, такому как *Brassica napus*, *Brassica juncea*, *Brassica carinata*, *Brassica rapa* (син. *B. campestris*), *Brassica oleracea* или *Brassica nigra*.

Растения по изобретению могут дополнительно содержать эндогенный ген или трансген, придающий устойчивость к гербицидам, такой как ген *bar* или *pat*, придающий устойчивость к глюфосинату аммония (Liberty®, Basta® или Ignite®) (EP 0242236 и EP 0242246, включенные посредством отсылки); или любой модифицированный ген EPSPS, такой как ген 2mEPSPS кукурузы (EP0 508 909 и EP 0 507 698, включенные посредством отсылки), или глифосат-ацетилтрансфераза, или глифосат-оксидоредуктаза, которые придают устойчивость к глифосату (RoundupReady®), или бромоксинитрилнитрилаза для придания толерантности к бромоксинитрилу, или любой модифицированный ген АНАС, который придает толерантность к сульфонилмочевинам, имидазолинонам, сульфониламинокарбонилтриазинонам, триазолопиримидинам или пиримидил(окси/тио)бензоатам, таким как устойчивые к имидазолинону мутанты PM1 и PM2 масличного рапса, в настоящее время продаваемые под названием канола Clearfield®. Кроме того, растения по изобретению могут дополнительно содержать эндогенный ген или трансген, который обеспечивает повышенное содержание масла или улучшенный состав масла, например, увеличение тиоэстеразы АБН 12:0 для получения высокого лауреата; который обеспечивает контроль опыления, например, барназа под контролем специфичного для пыльника промотора для достижения мужской стерильности, или барстар под контролем специфичного для пыльника промотора для восстановления мужской стерильности, или, например, цитоплазматическая мужская стерильность Oguга и ядерный восстановитель фертильности.

Растения и семена согласно изобретению могут дополнительно обрабатываться химическим соединением, таким как химическое соединение, выбранное из следующих списков:

Гербициды: клетодим, клопиралид, диклофоп, этаметсульфурон, флуазифоп, глюфосинат, глифосат, метазахлор, квинмерак, квизалофоп, тепралоксидим, трифлуралин.

Фунгициды/ГРР: азоксистробин, N-[9-(дихлорметилен)-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-метанонафталин-5-ил]-3-(дифторметил)-1-метил-1H-пиразол-4-карбоксамид (бензовиндифлупир, бензодифлупир), биксафен, боскалид, карбендазим, карбоксин, хлормекват-хлорид, кониотририум минитанс, ципроконазол, ципродинил, дифеноконазол, диметоморф, димоксистробин, эпоксиконазол, фамоксадон, флуазинам, флудиоксонил, флуопиколид, флуопирам, флуоксастробин, флухинконазол, флузилазол, флутианил, флутриафол, флюксапироксад, ипродион, изопиразам, мефеноксам, мепикват-хлорид, металаксил, метконазол, метоминостробин, паклобутразол, пенфлуфен, пентиопирад, пикоксистробин, прохлораз, протиоконазол, пиракlostробин, седаксан, тебуконазол, тетраконазол, тиофанат-метил, тирам, триадименол, трифлуксистробин *Bacillus firmus*, *Bacillus firmus* штамм I-1582, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* штамм GB03, *Bacillus subtilis* штамм QST 713, *Bacillus pumulis*, *Bacillus pumulis* штамм GB34.

Инсектициды: Инсектициды: ацетамиприд, алдикарб, азадирахтин, карбофуран, хлорантранилипрол (ринаксипир), клотианидин, циантранилипрол (циазипир), (бета-)цифлутрин, гамма-цигалотрин, лямбда-цигалотрин, циперметрин, дельтаметрин, диметоат, динетофуран, этипрол, флоникамид, флубендиамид, флуэнсульфон, флуопирам, флупирадифурон, тау-флувалинат, имициафос, имидаклоприд, метафлумизон, метеокарб, пиметрозин, пирифлухиназон, спинеторам, спинозад, спиротротетрамат, сульфоксафлор, тиаклоприд, тиаметоксам, 1-(3-хлорпиридин-2-ил)-N-[4-циано-2-метил-6-(метилкарбамоил)фенил]-3-{[5-(трифторметил)-2H-тетразол-2-ил]метил}-1H-пиразол-5-карбоксамид, 1-(3-хлорпиридин-2-ил)-N-[4-циано-2-метил-6-(метилкарбамоил)фенил]-3-{[5-(трифторметил)-1H-тетразол-1-ил]метил}-1H-пиразол-5-карбоксамид, 1-{2-фтор-4-метил-5-[(2,2,2-трифторэтил)сульфинил]-фенил}-3-(трифторметил)-1H-1,2,4-триазол-5-амин, (1E)-N-[(6-хлорпиридин-3-ил)метил]-N'-циано-N-(2,2-дифторэтид)этанимидамид, *Bacillus firmus*, *Bacillus firmus* штамм I-1582, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* штамм GB03, *Bacillus subtilis* штамм QST 713, *Metarhizium anisopliae* F52.

Настоящее изобретение также касается способа защиты культурных растений в полевых условиях, причем указанные растения содержат i) ген *Rlm3* устойчивости и/или белок Rlm3 по настоящему изобретению, и ii), по меньшей мере, один ген устойчивости, придающий толерантность к гербицидам, и причем указанный способ включает нанесение указанного гербицида на культурные растения с целью борьбы с сорняками. В одном варианте осуществления гербицид представляет собой глюфосинат. В другом варианте осуществления указанный гербицид представляет собой глюфосинат аммония. В другом варианте осуществления указанный гербицид представляет собой глифосат. В другом варианте осуществления указанный гербицид представляет собой смесь глюфосината, глюфосината аммония и/или глифосата.

Соответственно, настоящее изобретение также касается способа выращивания растений в поле, причем указанные растения содержат, по меньшей мере, один ген, придающий толерантность к гербицидам, а указанный способ включает этап применения указанного гербицида к указанным растениям, причем указанные растения содержат локус *Rlm3* устойчивости к черной ножке согласно изобретению.

Если по тексту делается ссылка на «растение» или «растения» согласно изобретению, то подразумевается, что, если не указано иное, части растения (клетки, ткани или органы, семенные коробочки, семена, отрезанные части, такие как корни, листья, цветы, пыльца и т.д.), потомство растений, сохраняющее отличительные характеристики родителей (особенно свойства раскрытия плодов), например, семена, полученные путем самоопыления или скрещивания, например, гибридные семена (полученные путем скрещивания двух инбредных родительских линий), полученные из них гибридные растения и части растений также включены в настоящий документ. В некоторых вариантах осуществления части растения содержат полинуклеотид или химерный ген по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления растительные клетки по настоящему изобретению, т.е. растительная клетка, содержащая ген *Rlm3* устойчивости к черной ножке, так же, как и растительные клетки, полученные с применением способов по изобретению, могут быть неразмножающимися.

Полученные растения согласно изобретению можно использовать в традиционной схеме селекции для получения большего количества растений с теми же характеристиками или для введения признака наличия гена *Rlm3* согласно изобретению в другие сорта того же или родственного вида растений или у гибридных растений. Полученные растения в дальнейшем можно использовать для создания посадочного материала. Растения по изобретению можно также использовать для получения гамет, семян (включая измельченные семена и жмых), масла семян, эмбрионов, как зиготических, так и соматических, потомства или гибридов растений, полученных способами по изобретению. Семена, полученные из растений согласно изобретению, также входят в область действия изобретения.

«Создание посадочного материала», при использовании по тексту настоящего документа, относится к любым известным в данной области средствам для получения дополнительных растений, частей растений или семян и включает, помимо прочего, методы вегетативного размножения (например, получение воздушных или подземных отводков, деление, прививка (почками), микроразмножение, столоны или побеги, запасающие органы, такие как луковицы, клубнелуковицы, клубни и корневища, черенкование или срезание, двойная чешуйка), половое размножение (скрещивание с другим растением) и бесполое размножение (например, апомиксис, соматическая гибридизация).

При использовании по тексту настоящего документа термин «содержащий» следует понимать, как определяющий наличие указанных признаков, единиц, этапов или компонентов, но при этом не исключается присутствие или добавление одного или нескольких признаков, единиц, этапов или компонентов или их групп. Таким образом, например, нуклеиновая кислота или белок, включающий последовательность нуклеотидов или аминокислот, может содержать больше нуклеотидов или аминокислот, чем фактически цитируемые, т.е. они могут быть встроенными в более крупную нуклеиновую кислоту или белок. Химерный ген, содержащий нуклеиновую кислоту, которая определена функционально или структурно, может содержать дополнительные области ДНК и т.д.

Все патенты, патентные заявки, публикации или публично раскрытые документы (включая публикации в Интернете), упомянутые или цитируемые в настоящем документе, полностью включены в него посредством отсылки.

В описании и примерах упоминаются следующие последовательности:

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- SEQ ID NO: 1: геномная последовательность *Rlm3*
- SEQ ID NO: 4: кодирующая последовательность *Rlm3-19a*
- SEQ ID NO: 5: последовательность белка *Rlm3-19a*
- SEQ ID NO: 9: кДНК последовательность *Rlm3-19a*
- SEQ ID NO: 11: кДНК последовательность *Rlm3-20*
- SEQ ID NO: 12: кДНК последовательность *Rlm3-31*
- SEQ ID NO: 13 - 29: последовательности праймера (см. Таблицу С в разделе Примеры)
- SEQ ID NO: 30: геномная последовательность *Rlm4*
- SEQ ID NO: 31: кодирующая последовательность *Rlm4*
- SEQ ID NO: 32: последовательность белка *Rlm4*
- SEQ ID NO: 33: геномная последовательность *Rlm7*
- SEQ ID NO: 34: кодирующая последовательность *Rlm7*
- SEQ ID NO: 35: последовательность белка *Rlm7*
- SEQ ID NO: 36: геномная последовательность *Rlm9*
- SEQ ID NO: 37: кодирующая последовательность *Rlm9*
- SEQ ID NO: 38: последовательность белка *Rlm9*
- SEQ ID NO: 39: геномная последовательность *AvrLm3*
- SEQ ID NO: 40: кодирующая последовательность *AvrLm3*, включающая сигнальный пептид (*AvrLm3-WT*)
- SEQ ID NO: 41: кодирующая последовательность *AvrLm3* без сигнального пептида (*AvrLm3-SP*)
- SEQ ID NO: 42: кодирующая последовательность *Rlm3-19*
- SEQ ID NO: 43: последовательность белка *Rlm3-19*
- SEQ ID NO: 44: кодирующая последовательность *Rlm3-19b*
- SEQ ID NO: 45: последовательность белка *Rlm3-19b*
- SEQ ID NO: 46: кДНК последовательность *Rlm3-19*
- SEQ ID NO: 47: кДНК последовательность *Rlm3-19b*

Примеры

Если в Примерах не указано иное, все методы рекомбинантной ДНК выполняются в соответствии со стандартными протоколами согласно описанию в работе Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, издание третье, издательство Cold Spring Harbor Laboratory Press, Нью-Йорк, в томах 1 и 2, Ausubel et al. (1994) «Текущие протоколы в молекулярной биологии», Текущие протоколы США, и в томах I и II Brown (1998) *Molecular Biology LabFax*, издание второе, Academic Press (Великобритания). Стандартные материалы и методы молекулярной работы растений описаны в работе Plant Molecular Biology Labfax (1993) RDD Croy, опубликованной совместно BIOS Scientific Publications Ltd (Великобритания) и Blackwell Scientific Publications, (Великобритания). Стандартные материалы и методы полимеразных цепных реакций описаны в работе Dieffenbach and Dveksler (1995) *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, и в McPherson et al. (2000) *PCR - Basics: From Background to Bench*, издание первое, Springer Verlag, Германия).

Пример 1. Идентификация генов *Rlm3* устойчивости к черной ножке.

Геномная область *Rlm3* была определена на основе публикации Larkan et al (2016) «Линии интрогрессии одиночного R-гена для точной диссекции патосистемы Brassica-Leptosphaeria». *Front. PlantSci.*7:1771. doi: 10.3389/fpls.2016.01771. На основании публикации Larkan et al. (2016), маркеры, связанные с *Rlm3*, были разработаны на основе наложения генетических карт.

Маркеры были использованы для скрининга собственной библиотеки ВАС (BNapusKEY), использующей 14 суперпулов. Были секвенированы 2 клона ВАС, содержащие *Rlm3*.

Аннотация кандидатур R-генов черной ножки

Все гены в последовательности клона ВАС были пронумерованы и аннотированы на основе гомологии с *Arabidopsis*. Для дальнейшей проверки были выбраны три гена, связанных с устойчивостью к болезням.

Ген 19 гомологичен AT1G79680, WAKL10. Ген 19 имеет различные варианты сплайсинга. Один более длинный ген (SEQ ID NO: 46) и два более коротких (SEQ ID NO: 9 и 47). Оба коротких гена гомологичны AT1G79680 и получили названия ген 19a (или *Rlm3*-19a) и ген 19b (или *Rlm3*-19b). Более

длинная последовательность, дупликация, представляет собой комбинацию последовательностей а и b и называется геном 19 (или Rlm3-19).

Ген 20 также гомологичен AT1G79680, WAKL10. Последовательность кДНК гена 20 показана в SEQ ID NO: 11.

Ген 31 гомологичен AT1G80840, фактор транскрипции WRKY40. Последовательность кДНК гена 31 показана в SEQ ID NO: 12.

Пример 2 – Валидация Rlm3 при подходе с потерей функции

Выявленные выше мутации в генах 19a, 19b, 20 и 31 *Brassica napus* были созданы и идентифицированы следующим образом:

- 30 000 семян устойчивой элитной линии скрещивания ярового рапса (семена M0) предварительно замачивали в течение 2 ч на влажной фильтровальной бумаге в деионизированной или дистиллированной воде. Половину семян подвергали воздействию 0,8% EMS, а половину - 1% EMS (Sigma: M0880) и инкубировали в течение 4 часов.
- Мутагенизированные семена (семена M1) трижды промывали и сушили в вытяжном шкафу в течение ночи. 30 000 растений M1 вырастили в почве и произвели самоопыление для получения семян M2. Семена M2 собрали для каждого отдельного растения M1.
- Дважды вырастили по 4800 растений M2, полученных от разных растений M1, и получали образцы ДНК из образцов листьев каждого отдельного растения M2 по методу СТАВ (Doyle and Doyle, 1987, *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15).
- Образцы ДНК были проверены на наличие точечных мутаций в генах 19a, 19b, 20 и 31, вызывающих внедрение стоп-кодонов и другой аминокислоты в кодирующие белок области генов 19a, 19b, 20 и 31, путем прямого секвенирования стандартными методами секвенирования (LGC) и анализа последовательностей на наличие точечных мутаций с использованием программного обеспечения NovoSNP (VIB Antwerp).
- Так были выявлены мутантные аллели генов 19a, 19b, 20 и 31, что показано в Таблице А.

Таблица А: Мутации стоп-кодонов в генах 19а, 19b, 20 и 31. Позиция Nt относительно кодирующей последовательности генов, т.е. SEQ ID NO: 4 для Rlm3-19а, SEQ ID NO: 44 для Rlm3-19b. Позиция мутации в белке соответствует позиции в SEQ ID NO: 5 для Rlm3-19а и SEQ ID NO: 45 для Rlm3-19b.

Ген	Название мутации	Позиция Nt	Кодон WT	Кодон мутации	Тип мутации
Ген 19а	ATHR31A101	1735	CGA	TGA	R-579-STOP
Ген 19а	ATHR31A102	2017	CGA	TGA	R-673-STOP
Ген 19b	ATHR32A101	1237	CAA	TAA	Q-413-STOP
Ген 19b	ATHR32A102	1450	CAG	TAG	Q-484-STOP
Ген 20	ATHR33A103	1501	CAG	TAG	Q-501-STOP
Ген 31	ATHR34A101	367	CAG	TAG	Q-123-STOP

Содержащие эти мутации растения были проанализированы на предмет потери устойчивости к изоляту Lm1033-1 *Leptosphaeria maculans*.

Растения выращивали в вегетационной камере при температуре 14°C и фотопериоде 15 ч. Семидневные семядоли прокалывали иглой и добавляли в прокол каплю (10 мкл) суспензии спор. Использовали четыре точки инокуляции на каждое растение. Симптомы оценивали дважды, соответственно, через 14 и 17 дней после инокуляции. Оценка поражений проводилась по шкале от 1 до 9, где 1 – предрасположенность, 9 – устойчивость. Фенотип обозначается как S, если средний балл поражений оценивался на уровне менее 5, или R, когда средний балл поражений оценивался на уровне 5 баллов и выше. Результаты показаны в Таблице В.

Таблица В: Фенотип устойчивости нокаут-мутантов к черной ножке (S = восприимчивый; R = устойчивый)

Мутант	Ген	Мутация	Скрининг заболеваний		
			Средний балл через 14 дней после инокуляции	Средний балл через 17 дней после инокуляции	Фенотип
ATHR31A101	Ген19а	R-579-STOP	1,2	1	S
ATHR31A102	Ген19а	R-673-STOP	2,7	1,3	S
ATHR32A101	Ген19b	Q-413-STOP	2,4	1,5	S
ATHR32A102	Ген19b	Q-484-STOP	2,6	1,1	S
ATHR33A103	Ген20	Q-501-STOP	7,8	7,2	R
ATHR34A101	Ген31	Q-123-STOP	8,0	7,9	R

Каждая из четырех мутаций гена 19 (как гена 19a, так и гена 19b) приводит к потере устойчивости к изоляту Lm1033-1 *Leptosphaeria maculans*. Эти результаты показывают, что ген 19 необходим для устойчивости к черной ножке.

Пример 3 – Аннотация белка Rlm3

Белки, кодируемые геном 19, 19a и 19b, были проанализированы с использованием баз данных pfam и Interpro (<http://pfam.xfam.org/> и <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) для выявления присутствия в них консервативных белковых доменов, которые указывают на функцию белка. Белки, кодируемые генами 19, 19a и 19b, демонстрируют высокую общую консервативность по сравнению с белками, кодируемыми Rlm4, Rlm7 и Rlm9. Консервативные домены, выявленные в белках, кодируемых генами 19, 19a, 19b, Rlm4, Rlm7 и Rlm9, включают:

- Домен сигнального пептида;
- Связывающий галактуронан домен киназы рецептора, связанный со стенкой;
- Домен киназы, связанный со стенкой;
- Связывающий кальций домен EGF;
- Трансмембранный домен; и
- Домен протеинкиназы, включающий домен, подобный гуанилилциклазе.

Присутствие этих консервативных белковых доменов в белках, кодируемых генами 19, 19a и 19b, дополнительно подтверждает, что они являются функциональными белками, членами семейства генов WAKL (киназноподобных рецепторов, связанных со стенкой).

Пример 4 – Валидация Rlm3 при трансгенном подходе

Кодирующие последовательности генов 19, 19a и 19b (SEQ ID NO: 42, 4, 44) клонируют под контролем конститутивного промотора 35S и под контролем их нативных промоторов в векторе экспрессии Т-ДНК. Геномную область, содержащую гены 19, 19a и 19b (SEQ ID NO: 1), также клонируют под контролем конститутивного промотора 35S и под контролем его нативного промотора в векторе экспрессии Т-ДНК. Все векторы экспрессии Т-ДНК содержат селективируемый маркер. Полученные векторы трансформируют в сорт Вестар и/или Дармор *Brassica napus*, который восприимчив к черной ножке, используя

протокол трансформации гипокотыля, в целом согласно описанию в работе De Block et al. (1989), Plant Physiol. 91: 694. Число копий трансгена в трансгенном растении определяют с помощью ПЦР в реальном времени на гене *bar*. Трансформированные растения *Brassica napus*, которые содержат кодирующие последовательности гена 19, 19a и 19b или геномную область, содержащую ген 19, демонстрируют повышенную устойчивость к черной ножке по сравнению с нетрансформированными сортами *Brassica napus* Вестар и/или Дармор соответственно.

Пример 5 – Перенос *Rlm3* в другие линии Brassicaceae

Гены *Rlm3* переносят в линии скрещивания Brassicaceae с использованием следующего способа: Растение, содержащее гены *Rlm3* (растение-донор), скрещивается с линией Brassicaceae (элитный родитель/рекуррентный родитель) или с сортом, в котором гены *Rlm3* отсутствуют. Используется следующая схема интрогрессии, причем наличие генов *Rlm3* обозначается, как *Rlm3*, а отсутствие гена *Rlm3* обозначается знаком -:

Исходное скрещивание: *Rlm3* / *Rlm3* (растение-донор) X -/-
(элитный родитель)
Растение F1: *Rlm3* / -
Скрещивание BC1: *Rlm3* / - X - / - (рекуррентный
родитель)
Растения BC1: 50% *Rlm3* / - и 50% - / -

Растения, имеющие 50% *Rlm3* / - с использованием молекулярных маркеров (например, AFLP, PCR, InvaderTM, KASP и т.п.) отбирают на предмет наличия гена *Rlm3*.

Могут быть выполнены дальнейшие обратные скрещивания. После одного или нескольких этапов обратного скрещивания (BCx) гетерозиготные по *Rlm3* растения подвергаются самоопылению:

Скрещивание BCx S1: *Rlm3* / - X *Rlm3* / -
Растения BCx S1: 25% *Rlm3* / *Rlm3* и 50% *Rlm3* / - и 25% - / -

Содержащие *Rlm3* растения отбирают с использованием молекулярных маркеров, связанных с геном *Rlm3*. Отдельные растения BCx S1, являющиеся

гомозиготными по *Rlm3* (*Rlm3 / Rlm3*), отбирают с использованием молекулярных маркеров, связанных с *Rlm3*. Эти растения затем можно использовать для получения семян.

Пример 6. Схема ПЦР-анализа для анализа последовательностей Rlm3, гена 19

В Таблице С показаны праймеры, которые использовались для описанных в настоящем документе исследований. Для ПЦР-анализа использовалась комбинация прямого и обратного праймера каждого отдельного набора. Звездочка (*) указывает на то, что этот праймер необходимо комбинировать с Rlm3_Gene19b_FW_set2.

Таблица С: Пары праймеров, предназначенные для анализа последовательностей Rlm3

Набор для анализа	Последовательность	SEQ ID NO	Длина	Ампл икон	Ампли кон (гДНК)
Rlm3_Gene19a					
Rlm3_Gene19a_FW_set1	AGCTCTTACAATCCTTCTTCCC	13	22	2319	2556
Rlm3_Gene19a_RV_set1	AGGAAACAAAGGCTCAGTATCT	14	22		
Rlm3_Gene19a_FW_set2	CCCTTATGATTATCTTCTCTCT GCTAT	15	27	2311	2548
Rlm3_Gene19a_RV_set2	CCTGTTTGGTAAGGAAACAAA GG	16	23		
Rlm3_Gene19b					
Rlm3_Gene19b_FW_set1	AGCTCTTATAATCCTTCTTCCC TTT	17	25	2263	3521
Rlm3_Gene19b_RV_set1	TACCGACGTCGTACTIONGAGAA	18	20		
Rlm3_Gene19b_FW_set2	CCCTTTTAATTATTTTCTCTCT GCTATTTTIG	19	32		
Rlm3_Gene19b_RV_set2	TTCTCCAATTCCATGGACAC	20	20	2092	3350
Rlm3_Gene19b_RV_set3*	CCAAGTAGTTATCGTGTGATCG	21	22	1565	2823
Rlm3_OverlapGene19a&b_long					
Rlm3_Overlap_long_FW_set1	GTCCAAAGTCGTGGATGAAGA	22	21	1088	2307
Rlm3_Overlap_long_RV_set1	TCCCGATTCCAAATGGGTATG	23	21		
Rlm3_Overlap_long_FW_set2	TCGTGCAGTGAAAGAGAAATAGG	24	22	1010	2229
Rlm3_Overlap_long_RV_set2	CATTACCGTTGCAGCTTGTTT	25	21		
Rlm3_OverlapGene19a&b_short					
Rlm3_Overlap_short_FW_set1	CTGCTCCAACCTTCTCAATACGA	26	22	198	1417
Rlm3_Overlap_short_RV_set1	CTCCACATTTGCTAGGACAAGA	27	22		

Rlm3_Overlap_short_FW_set2	ACAACAATACTGTTACTGCTC CA	28	23	199	1418
Rlm3_Overlap_short_RV_set2	GGACAAGACCCGGCAAC	29	17		

Пример 7 – Валидация Rlm3 в анализах протопластов

Выделение и трансфекция протопластов

Протопласты выделяют из листьев 4-7-недельных растений, которые были выращены в асептических условиях. Здоровые листья нарезают острым лезвием на тонкие полоски и переносят в чашку Петри. Затем полоски пропитывают раствором фермента, растворяющего клеточную стенку, содержащим 0,25% целлюлазы R10 и 0,25% мацерозима R10, и инкубируют в течение ночи в темноте при осторожном встряхивании (40 об/мин) и температуре 24°C. После ферментативного расщепления высвободившиеся протопласты собирают путем фильтрации смеси через нейлоновые сетки с размером ячеек 40 мкм и ресуспендируют в растворе W5. Ресуспендированные протопласты промывают раствором W5, после чего осадок клеток ресуспендируют в растворе ММГ. Для трансформации 200 мкл клеток ($2,5 \times 10^5$) смешивают с 20 мкг плазмидной ДНК и 220 мкл свежеприготовленного раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ). Смесь инкубируют около 10 мин в темноте. После удаления раствора ПЭГ протопласты ресуспендируют в 2 мл раствора W5, переносят в шестилуночные планшеты, по меньшей мере, на 48ч и инкубируют при 24°C.

Векторы экспрессии

Кодирующие последовательности гена 19, 19a и 19b (SEQ ID NO: 42, 4 и 44) клонируют под контролем конститутивного промотора убиквитина-10 *Arabidopsis* и терминатора 3'pin2. Аналогичным образом, кодирующая последовательность родственного эффектора AvrLm3 (SEQ ID NO: 40 и 41) с нативным сигнальным пептидом и без него (*AvrLm3-WT* и *AvrLm3-SP* соответственно) клонируется между промотором гена 35S вируса мозаики цветной капусты и фрагментом 3'-нетранслируемой области 35S. Полученные векторы экспрессии используются для трансфекции протопластов.

Локус Rlm3 взаимодействует с AvrLm3

Для проверки функциональности Rlm3 протопласты *Brassica napus* сорта PPS02-144, который содержит геномную область, включающую ген 19, ген 19a и

ген 19b (SEQ ID NO: 1), временно трансфицируют эффекторным конструктом *AvrLm3-WT* или *AvrLm3-SP* вместе с репортером ЗФБ. В этом анализе снижение флуоресценции ЗФБ после распознавания *AvrLm3* по *Rlm3* указывает на гибель клеток, специфичную для гиперчувствительной реакции, которую используют в качестве меры устойчивости к болезням.

Как показано на Фигурах 1 и 2, эффекторная разновидность *AvrLm3-WT* (2), но не *AvrLm3-SP* (3), в которой отсутствует нативный сигнальный пептид, индуцирует снижение сигнала ЗФБ по сравнению с контрольным ЗФБ (1). Это подтверждает, что ген 19, ген 19а и/или ген 19b кодируют рецептор клеточной поверхности, взаимодействующий с эффектором *AvrLm3*. Кроме того, эти данные дополнительно подтверждают, что предсказанные белковые домены генов 19, 19а и 19b, согласно описанию в примере 3, представляют собой функциональные белковые домены.

Затем протопласты *Brassica napus* восприимчивых сортов Вестар и/или Дармор временно трансфицируют геном 19, 19а, 19b либо комбинацией 19а и 19b вместе с *AvrLm3-WT* или *AvrLm3-SP* и репортером ЗФБ. Контрольный образец, который позволяет считывать активность репортера в отсутствие распознавания *AvrLm3*, включен в качестве эталона. Количественная оценка активности репортера ЗФБ в различных образцах показывает, что гены 19, 19а, 19b и их комбинация придают устойчивость к черной ножке.

Формула изобретения

1. Способ производства растения, устойчивого к черной ножке, включающий этап введения в геном растения полинуклеотида, содержащего локус Rlm3 устойчивости к черной ножке, причем указанный локус Rlm3 содержит, по меньшей мере, один полинуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из:

- a) последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44,
- b) последовательности нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44, и
- c) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 80%, или, по меньшей мере, 85%, или, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности последовательности с nt 2106-9496 последовательности SEQ ID NO: 1, с nt 2106-4688 последовательности SEQ ID NO: 1, или nt 5908-9496 последовательности SEQ ID NO: 1.

2. Способ по п. 1, причем указанный способ включает введение в геном растения

- a) первого полинуклеотида, имеющего последовательность нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, по меньшей мере, на 99% или 100% идентична последовательности нуклеиновой кислоты последовательности SEQ ID NO: 4 или nt 2106-4688 последовательности SEQ ID NO: 1; и

- b) второго полинуклеотида, имеющего последовательность нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, по меньшей мере, на 99% или 100% идентична последовательности нуклеиновой кислоты последовательности SEQ ID NO: 44 или nt 5908-9496 последовательности SEQ ID NO: 1.

3. Способ производства растения, устойчивого к черной ножке, включающий этап введения в геном растения, по меньшей мере, одного полинуклеотида, содержащего Rlm3-ассоциированную открытую рамку считывания, причем указанная Rlm3-ассоциированная открытая рамка считывания кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45;
- b) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
- c) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
- d) частичной последовательности любого из пунктов а) - с), причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке.

4. Способ по п. 3, причем указанный способ включает введение в геном растения

I) первого полинуклеотида, содержащего Rlm3-ассоциированную открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, по меньшей мере, на 99% или, по меньшей мере, на 100% идентична аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 5;
- b) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 4;
- c) частичной последовательности пункта a) или b);

и

II) второго полинуклеотида, содержащего Rlm3-ассоциированную открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98%, по меньшей мере, на 99% или, по меньшей мере, на 100% идентична аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 45;
- b) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей

мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 44;

с) частичной последовательности пункта а) или б).

5. Способ по любому из пп. 1 - 5, причем указанный способ дополнительно включает

- i) идентификацию растения, в геном которого интегрирован полинуклеотид, содержащий локус Rlm3 устойчивости к черной ножке или полинуклеотид, кодирующий Rlm3-ассоциированную открытую рамку считывания; и
- ii) получение потомства от указанного растения, причем указанному потомству была придана устойчивость к черной ножке.

6. Способ придания устойчивости к черной ножке растению, включающий этап генетического модифицирования молчащего аллеля гена, кодирующего полипептид, содержащий Rlm3-ассоциированную открытую рамку считывания, таким образом, что молчащий аллель способен экспрессировать указанный полипептид, причем указанная Rlm3-ассоциированная открытая рамка считывания кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- а) аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45;
- б) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
- с) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по

меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;

- d) частичной последовательности любого из пунктов а) - с), причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке.

7. Способ по п. 6, **отличающийся тем**, что используют гомологичную рекомбинацию или технологию редактирования генома.

8. Способ по любому из пп. 1 - 7, причем указанное растение представляет собой растение *Brassicaceae*, предпочтительно, *Brassica napus*, *Brassica oleacea*, *Brassica rapa*, *Brassica nigra*, *Brassica juncea* или *Brassica carinata*.

9. Способ производства продуктов питания, кормов или промышленных продуктов, включающий:

- i) придание растению устойчивости к черной ножке способом по любому из пп. 1 - 8; и
- ii) приготовление продуктов питания, кормов или промышленных продуктов из растения, полученного на этапе i).

10. Способ по п. 9, причем

- i) указанные продукты питания или корма представляют собой масло, шрот, крахмал, муку или белок; или
- ii) указанные промышленные продукты представляют собой биотопливо, волокно, промышленные химикаты и лекарственные средства или питательные вещества.

11. Способ оценки устойчивости к черной ножке, включающий следующие этапы:

- I) определение наличия или отсутствия локуса Rlm3 устойчивости к черной ножке или полинуклеотида, содержащего Rlm3-ассоциированную открытую рамку считывания в образце указанного растения, содержащего геномную ДНК, причем

- i) указанный локус Rlm3 содержит, по меньшей мере, один полинуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из:
- a) последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44;
 - b) последовательности нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44; и
 - c) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 80%, или, по меньшей мере, 85%, или, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности последовательности с nt 2106-9496 последовательности SEQ ID NO: 1, с nt 2106-4688 последовательности SEQ ID NO: 1, или nt 5908-9496 последовательности SEQ ID NO: 1;
- и
- ii) указанная Rlm3-ассоциированная открытая рамка считывания кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:
- a) аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45;
 - b) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;

- с) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
- d) частичной последовательности любого из пунктов а) - с), причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;

и

- II) оценку устойчивости к черной ножке растения на основании наличия или отсутствия указанного локуса Rlm3 устойчивости к черной ножке в указанном растении.

12. Способ оценки устойчивости к черной ножке, включающий следующие этапы:

- i) определение наличия или отсутствия полипептида, кодируемого Rlm3-ассоциированной открытой рамкой считывания в образце указанного растения, содержащего белок, причем указанная Rlm3-ассоциированная открытая рамка считывания кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:
 - а) аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45;
 - б) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45, причем указанный

полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;

- c) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
- d) частичной последовательности любого из пунктов а) - с), причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;

и

- ii) оценку устойчивости к черной ножке растения на основе наличия или отсутствия указанного полипептида, кодируемого Rlm3-ассоциированной открытой рамкой считывания.

13. Применение локуса Rlm3 устойчивости к черной ножке для оценки устойчивости к черной ножке или полинуклеотида, содержащего Rlm3-ассоциированную открытую рамку считывания, в растении, причем

- i) указанный локус Rlm3 содержит, по меньшей мере, один полинуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из:
 - a) последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42, 44; и
 - b) последовательности нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44; и

- ii) указанная Rlm3-ассоциированная открытая рамка считывания кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:
- a) аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45;
 - b) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
 - c) аминокислотной последовательности, кодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
 - d) частичной последовательности любого из пунктов а) - с), причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке.

14. Применение по п. 13, причем указанное растение представляет собой растение *Brassicaceae*, предпочтительно, *Brassica napus*, *Brassica oleacea*, *Brassica rapa*, *Brassica nigra* или *Brassica juncea*, или *Brassica carinata*.

15. Полинуклеотид, содержащий локус Rlm3 устойчивости к черной ножке, причем указанный локус Rlm3 содержит, по меньшей мере, один полинуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из:

- a) последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44;
- b) последовательности нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44;
- c) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, 80%, или, по меньшей мере, 85%, или, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 92%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 98%, или, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности последовательности с nt 2106-9496 последовательности SEQ ID NO: 1, с nt 2106-4688 последовательности SEQ ID NO: 1, или nt 5908-9496 последовательности SEQ ID NO: 1.

16. Полинуклеотид, содержащий Rlm3-ассоциированную открытую рамку считывания, причем указанная Rlm3-ассоциированная открытая рамка считывания кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45;
- b) аминокислотной последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична аминокислотной последовательности, как показано в любой из SEQ ID NO: 5, 43 и 45, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;
- c) аминокислотной последовательности, закодированной последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99%

идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 4, 42 и 44, причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке;

- d) частичной последовательности любого из пунктов а) - с), причем указанный полипептид способен придавать растению устойчивость к черной ножке.

17. Полинуклеотид по п. 15 или 16, причем указанный полинуклеотид функционально связан с гетерологичным промотором.

18. Олигонуклеотид, который специфическим образом гибридизируется с полинуклеотидом по п. 15 или 16 и который может быть использован в качестве праймера или зонда.

19. Вектор или генетический конструкт, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 15 - 17.

20. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 15 - 17, вектор или генетический конструкт по п. 19.

21. Растение, содержащее полинуклеотид по любому из пп. 15 - 17, вектор или генетический конструкт по п. 19, клетку-хозяин по п. 20, или которое может быть получено способом по любому из пп. 1 - 8.

22. Растение по п. 21, дополнительно содержащее в своем геноме, по меньшей мере, один дополнительный ген устойчивости к черной ножке, выбранный из группы *Rlm4*, *Rlm7* и *Rlm9*.

23. Полипептид, кодируемый полинуклеотидом по любому из пп. 15 - 17.

24. Антитело, которое специфическим образом распознает полипептид по п. 23.

25. Комплект для оценки устойчивости к черной ножке в растении, содержащий олигонуклеотид по п. 18 или антитело по п. 24.

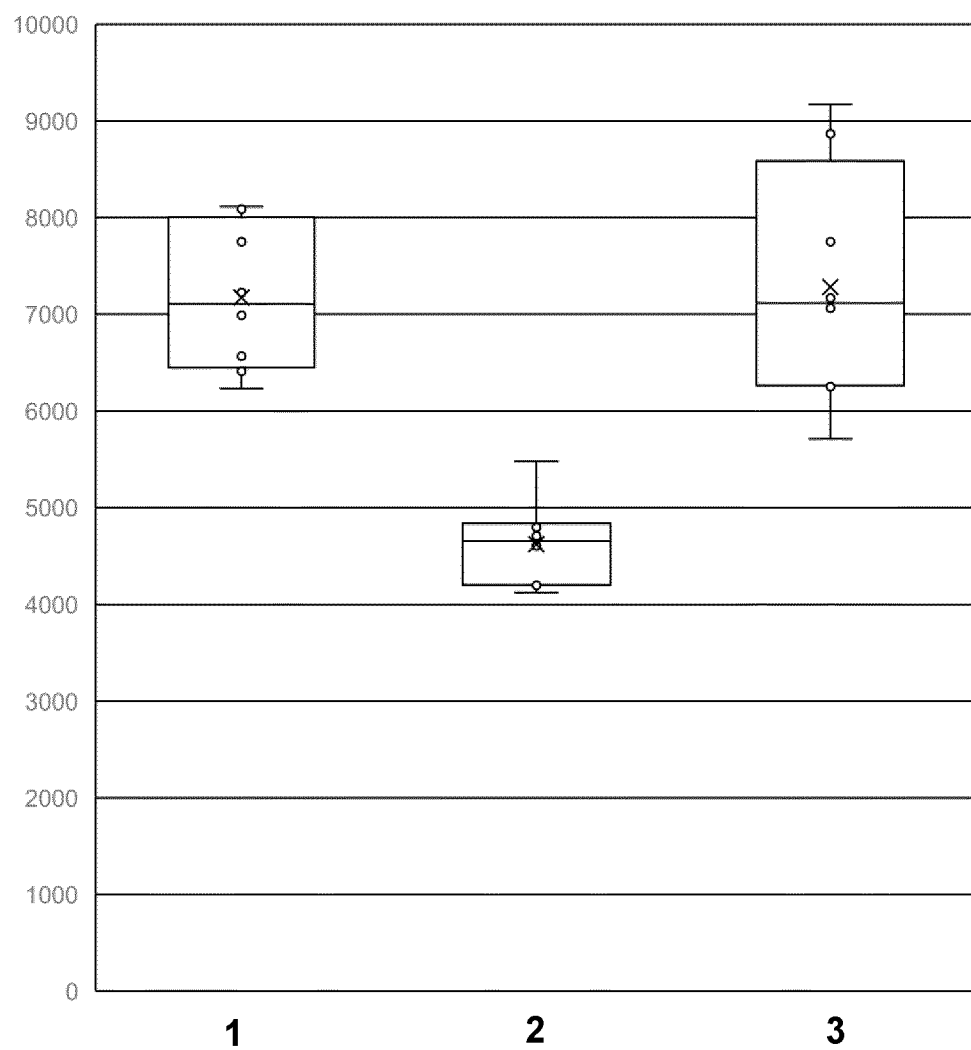
26. Способ определения наличия или отсутствия полинуклеотида по любому из пп. 15 - 17 в биологическом образце, включающий предоставление ДНК

из указанного биологического образца и анализ указанной ДНК на наличие или отсутствие указанного полинуклеотида.

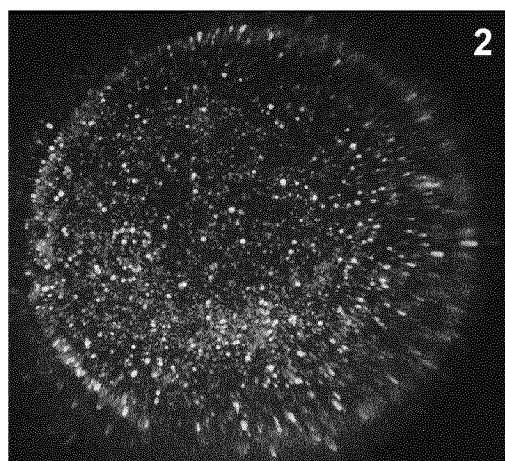
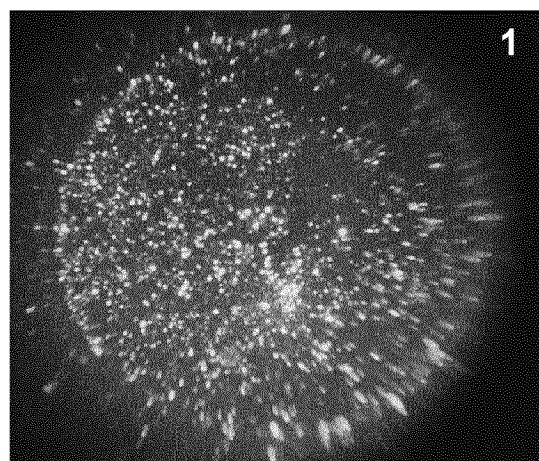
27. Способ определения наличия или отсутствия полипептида по п. 23 в биологическом образце, включающий предоставление полипептидов из указанного биологического образца и анализ указанных полипептидов на наличие или отсутствие указанного полипептида.

28. Способ защиты культурных растений в полевых условиях, причем указанные растения представляют собой растения по п. 21, дополнительно содержащие, по меньшей мере, один ген устойчивости, придающий устойчивость к гербицидам, и причем указанный способ включает нанесение указанного гербицида на культурные растения с целью борьбы с сорняками.

29. Способ по п. 28, причем указанный гербицид представляет собой глюфосинат, глюфосинат аммония, глифосат или их смесь.



Фигура 1



Фигура 2