



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 130919

(13) C2

(51) МПК

C12N 15/82 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2022 01999

(22) Дата подання заявки: 12.11.2019

(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: 18.06.2026

(41) Публікація відомостей
про заявку: 14.09.2022, Бюл.№ 37

(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: 17.06.2026, Бюл.№ 24

(86) Номер та дата
подання міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ РСТ/EP2019/081081,
12.11.2019

(72) Винахідник(и):

Тьорйек Отто (DE),
Борчардт Дітріх (DE),
Мечелке Вольфганг (DE),
Беєр Вернер (DE),
Шульц Брітта (DE),
Лейн Єнс Крістоф (DE)

(73) Володілець (володільці):

КВС СААТ СЕ ЕНД КО. КГАА,
Grimsehlstraße 31, 37574 Einbeck, Germany (DE)

(74) Представник:

Кістерський Кирило Арсенійович, реєстр.
№207

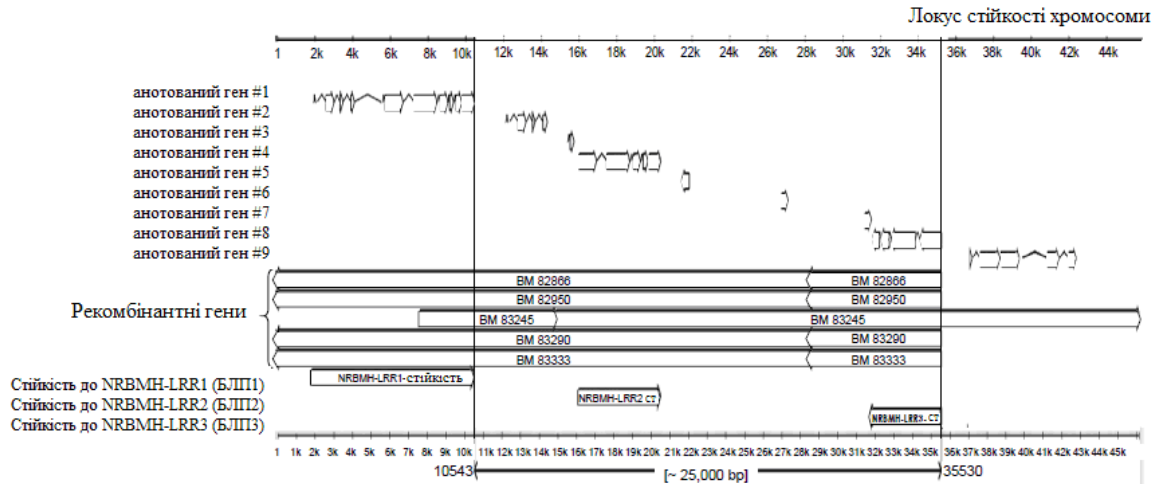
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2014/127835 A1, 28.08.2014
Targeted Next-Generation Sequencing Identification
of Mutations in Disease Resistance Gene Analogs
(RGAs) in Wild and Cultivated Beets / Piergiorgio
Stevanato et al. // Genes. 01.10.2017. Vol. 8. no. 10.
P. 264, DOI: 10.3390/genes8100264
Crop wild relative populations of Beta vulgaris allow
direct mapping of agronomically important genes /
Gina G. Capistrano-Gossman et al. // Nature
Communications. 06.06.2017. Vol. 8. P. 15708, DOI:
10.1038/ncomms15708
The genome of the recently domesticated crop plant
sugar beet (Beta vulgaris) / Juliane C. Dohm et al. //
Nature. 18.12.2013. Vol. 505. no. 7484. P. 546-549,
DOI: 10.1038/nature12817
Positional cloning of a gene for nematode resistance
in sugar beet / Cai D. et al. // Science, American
Association for the advancement of science. 1997.
Vol. 275. P. 832-834, DOI:
10.1126/SCIENCE.275.5301.832
Genetic approaches to sustainable pest
management in sugar beet (Beta vulgaris) / C.-L.
Zhang et al. // Annals of applied biology. 2008. Vol.
152. no. 2. P. 143-156, DOI: 10.1111/j.1744-
7348.2008.00228.X
Identification and Validation of a SNP Marker Linked
to the Gene HsBvm-1 for Nematode Resistance in
Sugar Beet / Piergiorgio Stevanato et al. // Plant
molecular biology reporter. 2014. Vol. 33. no. 3. P.
474-479, DOI: 10.1007/s11105-014-0763-8
Nematode-tolerant sugar beet varieties - resistant or
susceptible to the Beet Cyst Nematode Heterodera
schachtii? / Reuther M. // Zuckerindustrie. Sugar
industry. 01.04.2017. P. 277-284 DOI:
10.1016/j.fcr.2011.02.007

(54) ГЕН СТІЙКОСТІ ДО ПАТОГЕНУ РОДУ HETERODERA

(57) Реферат:

UA 130919 C2

Винахід стосується більш ефективної селекції проти зараження бурякової цистоутворюючою нематодою або виведення нових стійких ліній можлива за рахунок забезпечення наявності молекули нуклеїнової кислоти, що опосередковує стійкість до *Heterodera* за даним винаходом; зокрема, домінуючий ефект стійкості у цільовій рослині забезпечений властивістю ідентифікованої молекули нуклеїнової кислоти. Молекула нуклеїнової кислоти, що опосередковує стійкість до *Heterodera*, та варіанти здійснення даного винаходу, які описані вище, пропонують додаткові галузі застосування, наприклад, використання алелю гена стійкості в цис-генетичних або трансгенетичних підходах з метою отримання нових стійких сортів.



Даний винахід належить до молекули нуклеїнової кислоти, яка, якщо присутня в рослині, здатна надавати стійкість до патогену роду *Heterodera*, зокрема до бурякової цистоутворюючої нематоди *Heterodera schachtii*, і, зокрема, в рослині виду *Beta vulgaris*, а також до поліпептиду, що кодується молекулою нуклеїнової кислоти за даним винаходом. Зокрема, молекула нуклеїнової кислоти за даним винаходом характеризується тим, що ефект стійкості до патогенів роду *Heterodera*, який забезпечується присутністю молекули нуклеїнової кислоти, є домінуючим. Крім того, винахід належить до стійкої до *Heterodera* рослини, рослинній клітині, органу рослини, рослинної тканини, частини рослини, або насіння або нащадку рослини, які містять молекулу нуклеїнової кислоти або її частини у вигляді ендogenous гена, у вигляді редагованого гена або у вигляді трансгену. Крім того, даний винахід включає способи підвищення стійкості до патогену роду *Heterodera* у рослини, зокрема у рослини виду *Beta vulgaris*, а також способи отримання або ідентифікації і, можливо, селекції рослини, стійкої до *Heterodera*. Даний винахід також включає способи моніторингу зараження патогеном *Heterodera schachtii*, а також олігонуклеотидні зонди та праймери для гібридизації з молекулою нуклеїнової кислоти за даним винаходом.

ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВІНАХІДУ

Згідно з повідомленнями, понад два десятки різних видів нематод завдають економічної шкоди комерційному виробництву цукрового буряка (Hafez, Sugar Beet nematodes in Idaho and Eastern Oregon (1997 р.), Університет Айдахо, Сільськогосподарський коледж). Найбільш серйозним нематодним шкідником буряка є бурякова цистоутворююча нематода (*Heterodera schachtii*). (Cooke, Agricultural Zoology Reviews, 2, (1987 р.), стор. 132-183), що має найбільше економічне значення в більшості бурякових районів у Німеччині та Європі. Вперше вона була виявлена у 1859 р. у Німеччині, і, згідно з оцінками, в даний час 10-25 % площ, зайнятих у виробництві цукрового буряка, у всьому світі можуть бути заражені цим шкідником, що призводить до втрати врожаю до 80 % (Hafez, 1997 р.), при цьому втрата врожаю залежить від кількості нематод у ґрунті, часу посіву та зараження цукрового буряка, а також від погодних умов.

Бурякова цистоутворююча нематода є рослинною патогенною нематодою і здатна викликати значну втрату врожаю не тільки цукрового буряка, але й інших видів буряка, такого як червоний буряк, кормовий буряк і листовий буряк, а також інших рослин сімейства *Amaranthaceae*, таких як шпинат, і *Brassicaceae*, таких як ріпак, капуста, пекінська капуста, цвітня капуста, брюссельська капуста, броколі, ріпа, редис і бруква, за рахунок серйозного пошкодження кореневих систем, особливо влітку. Ця нематода також вражає багато широко поширених бур'янів, таких як суріпка, грицики, марь біла і портулак.

На полях цукрового буряка зараження бурякової цистоутворюючої нематодою спочатку проявляється у вигляді округлих або овальних ділянок низькорослих рослин. Нематоди живляться корінням рослин, що знижує здатність рослини поглинати поживні речовини та воду. Отже, наземні симптоми виглядають як дефіцит поживних речовин або посуха, зниження стеблестію, мізерне зростання, низькорослість, пожовтіння і в'янення, при цьому симптоми варіюються в залежності від стадії зростання на момент зараження. Якщо заражені сходять, то симптоми включають низькорослість і зниження росту листя, і в спекотний період дня старе зовнішнє листя жовтіє і в'яне. Заражена культура містить дрібніші рослини зі зниженою цінністю та якістю, і буде слабко конкурувати з бур'янами.

Хвороба поширюється безперервно, і виробникам стає важче боротися з цим шкідником. Проте, боротьба зі шкідником вкрай важлива, оскільки висока популяція нематод у ґрунті може призвести до нерентабельності виробництва цукрового буряка. Існують різні методи боротьби з цією хворобою, але жоден із застосовуваних в даний час методів не дає задовільних результатів. Хімічна боротьба з *Heterodera schachtii* з використанням нематодіцидів не тільки тягне за собою витрати для фермера і забруднює довкілля, але й більш неприпустима в багатьох країнах, при цьому знезараження ґрунту на великих полях не застосовується. Крім того, сівозмінна, при якій цукровий буряк вирощують тільки раз на чотири роки або навіть рідше з метою зменшення популяції нематод, не завжди доцільна і недостатньо ефективна. Ще одна поширена практика боротьби зі шкідником включає вирощування стійких до нематод проміжних культур, таких як олійна редька або гірчиця. Ці рослини приваблюють шкідника, але перешкоджають його розвитку та розмноженню, що скорочує популяцію шкідника. Також можливо вирощувати стійкі або нечутливі сорти цукрового буряка. До цього часу найефективнішим методом зменшення популяції нематод у ґрунті було вирощування стійких сортів цукрового буряка.

При цьому в продажу є стійкі і нечутливі до нематод сорти цукрового буряка, наприклад, з основним геном стійкості до *Heterodera schachtii* з *Beta procumbens* (Heijbroek та співавт.,

Euphytica 38 (1988 p.), стор. 121-131; Lange та співавт., Матеріали 53-го конгресу IIRB, Брюссель (1990 p.), стор. 89-102). У переміщеному сегменті *Beta procumbens*, тобто, сегменті хромосоми 1 *B. procumbens*, інтегрованому в кінець хромосоми 9 *B. vulgaris*, ген Hs1pro-1 був ідентифікований шляхом позиційного клонування як причинний фактор (Cai та співавт., Science 275 (1997 p.), стор. 832-834). Однак при інтеграції сегменту хромосоми 1 *Beta procumbens* в геном *Beta vulgaris* в рослину привноситься не тільки необхідна стійкість до *Heterodera schachtii*, але і, швидше, часто небажані ознаки, такі як, наприклад, зниження врожайності внаслідок успадкування додаткових генів, які пов'язані з позитивною ознакою стійкості до *Heterodera*. Це явище також відоме під назвою "зчеплений вантаж". Отже, використання цього гена в селекції має обмеження, зумовлені значним зниженням урожайності внаслідок "зчепленого вантажу" та, крім того, зумовлені нестабільністю транслокації.

Ще одне джерело стійкості до нематод було виявлено у дикого морського буряка *B. vulgaris* subsp. *maritima* у матеріалах, зібраних у Франції (Hijner, Meded. Inst. rat. Suikerprod. 21 (1951 p.), стор. 1-13). Однак генетичні та функціональні передумови стійкості до *Heterodera*, та ідентичність генів стійкості досі залишаються зовсім невизначеними.

При цьому, як згадувалося вище, недолік сортів, що володіють описаною стійкістю, полягає в тому, що розвиток сорту є дуже трудомістким і складним внаслідок ускладненої спадковості, і за відсутності зараження таких сортів помітно нижчі показники врожайності у порівнянні зі звичайними сортами. Крім іншого, це може бути пов'язане з епігенетичною взаємодією деяких генів стійкості з генами, що відповідають за вироблення цукру, що призводить до зниження пристосованості рослин за відсутності патогену.

Практичне застосування нових методів селекції, заснованих на редагуванні генів, наприклад, за допомогою нуклеаз TALE або систем CRISPR, а також трансгенних підходів, неможливе, оскільки гени, що беруть участь у розвитку стійкості, не ідентифіковані і не охарактеризовані.

Для стійкої селекції проти бурякової цистоутворюючої нематоди, тобто для протидії небезпеці варіантів *Heterodera*, що долають стійкість, необхідно постійно виявляти нові гени стійкості та інтегрувати їх у генні пули культурних рослин, таких як цукровий буряк. Зокрема, мета полягала у забезпеченні наявності відповідних генів стійкості, які, якщо присутні у рослині, самі собою вже справляють дуже великий домінуючий ефект стійкості до *Heterodera schachtii*. Згідно з винаходом, ця мета досягається за допомогою варіантів здійснення, описаних у формулі винаходу та в описі.

ОПИС ВИНАХІДУ

Даний винахід належить до молекули нуклеїнової кислоти, яка здатна надавати стійкість до патогену роду *Heterodera*, зокрема, до бурякової цистообразующей нематоди *Heterodera schachtii*, в рослині, і, зокрема, *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*. Молекула нуклеїнової кислоти, присутня в рослині, справляє домінуючий ефект стійкості до *Heterodera schachtii*.

Крім того, винахід належить до стійкої до *Heterodera* рослини, рослинної клітини, органу рослини, рослинної тканини, частини рослини, насіння, насіннєвого матеріалу або нащадку рослини, які ендегенно або трансгенно містять молекулу нуклеїнової кислоти або її частини. Згідно з конкретним необов'язковим варіантом здійснення, виключаються ті рослини та їхні компоненти, які були отримані виключно за допомогою суттєво біологічного процесу.

Способи підвищення стійкості до *Heterodera* у рослини, зокрема у рослини виду *Beta vulgaris*, а також способи отримання або ідентифікації і, можливо, селекції рослини, стійкої до *Heterodera*, також включені в даний винахід. Даний винахід також включає способи моніторингу зараження патогеном *Heterodera schachtii*, а також олігонуклеотиди як зонди та праймери для гібридизації з молекулою нуклеїнової кислоти за даним винаходом.

Отже, даний винахід належить до варіантів здійснення, які перераховані в наступних пунктах та проілюстровані прикладами та фігурами.

[1] Молекула нуклеїнової кислоти для підвищення стійкості до патогену роду *Heterodera* у рослини, в якій експресується молекула нуклеїнової кислоти, що відрізняється тим, що молекула нуклеїнової кислоти обрана з групи, що складається з:

(а) нуклеотидної послідовності, яка містить послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID №№ 1, 4 та 7, або її функціонального фрагмента;

(b) нуклеотидної послідовності, яка містить кодуючу послідовність, обрану з групи, що складається з SEQ ID №№ 2, 5 та 8, або її функціонального фрагмента;

(с) нуклеотидної послідовності, яка в суворих умовах гібридується з комплементарною послідовністю нуклеотидної послідовності за п. (а), (b), (f) або (g), і переважно, яка, якщо присутня в рослині, здатна надавати стійкість до патогену роду *Heterodera*;

(d) нуклеотидної послідовності, яка містить послідовність ДНК, яка щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 92 %, щонайменше на 94 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 %, або щонайменше на 99 % ідентична послідовності ДНК нуклеотидної послідовності за будь-яким пп. (a), (b), (f) або (g), і, переважно, яка, якщо присутня в рослині, здатна надавати стійкість до патогену роду *Heterodera*;

(e) нуклеотидної послідовності, що містить послідовність ДНК, яка є алелем або похідним (a), (b), (f) або (g), шляхом делеції, заміщення, вставки, транзиції і/або приєднання одного або декількох нуклеотидів, та переважно, яка, якщо присутня у рослині, здатна надавати стійкість до патогену роду *Heterodera*;

(f) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид з амінокислотною послідовністю, обраної з групи, що складається з SEQ ID № 3, 6 і 9, або її функціонального фрагмента;

(g) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид з амінокислотною послідовністю, яка щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 92 %, щонайменше на 94 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 % або щонайменше на 99 % ідентична амінокислотній послідовності, обраної з групи, що складається з SEQ ID № 3, 6 і 9;

(h) нуклеотидної послідовності, яка є варіантом послідовності ДНК за будь-яким з пп. (a) – (g) внаслідок виродженості генетичного коду, і переважно, яка, якщо присутня у рослині, здатна надавати стійкість до патогену роду *Heterodera*.

[2] Молекула нуклеїнової кислоти за п. [1], що відрізняється тим, що молекула нуклеїнової кислоти надає стійкості до патогену роду *Heterodera*, який переважає в рослині.

[3] Молекула нуклеїнової кислоти за п. [1] або п. [2], що відрізняється тим, що молекула нуклеїнової кислоти походить з *Beta vulgaris* subsp. *maritima*.

[4] Поліпептид, який кодується молекулою нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3].

[5] Вектор або експресійна касета, що містить молекулу нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3], в якій молекула нуклеїнової кислоти переважно гетерологічна вектору або експресійній касеті, або в якій молекула нуклеїнової кислоти переважно пов'язана з гетерологічним регуляторним елементом, переважно промотором або термінатором.

[6] Клітина, яка містить молекулу нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3], вектор або експресійну касету за п. [5], або поліпептид за п. [4], в якій молекула нуклеїнової кислоти або експресійна касета переважно присутня у вигляді ендегену або у вигляді трансгену.

[7] Рослина або її частина, що відрізняються тим, що рослина або її частина містять молекулу нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3] ендегенно або трансгенно, або вектор або експресійну касету за п. [5], причому рослина, що ендегенно містить молекулу нуклеїнової кислоти, переважно є рослиною роду *Beta*, зокрема виду *Beta vulgaris*, але не *Beta vulgaris* subsp. *maritima*. Зазначена рослина переважно являє собою рослину, що має стійкість до патогену роду *Heterodera*.

[8] Рослина за п. [7], що відрізняється тим, що рослина є гібридною рослиною.

[9] Рослина за п. [7] або п. [8], що відрізняється тим, що молекула нуклеїнової кислоти гетерозиготно або гомозиготно присутня в геномі рослини.

[10] Насіння або нащадки рослини за одним із пп. [7]-[9], причому насіння або нащадок трансгенно чи ендегенно містить молекулу нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3], або вектор або експресійну касету за п. [5].

[11] Насіння за п. [10], яке було технічно оброблено, при цьому технічна обробка вибирається з групи, що складається з:

(a) шліфування;

(b) протруювання, переважно дражування;

(c) інкрустації;

(d) забарвлення.

[12] Спосіб підвищення стійкості до патогену роду *Heterodera* у рослини, переважно у рослини виду *Beta vulgaris*, що включає наступні етапи:

(i) інтеграція молекули нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3], або вектора або експресійної касети за п. [5] за допомогою репарації, що спрямовується гомологією, або гомологічної рекомбінації, переважно підтримуваної сайт-спрямованою нуклеазою, в геном щонайменше однієї клітини рослини, переважно рослини виду *Beta vulgaris*, та необов'язкова регенерація рослини з рослинної клітини; або

(ii) збільшення експресії молекули нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3] щонайменше в одній клітині рослини, переважно шляхом модифікації нативного промотору або злиття, переважно оперативного зв'язування молекули нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3] з

гетерологічним промотором, який має більш високий рівень активності, ніж нативний промотор, зокрема під час або після зараження *Heterodera*, і необов'язкова регенерація рослини щонайменше з однієї рослинної клітини; або

(iii) підвищення активності і/або стабільності поліпептиду за п. [4] шляхом модифікації нуклеотидної послідовності молекули нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3] щонайменше в одній клітині рослини та необов'язкова регенерація рослини щонайменше з однієї рослинної клітини; або

(iv) трансформація рослинної клітини молекулою нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3], або вектором або експресійною касетою за п. [5], та необов'язкова регенерація рослини з трансформованої рослинної клітини;

причому стійкість до *Heterodera* переважно є стійкістю до *Heterodera schachtii*, або рослина переважно є рослиною виду *Beta vulgaris*, переважно *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, и, зокрема, є цукровим буряком.

[13] Спосіб отримання рослини, що має стійкість до патогену роду *Heterodera* за одним із пп. [7]-[9], що включає наступні етапи:

(a) трансформація рослинної клітини молекулою нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3], або вектором або експресійною касетою за п. [5]; та

(b) регенерація трансгенної рослини з трансформованої рослинної клітини; або

(i) введення сайт-спрямованої нуклеази і матриці репарації в клітину рослини, переважно рослини роду *Beta*, більш переважно рослини виду *Beta vulgaris*, причому сайт-спрямована нуклеаза здатна генерувати щонайменше один одноланцюговий розрив або щонайменше один дволанцюговий розрив ДНК в геномі клітини, переважно проти перебігу транскрипції, по перебігу транскрипції або в межах цільової ділянки, яка є гомологічною молекулі нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3], і матриця репарації містить молекулу нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3];

(ii) культивування клітини з п. (i) в умовах, які допускають репарацію, що спрямовується гомологією, або гомологічну рекомбінацію, при цьому молекула (молекули) нуклеїнової кислоти інтегруються з матриці репарації в геном рослини; і

(iii) регенерація рослини з клітини, модифікованої за п. (ii); або

(I) введення сайт-спрямованої нуклеази або редактора основ у клітину рослини, переважно рослини роду *Beta*, більш переважно рослини виду *Beta vulgaris*, в якій сайт-спрямована нуклеаза генерує щонайменше один одноланцюговий розрив або щонайменше один дволанцюговий розрив ДНК в геномі клітини, переважно проти перебігу транскрипції, по перебігу транскрипції або в межах цільової ділянки, яка є гомологічною молекулі нуклеїнової кислоти за одним з пп. [1]-[3]

(II) культивування клітини з п. (I) в умовах, які допускають модифікацію цільової ділянки, вибирається з:

(1) заміни щонайменше одного нуклеотиду;

(2) делеції щонайменше одного нуклеотиду;

(3) вставки щонайменше одного нуклеотиду; або

(4) будь-якої комбінації пп. (1)-(3), у якій переважно модифікація збільшує активність і/або стабільність поліпептиду за п. [4]; і

(III) регенерація рослини з клітини, модифікованої в п. (II).

[14] Спосіб за п. [13], який відрізняється тим, що цільова ділянка:

a) знаходиться між маркером s5e3001s02 та маркером s5e4668xxx, або

b) фланкована маркером s5e3001s02 та маркером s5e4668xxx, або

c) містить хромосомний інтервал між маркером s5e3001s02 та маркером s5e4668xxx, та необов'язково містить алельний варіант молекули нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3], причому алельний варіант не надає стійкості до патогену роду *Heterodera* або надає лише незначну стійкість до *Heterodera*, якщо він присутній в рослині.

[15] Спосіб за пп. [13] або [14], який відрізняється тим, що щонайменше один одноланцюговий розрив або щонайменше один дволанцюговий розрив відбувається в позиції, яка знаходиться максимум на 10000 пар основ проти перебігу транскрипції і/або по перебігу транскрипції щодо цільової ділянки, або яка відстоїть максимум на 10000 пар основ від алельного варіанту, визначеного в п. [14].

[16] Рослина або її частина, що отримані або можуть бути отримані способом за одним із пп. [13]-[15].

[17] Спосіб ідентифікації і, необов'язково, отримання або селекції рослини, переважно рослини виду *Beta vulgaris*, яка стійка до патогену роду *Heterodera*, відрізняється тим, що даний спосіб включає щонайменше етап (i) або (ii):

(i) виявлення присутності і/або експресії молекули нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3] або присутності поліпептиду за п. [4] у рослині або частині рослини; і/або

(ii) виявлення щонайменше однієї ділянки косегрегованої з нуклеотидною послідовністю молекули (молекул) нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3]; і

5 (iii) необов'язково селекція рослини, що володіє стійкістю до патогену роду *Heterodera*, переважно *Heterodera schachtii*.

[18] Спосіб ідентифікації молекули нуклеїнової кислоти, яка, якщо є в рослині, здатна надавати стійкість до патогену роду *Heterodera* в рослині, переважно в рослині виду *Beta vulgaris*, який відрізняється тим, що даний спосіб включає наступні етапи:

10 (i) порівняння амінокислотної послідовності поліпептиду за п. [4] з амінокислотними послідовностями з бази даних послідовностей або ідентифікація алельних варіантів, що кодують поліпептид за п. [4] у генотипах рослини;

(ii) ідентифікація амінокислотної послідовності або алельного варіанта, що кодує амінокислотну послідовність, в якій амінокислотна послідовність щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 92 %, щонайменше на 94 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 % або щонайменше на 99 % ідентична амінокислотної послідовності поліпептиду за п. [4];

20 (iii) введення молекули нуклеїнової кислоти або алельного варіанту, що кодує ідентифіковану амінокислотну послідовність, у рослину, переважно у рослину виду *Beta vulgaris*, і експресія молекули нуклеїнової кислоти в рослині; і

(iv) виявлення стійкості до патогену роду *Heterodera*.

[19] Спосіб культивування рослин, переважно рослин виду *Beta vulgaris*, що включає:

25 (i) отримання рослин за одним із пп. [7]-[9], отримання рослин за допомогою способу по одному з пп. [13]-[16], або ідентифікацію та селекцію рослин за допомогою способу за п. [17], і

(ii) культивування рослин з п. (i) або їхніх нащадків,

при цьому цей спосіб протидіє зараженню культурних рослин патогеном роду *Heterodera*.

30 [20] Олігонуклеотид довжиною щонайменше 15, 16, 17, 18, 19 або 20, переважно щонайменше 21, 22, 23, 24 або 25, дуже переважно щонайменше 30, 35, 40, 45 або 50, та особливо переважно щонайменше 100, 200, 300 або 500 нуклеотидів, який специфічно гібридується з нуклеотидною послідовністю, як визначено в одному з пп. [1]-[3].

35 [21] Пара олігонуклеотидів, переважно олігонуклеотиди за п. [20] або набір, що містить ці олігонуклеотиди, в якій олігонуклеотиди придатні для гібридизації як прямий праймер і зворотний праймер для ділянки в геномі *Beta vulgaris*, яка косегрегується як косегрегується в *Beta vulgaris* із стійкістю до патогену роду *Heterodera*, що надається молекулою нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3], при цьому переважно ділянка в геномі *Beta vulgaris* знаходиться між маркером s5e3001s02 і маркером s5e4668xxx, фланкована маркером s5e3001s02 і маркером s5e4668xxx.

40 [22] Використання молекули нуклеїнової кислоти за одним із пп. [1]-[3] у виробництві стійких до *Heterodera* рослин підвиду *Beta vulgaris subsp. vulgaris*.

[23] Спосіб, рослина або частина рослини, або пара олігонуклеотидів за будь-яким із попередніх пунктів, в якому

45 s5e3001s02 є одонуклеотидним поліморфізмом (SNP), переважно в позиції 56940072 п.о. хромосоми 5, що належить до генотипу EL10 *Beta vulgaris*, при цьому вказаний нуклеотид є нуклеотидом G або T, переважно одонуклеотидний поліморфізм (SNP), як зазначено в SEQ ID № 10 або 11, більш переважно зазначений нуклеотид є нуклеотидом T; і/або

50 s5e4668xxx є одонуклеотидним поліморфізмом (SNP), переважно в позиції 57809807 п.о. хромосоми 5, що належить до генотипу EL10 *Beta vulgaris*, при цьому вказаний нуклеотид є нуклеотидом G або T, переважно одонуклеотидний поліморфізм (SNP), як зазначено в SEQ ID № 12 або 13, більш переважно вказаний нуклеотид є нуклеотидом T.

[24] Рослина за п. [7], в якій рослина або дражоване насіння такої рослини має геном, що забезпечує розвиток тіла буряка з мінімальною свіжою масою 200 г, 250 г, 300 г, 350 г, 400 г, 450 г або 500 г, та максимальною масою 100 г, 1100 г, 1200 г, 1300 г, 1400 г, 1500 г, 1600 г, 1700 г, 1800 г, 1900 г або 2000 г.

[25] Рослина за п. [7] або [24], рослина цукрового буряка або дражоване насіння такої рослини, в якій геном рослини цукрового буряка забезпечує розвиток тіла буряка з концентрацією цукрози у свіжій масі тіла буряка щонайменше 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % або навіть 20 % (відсотків за масою).

[26] Молекулярний маркер, олігонуклеотид або праймер, що містить один із наступних SEQ ID №№, зазначених в таблиці 4, або SEQ ID №, обраний з групи, що складається з SEQ ID №№ 10-13.

5 [27] Молекулярний маркер, олігонуклеотид або праймер, отриманий з молекулярного маркера, олігонуклеотиду або праймера за п. [26], причому молекулярний маркер, олігонуклеотид або праймер придатні для селекції рослини, що містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. [1].

10 [28] Молекулярний маркер, олігонуклеотид або праймер за п. [26] або [27], що містять одну або кілька хімічних модифікацій або домішок, обраних з групи, що складається з: нуклеотидів з видаленою азотистою основою; нуклеотидів 8'охо dA і/або 8'охо dG; зворотней основи на їхньому 3'-кінці; 2'О-метильних нуклеотидів; 5'-кінцевого кепи; модифікації остова, обраної з групи, що складається з модифікації фосфотіоату, модифікації метилфосфонату, модифікації закритої нуклеїнової кислоти (LNA), модифікації О-(2-метоксиетил) (МОЕ), модифікації di PS та модифікації пептидної нуклеїнової кислоти (PNA); внутрішньотяжових містків; флуоресцентних барвників, кон'югованих із ними; флуоресцентних барвників, кон'югованих з ними на 5' або 3' кінці GRON; та однієї або кількох основ, які збільшують енергію гібридизації; 2'О-метильних нуклеотидів на їхньому 5' кінці; 2'О-метильних нуклеотидів на їхньому 3' кінці, флуоресцентного барвника, кон'югованого з їхнім 5'-кінцем, флуоресцентного барвника, кон'югованого з їхнім 3'-кінцем, залишків фосфотіоату на їхньому 5'-кінці, залишків фосфотіоату на їхньому 3'-кінці, 3'-блокуючих заступників, 5'-блокуючих заступників, як 3'-, так і 5'-блокуючих заступників.

По-перше, деякі терміни, які використовуються в даній заявці, докладно пояснені нижче:

Рід *Heterodera* включає різні види, наприклад, види *Heterodera amygdali*, *Heterodera arenaria*, *Heterodera aucklandica*, *Heterodera avenae*, *Heterodera bergeniae*, *Heterodera bifenestra*, *Heterodera cacti*, *Heterodera cajani*, *Heterodera canadensis*, *Heterodera cardiolata*, *Heterodera carotae*, *Heterodera cicero*, *Heterodera cruciferae*, *Heterodera delvii*, *Heterodera elachista*, *Heterodera filipjevi*, *Heterodera gambiensis*, *Heterodera glycines*, *Heterodera goettingiana*, *Heterodera hordecalis*, *Heterodera humuli*, *Heterodera latipons*, *Heterodera longicaudata*, *Heterodera medicaginis*, *Heterodera oryzae*, *Heterodera oryzicola*, *Heterodera rosii*, *Heterodera rostochiensis*, *Heterodera sacchari*, *Heterodera schachtii*, *Heterodera tabacum*, *Heterodera trifolii*, *Heterodera ustini* та *Heterodera zeae*.

У поєднанні із зазначенням довжини нуклеотидної послідовності термін "приблизно" означає відхилення на +/- 200 пар основ, переважно +/- 100 пар основ і особливо переважно на +/- 50 пар основ.

35 "Рослина роду *Beta*" належить до сімейства амарантових (*Amaranthaceae*). До числа цих рослин входять рослини видів *Beta macrocarpa*, *Beta vulgaris*, *Beta lomatogona*, *Beta macrorhiza*, *Beta corolliflora*, *Beta trigyna* і *Beta nana*. Рослина виду *Beta vulgaris* є, зокрема, рослиною підвиду *Beta vulgaris subsp. vulgaris*. Наприклад, до неї належать *Beta vulgaris subsp. vulgaris var. altissima* (цукровий буряк у вужчому сенсі), *Beta vulgaris ssp. vulgaris var. vulgaris* (листовий буряк), *Beta vulgaris ssp. vulgaris var. conditiva* (підсвекольник /червоний буряк), *Beta vulgaris ssp. vulgaris var. crassa/alba* (кормовий буряк). Слід зазначити, що нуклеїнова кислота за даним винаходом не зустрічається в природі в цукровому буряку, листовому буряку, підсвекольнику або кормовому буряку, але може бути введена в них людиною.

45 "Функціональний фрагмент" нуклеотидної послідовності означає сегмент нуклеотидної послідовності, який має функціональність, ідентичну або порівнянну з функціональністю повної нуклеотидної послідовності, з якої походить функціональний фрагмент. Функціональний фрагмент як такий може володіти нуклеотидною послідовністю, яка ідентична або гомологічна загальній нуклеотидній послідовності за довжиною щонайменше 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %. Сюди також явно входить діапазон від 90 % до 100 %. Крім того, "функціональний фрагмент" нуклеотидної послідовності може також означати сегмент нуклеотидної послідовності, який змінює функціональність всієї нуклеотидної послідовності, наприклад, під час посттранскрипційного або транскрипційного сайленсингу генів. Функціональний фрагмент нуклеотидної послідовності як такої може містити щонайменше 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або 25, переважно щонайменше 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 або 140, і особливо переважно щонайменше 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, або 1000 послідовних нуклеотидів загальної нуклеотидної послідовності. Сюди також явно входить діапазон від 21 % до 50 % нуклеотидів.

55 "Функціональна частина" білка означає сегмент білка або ділянку амінокислотної послідовності, який кодує білок, при цьому сегмент може проявляти функціональність, ідентичну або порівнянну з функціональністю всього білка в рослинній клітині. По довжині щонайменше 60 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %

функціональна частина білка містить амінокислотну послідовність, яка ідентична або, з урахуванням консервативних та напівконсервативних амінокислотних обмінів, аналогічна білку, з якого походить функціональна частина.

Термін "гетерологічний" означає, що введений полінуклеотид походить з клітини або організму з іншим фоновим генотипом, того ж виду або іншого виду, або є гомологічним прокаріотичний або еукаріотичний клітині-хазяїна, але потім знаходиться в іншому генетичному середовищі і, таким чином, відрізняється від відповідного полінуклеотиду, який, можливо, присутній природним чином. Гетерологічний полінуклеотид може бути присутнім на додаток до відповідного ендогенного гена.

За змістом винаходу під "гомологом" розуміється білок однакового філогенетичного походження; під "аналогом" розуміється білок, який виконує однакову функцію, але має інше філогенетичне походження; під "ортологом" розуміється білок з іншого виду, який виконує ту саму функцію; і під "паралогом" розуміється білок, який з'явився всередині виду внаслідок дублювання, при цьому ця копія зберігає однакову функцію білка, змінює шаблон його експресії, але не функцію, змінює його функцію білка або розділяє вихідну функцію гена між обома копіями.

Під "гібридизацією" слід розуміти процес, в якому одноланцюгова молекула нуклеїнової кислоти пов'язується з ланцюгом нуклеїнової кислоти, яка комплементарна максимально можливою мірою, тобто утворює з нею пари основ. Стандартні методи гібридизації описані, наприклад, в Sambrook і співавт., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3-е вид., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001 р. Під цим переважно розуміють, що щонайменше 60 %, більш переважно щонайменше 65 %, 70 %, 75 %, 80 % або 85 %, і особливо переважно 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % основ молекули нуклеїнової кислоти утворюють пари основ з ланцюгом нуклеїнової кислоти, яка є комплементарною максимально можливою мірою. Можливість такого відпалу залежить від суворості умов гібридизації. Термін "суворість" належить до умов гібридизації. Висока суворість присутня у тому разі, коли спарювання основ ускладнене; низька суворість присутня у тому разі, коли спарювання основ спрощено. Наприклад, суворість умов гібридизації залежить від концентрації солі або іонної сили та температури. В цілому, суворість може бути збільшена шляхом підвищення температури і/або зменшення вмісту солі. Під "суворими умовами гібридизації" слід розуміти умови, за яких гібридизація відбувається переважно лише між гомологічними молекулами нуклеїнових кислот. Отже, термін "умови гібридизації" належить не тільки до умов, що переважають при фактичному додаванні нуклеїнових кислот, але також і до умов, що переважають наступні стадії промивання. Наприклад, суворі умови гібридизації являють собою умови, за яких гібридизуються переважно лише ті молекули нуклеїнових кислот, які мають щонайменше 70 %, переважно щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 % або щонайменше 95 % ідентичності послідовностей. Суворими умовами гібридизації є, наприклад: гібридизація в 4 x SSC (розчин цитрату і хлориду натрію) при 65 °C і подальше повторне промивання в 0,1 x SSC при 65 °C протягом загалом приблизно 1 години. Гібридизація відбувається переважно у суворих умовах.

Щодо нуклеїнової кислоти у формі дволанцюгової ДНК "комплементарна" нуклеотидна послідовність означає, що другий ланцюг ДНК, комплементарний першому ланцюзі ДНК, має нуклеотиди, відповідні основ першого ланцюга, відповідно до правил спарювання основ. Комплементарна послідовність переважно повністю комплементарна контрпослідовності і, таким чином, переважно має ту ж довжину.

Під "ізолюваною молекулою нуклеїнової кислоти" розуміється молекула нуклеїнової кислоти, екстрагована з її природного чи вихідного середовища. Цей термін також включає молекулу нуклеїнової кислоти, отриману синтетичним способом. Під "ізолюваним поліпептидом" розуміється поліпептид, екстрагований з його природного чи вихідного середовища. Цей термін також включає поліпептид, отриманий синтетичним способом.

"Молекулярний маркер" є нуклеїновою кислотою, яка є поліморфною в популяції рослин і використовується як еталон або орієнтир. Маркер виявлення явища рекомбінації повинен бути придатний для моніторингу відмінностей або поліморфізмів у популяції рослин. Отже, подібний маркер здатний виявляти та розрізняти різні алельні стани (алелі). Термін "молекулярний маркер" також належить до нуклеотидних послідовностей, які є комплементарними або щонайменше значною мірою комплементарними або гомологічними щодо геномних послідовностей, наприклад, нуклеїнових кислот, що використовуються як зонди або праймери. Ці відмінності на рівні ДНК повинні бути виявлені як маркери і являють собою, наприклад, відмінності в полінуклеотидних послідовностях, наприклад, SSR (прості послідовності, що повторюються), RFLP (поліморфізми довжин рестрикційних фрагментів), FLP (поліморфізми

довжин фрагментів) або SNP (однонуклеотидні поліморфізми). Маркери можуть бути отримані з геномних або експресованих нуклеїнових кислот, наприклад, сплайсованих РНК, кДНК або EST (маркерні послідовності, що експресуються), і можуть також належити до нуклеїнових кислот, які використовуються як пари зондів або праймерів, і як такі придатні для ампліфікації фрагмента послідовності з використанням способів, заснованих на ПЛР. Маркери, які описують генетичні поліморфізми (між частинами популяції), можуть бути виявлені з використанням добре обґрунтованих способів попереднього рівня техніки (An Introduction to Genetic Analysis, 7-е видання, Griffiths, Miller, Suzuki та співавт., 2000 р.). В їх число входять, наприклад, секвенування ДНК, заснована на ПЛР і специфічна для послідовності ампліфікація, перевірка RFLP, перевірка полінуклеотидних поліморфізмів за допомогою аллель-специфічної гібридизації (ASH), виявлення ампліфікованих варіабельних послідовностей геному рослини, виявлення 3SR (реплікація послідовностей, що самопідтримується), виявлення SSR, SNP, RFLP або AFLP (поліморфізмів довжин ампліфікованих фрагментів). Крім того, також відомі способи виявлення EST (маркерних послідовностей, що експресуються) і SSR-маркерів, отриманих з послідовностей EST і RAPD (випадково ампліфікованої поліморфної ДНК). Залежно від контексту, термін "маркер" в описі також може означати конкретне положення хромосоми в геномі виду, де може бути виявлений конкретний маркер (наприклад, SNP).

Маркери також включають синтетичні олігонуклеотиди, які можуть бути пов'язані з однією або декількома молекулами виявлення, причому молекули виявлення можуть бути використані для реакції виявлення або генерації сигналу в рамках способу верифікації. Синтетичні олігонуклеотиди також включають мічені праймери. Мічені праймери є штучними сполуками, які не зустрічаються в природі і не можуть бути виділені із природи. Отримання таких сполук докладно описано далі.

"Промотор" являє собою нетрансльовану регуляторну послідовність ДНК, зазвичай розташовану проти перебігу транскрипції від ділянки кодування, яка містить точку зв'язування для РНК-полімерази і ініціює транскрипцію ДНК. Крім того, промотор містить інші елементи, які діють як ген-регулятор експресії генів (наприклад, цис-регуляторні елементи). "Основний або мінімальний промотор" є промотором, який містить основні елементи, необхідні для ініціації транскрипції (наприклад, TATA-бокс і/або ініціатор).

"Патоген" означає організм, який при взаємодії з рослиною призводить до появи симптомів захворювання в одному або кількох органах рослини. Використовуваний термін "патоген" означає нематоду, зокрема нематоду роду *Heterodera*.

Під "патогенною інфекцією" слід розуміти найбільш ранній момент часу, в який патоген взаємодіє з тканиною рослини-хазяїна. У цьому сенсі "зараження" означає виникнення контакту між патогеном та хазяїном. У разі *Heterodera schachtii* цисти активуються в ґрунті, молоді особини вилуплюються після завершення розвитку до молодих особин другої стадії, і заражають коріння рослин-хазяїнів. Нематоди проникають в зону розтягу за верхівкою кореня та ініціюють трансформацію корневих клітин у синцитії (спеціалізовані поживні структури). Синцитії збільшуються одночасно з розвитком нематод до дорослих особин і можуть призвести до порушення функціонування коріння, що обмежує врожайність і призводить до втрати врожаю. За відсутності рослин-хазяїнів *Heterodera schachtii* здатний виживати в цистах у ґрунті протягом багатьох років.

"Органи" рослини означають, наприклад, листя, пагін, стебло, коріння, гіпокотиль, вегетативні бруньки, меристеми, зародки, пиляки, яйцеклітину, насіння або плоди. "Частини рослини" включають без обмеження пагін або стебло, листя, квіти, суцвіття, коріння, плоди і насіння, а також пилок. Термін "частини рослини" також означає поєднання кількох органів, наприклад, квітка або насіння, або частина органу, наприклад, поперечний розріз пагіна рослини. "Тканинами" рослини є, наприклад, калюсна тканина, що запасає тканину, меристематична тканина, тканина листа, тканина пагіна втечі, тканина кореня, тканина пухлини рослини або репродуктивна тканина, а також камбій, паренхіма, судинна тканина, склеренхіма та епідерміс. При цьому тканини не обмежуються цим переліком. Наприклад, під рослинними "клітинами" слід розуміти, наприклад, ізольовані клітини з клітинною стінкою або їх скупчення, або протопласти.

Щодо даного винаходу термін "регуляторна послідовність" належить до нуклеотидної послідовності, яка впливає на специфічність і/або силу експресії, наприклад, у тому сенсі, що регуляторна послідовність надає певної тканинної специфічності. Така регуляторна послідовність може бути розташована проти перебігу транскрипції від точки ініціації транскрипції мінімального промотора, але також і по перебігу транскрипції від неї, наприклад, транскрибуруемой, але не трансльовуемой лідерної послідовності або всередині інтрону. Термін

"регуляторна послідовність" може також охоплювати весь промотор або цис-елемент, який придатний для використання всередині промотора.

Термін "стійкість" слід розуміти широко, і він охоплює діапазон захисту від вповільнення до повного блокування розвитку хвороби. Одним із прикладів важливого патогена є *Heterodera schachtii*. Стійка рослинна клітина за винаходом або стійка рослина за винаходом переважно досягає стійкості до *Heterodera schachtii*, яка визначається як здатність рослини обмежувати розмноження нематод. Наприклад, збільшення стійкості може бути виміряно шляхом взяття зразків ґрунту та визначення кількості нематод і/або шляхом визначення кількості цист, що утворюються на коренях рослин.

"Трансгенна рослина" належить до рослини, геном якої інтегрований щонайменше один полінуклеотид. Отже, він може бути гетерологічним полінуклеотидом або екзогенним полінуклеотидом. Полінуклеотид переважно є стабільно інтегрованим, що означає стабільне збереження інтегрованого полінуклеотиду в рослині, його експресію, а також можливість стабільної передачі нащадкам. Стабільне введення полінуклеотиду в геном рослини також включає інтеграцію в геном рослини попереднього батьківського покоління, при цьому полінуклеотид може стабільно передаватися далі. Термін "гетерологічний" означає, що введений полінуклеотид походить з клітини або організму з іншим фоновим генотипом, при цьому клітина або організм можуть належати до того ж виду або іншого виду, або є гомологічними прокаріотичної або еукаріотичної клітини-господарю, наприклад, але потім розташовуються в іншому генетичному середовищі і, таким чином, відрізняються від відповідного полінуклеотиду, який, можливо, присутній природним чином. Гетерологічний полінуклеотид може бути присутнім на додаток до відповідного ендogenous гена.

Використовуваний тут термін "рослина" означає будь-яка дводольна або однодольна рослина, зокрема рослина сімейства *Amaranthaceae*, така як *Beta vulgaris* і *Spinacia oleracea*, і *Brassicaceae*, така як *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus*, *Brassica juncacea*, *Brassica nigra*, *Eruca vesicaria* subsp. *sativa*.

Зразки та варіанти здійснення даного винаходу описані як приклад з посиланням на очікувані послідовності та фігури.

Фіг. 1 Ілюстрація картування та складання послідовності в цільовій ділянці на хромосомі 5 (вісь x: фізична відстань у тисячах пар основ (1 тис. = 1000 п.о.)):

Верхня частина = складання з дев'яти анотованих генів (#1 - #9); напрямок стрілок позначає 5'-3'-напрямок кожного передбачуваного гена.

Середня частина = ілюстрації різних генетичних інтрогресії зразків з явищ рекомбінації *B. vulgaris* subsp. *maritima* (BM) зазначені відповідно до їх локалізації.

Нижня частина = фізичне картування генів-кандидатів LRR1, LRR2 та LRR3 відповідно до SEQ ID №№ 1, 4 та 7.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХІДУ

Даний винахід належить до молекули нуклеїнової кислоти, яка здатна надавати стійкість до патогену роду *Heterodera*, якщо присутня в рослині, зокрема, в рослині виду *Beta vulgaris*, більш переважно в *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*. Зокрема, молекула нуклеїнової кислоти надає стійкості до патогену роду *Heterodera* в рослині, в якій експресується поліпептид, що кодується молекулою нуклеїнової кислоти. Відповідно до найкращого варіанта здійснення винаходу патогеном є *Heterodera schachtii*, який є однією з найважливіших патогенних нематод цукрового буряка і може викликати втрату врожаю до 80 %. *Heterodera schachtii* може призвести до значної втрати врожаю не тільки цукрових буряків, але й інших видів буряків, таких як червоний та листовий буряк, ревінь та шпинат, а також овочевих культур *Brassica*, таких як капуста, пекінська капуста, цвітна капуста, брюссельська капуста, броколі, ріпа, редис та бруква, шляхом серйозного пошкодження кореневої системи.

Даний винахід заснований на генетичному точному картуванні, ідентифікації, виділенні та характеристикації гена та локусу гена, відповідно, який походить від донора *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, присутність якого в рослині, зокрема, *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, що корелює зі стійкістю відповідної рослини до зараження *Heterodera* або є причиною такої стійкості. Вихідним матеріалом була популяція *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, зібрана у Франції (Hijner, 1951).

За допомогою інтенсивного точного картування та клонування на основі карт було ідентифіковано та секвеновано локус стійкості, що дозволяє провести порівняння послідовностей між стійким та чутливим еталонним генотипом (Фіг. 1). Було показано, що цільова ділянка має високий рівень складності, оскільки локус стійкості містить великі дуплікації послідовностей, і, зокрема, у чутливих генотипах кілька ретротранспозонів вбудовані в цільову ділянку. Було встановлено, що локус стійкості містить сім анотованих генів, включаючи три тандемно повторювані гени LRR, які були визначені як гени-кандидати, що надають стійкість до

Heterodera (LRR1, LRR2 і LRR3), причому ці три гени LRR демонструють схожість послідовностей.

Отже, даний винахід належить до молекули нуклеїнової кислоти і поліпептиду, що кодується зазначеною молекулою нуклеїнової кислоти, відповідно, що надають переважно стійкість до патогену роду *Heterodera*, зокрема *Heterodera schachtii*. Молекула нуклеїнової кислоти за даним винаходом надає, зокрема, рослині роду *Beta*, стійкість до цього патогену. Молекула нуклеїнової кислоти за даним винаходом може бути ізольованою молекулою нуклеїнової кислоти. Переважно, це ДНК, і особливо переважно кДНК (кодуюча ДНК). Рослина переважно є рослиною виду *Beta vulgaris*, особливо переважно рослиною підвиду *Beta vulgaris subsp. vulgaris*; до них належать, наприклад, сорти цукрових буряків, підсвекольника, кормового буряка, листового буряка та мангольду.

В одному варіанті здійснення даного винаходу молекула нуклеїнової кислоти відповідно винаходу містить нуклеотидну послідовність, яка містить послідовність ДНК, зазначену в будь-якому з SEQ ID №№ 1, 4 і 7, і/або кодуючу послідовність відповідно до будь-якого з SEQ ID №№ 2, 5 та 8. Крім того, у даному винаході запропонована нуклеотидна послідовність, яка кодує поліпептид з амінокислотною послідовністю відповідно до одного з SEQ ID №№ 3, 6 і 9.

Як згадувалося вище, ген, ідентифікований за даним винаходом, є геном/білком стійкості типу NBS-LRR, який характеризується специфічними структурними мотивами. Загальна структура таких білків стійкості в рослинах вже добре вивчена (Martin та співавт., Annual Review Plant Biology, 54 (2003 p.), стор. 23-61). Однак принцип структурного варіанта здійснення – зокрема, того, що відомо як домен LRR, який застосовується як потенційний домен виявлення для більшості невідомих патогенних ефекторів – непередбачуваний, і функціональний фон генів стійкості, тобто, генетична структура, зазвичай значною мірою невідомий. Отже, ідентифікація гена чи білка, що надає стійкість до *Heterodera*, виключно на основі відомого структурного мотиву неможлива. Крім того, ділянка послідовності, як виявилось, має високий рівень складності, оскільки локус стійкості містить велику дуплікацію послідовності, і в чутливих генотипах кілька ретротранспозонів вбудовані в цільову ділянку, що особливо ускладнює розробку діагностичних маркерів, а також збір даних послідовності.

Крім того, послідовність ДНК нуклеотидної послідовності за даним винаходом можуть бути введені заміщення, делеції, вставки, приєднання і/або будь-які інші зміни, які окремо або в комбінаціях фактично змінюють нуклеотидну послідовність, при цьому модифікована нуклеотидна послідовність, тим не менш, може виконувати ту ж саму функцію, що і початкова послідовність. Розглянутий випадок охоплює послідовність нуклеїнових кислот, що містить послідовність ДНК, яка є алелем або похідним немодифікованої послідовності нуклеїнових кислот з даного винаходу і яка, якщо присутня в рослині, надає стійкість до патогену роду *Heterodera*, зокрема *Heterodera schachtii*. Крім того, у даному випадку йдеться про кодування амінокислотної послідовності, яка надає стійкість до патогену роду *Heterodera*, зокрема до *Heterodera schachtii*. Отже, в додатковому варіанті здійснення винахід включає нуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид, що являє собою похідне поліпептиду, який кодується нуклеотидною послідовністю за даним винаходом, або який включає амінокислотну послідовність за даним винаходом. Похідна амінокислотна послідовність, яка має щонайменше одне заміщення, делецію, вставку або приєднання однієї або декількох амінокислот, при яких функціональність поліпептиду/білка, що кодується, зберігається, являє собою похідне поліпептиду. Заміщення, делеції, вставки, приєднання і/або будь-які інші зміни окремо або в комбінаціях, які фактично змінюють нуклеотидну послідовність, але виконують ту ж функцію, що і вихідна послідовність, таким чином можуть бути введені в нуклеотидну послідовність з використанням звичайних способів, які відомі з попереднього рівня техніки, наприклад, за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу, методики TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes – цілеспрямований пошук індукованих локальних пошкоджень в геномах), ПЛР-опосередкованого мутагенезу, хімічно індукованого мутагенезу, редагування геному і т.д.

Заміщення однієї амінокислоти іншою амінокислотою з однаковими або еквівалентними або подібними хімічними/фізичними властивостями називається "консервативним заміщенням" або "напівконсервативним заміщенням". Прикладами фізичних/хімічних властивостей амінокислоти є, наприклад, гідрофобія чи заряд. Фахівцю в даній галузі техніки відомо, яка амінокислотна заміна є консервативним або напівконсервативним заміщенням. Більш того, загальні знання дозволяють фахівцю в даній галузі техніки розпізнавати, ідентифікувати та виявляти, які амінокислотні делеції та приєднання нешкідливі для функціональності стійкого білка, і в яких позиціях вони можливі. Фахівцеві в даній галузі техніки відомо, що у разі справжнього білка NBS-LRR для модифікацій амінокислотної послідовності (заміщення, делеції, вставки або приєднання однієї або декількох амінокислот) функціональність, зокрема, консервативних

доменів має бути збережена, і що таким чином у цих доменах можливі лише обмежені попередні модифікації.

Отже, винахід включає функціональний фрагмент нуклеотидної послідовності за даним винаходом. Отже, термін "фрагмент" включає гени з нуклеотидною послідовністю, досить подібною до вищезгаданої нуклеотидної послідовності. Термін "досить подібний" означає, що перша нуклеотидна послідовність або амінокислотна послідовність має достатню або мінімальну кількість ідентичних або еквівалентних нуклеотидів або амінокислотних груп щодо другої нуклеотидної послідовності або другої амінокислотної послідовності.

Щодо амінокислотної послідовності, то після модифікації, наприклад, за допомогою вищезгаданого способу, вона також має загальний структурний домен і/або має загальну функціональну активність. Нуклеотидні послідовності або амінокислотні послідовності, які мають щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % або щонайменше 100 % ідентичність з нуклеотидною послідовністю або амінокислотною послідовністю за даним винаходом, визначені тут як досить подібні. Сюди також явно входить діапазон від 90 % до 100 %. Для функціональних фрагментів достатня подібність встановлюється в тому разі, коли нуклеотидна послідовність або амінокислотна послідовність в цілому має таку ж властивість, що і раніше названа нуклеотидна послідовність або амінокислотна послідовність за даним винаходом. Ті нуклеотидні послідовності, які кодують похідне або код для похідної амінокислотної послідовності, генеруються прямо або опосередковано (наприклад, за допомогою стадій ампліфікації або реплікації) з вихідної нуклеотидної послідовності, яка відповідає нуклеотидній послідовності за даним винаходом по всій довжині або щонайменше частково.

Відповідно, даний винахід включає нуклеотидну послідовність, яка здатна гібридизуватися в суворих умовах з нуклеотидною послідовністю, комплементарної нуклеотидної послідовності за даним винаходом або нуклеотидної послідовності, яка кодує амінокислотну послідовність за даним винаходом, і при цьому зазначена нуклеотидна послідовність, переважно присутня і/або що експресує в рослині, здатна надавати стійкість до патогену роду *Heterodera*.

Крім того, загальновідомо, що генетичний код є надлишковим, тим самим демонструючи безліч комбінацій кодонів із трьох пар основ, що визначають амінокислоту. Отже, даний винахід включає варіантну послідовність ДНК внаслідок виродженості генетичного коду, яка, тим не менш, як і раніше переважно, якщо присутня і/або експресується в рослині, здатна надавати стійкість до патогену роду *Heterodera*.

В одному варіанті здійснення даного винаходу молекула (молекули) нуклеїнової кислоти за даним винаходом окремо або в комбінації надає (надають) стійкість до патогену роду *Heterodera*, переважно якщо присутні і/або експресуються в рослині, більш переважно, якщо стійкість до патогену роду *Heterodera* є стійкістю до *Heterodera schachtii* і/або рослина є рослиною підвиду *Beta vulgaris subsp. vulgaris*.

Описані комбінації молекул нуклеїнових кислот за даним винаходом або локусу стійкості за даним винаходом відрізняються тим, що, переважно коли вони присутні в рослині і/або при експресії в рослині, вони надають домінуючий ефект стійкості до патогену роду *Heterodera*, переважно *Heterodera schachtii*, або що вони кодують поліпептиди, які здатні надавати домінуючий ефект стійкості до патогену роду *Heterodera*, переважно до *Heterodera schachtii*.

Відповідно, в одному варіанті здійснення даного винаходу комбінація щонайменше двох або трьох молекул нуклеїнових кислот надає стійкість до патогену роду *Heterodera*, зокрема *Heterodera schachtii*, переважно коли вона присутня і/або експресується в рослині, переважно в рослині підвиду *Beta vulgaris subsp. vulgaris*, при цьому щонайменше дві або три молекули нуклеїнової кислоти обрані з групи, що складається з:

(а) молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність за даним винаходом, яка включає послідовність ДНК, зазначену в SEQ ID № 1, послідовність κДНК, зазначену в SEQ ID № 2, яка гібридизується з комплементарною послідовністю нуклеотидної послідовності відповідно до SEQ ID № 1 або 2, яка кодує поліпептид, що має амінокислотну послідовність, зазначену в SEQ ID № 3, і/або яка є одним з вищезгаданих алелей, похідних або варіантів нуклеїнової та амінокислотної послідовності;

(б) молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність за даним винаходом, яка включає послідовність ДНК, зазначену в SEQ ID № 4, послідовність κДНК, зазначену в SEQ ID № 5, яка гібридизується з комплементарною послідовністю нуклеотидної послідовності відповідно до SEQ ID № 4 або 5, яка кодує поліпептид, що має амінокислотну

послідовність, зазначену в SEQ ID № 6, і/або яка є одним з вищезгаданих алелей, похідних або варіантів нуклеїнової та амінокислотної послідовності;

(с) молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність за даним винаходом, яка включає послідовність ДНК, зазначену в SEQ ID № 7, послідовність кДНК, зазначену в SEQ ID № 8, яка гібридизується з комплементарною послідовністю нуклеотидної послідовності відповідно до SEQ ID № 7 або 8, яка кодує поліпептид, що має амінокислотну послідовність, зазначену в SEQ ID № 9, і/або яка є одним з вищезгаданих алелей, похідних або варіантів нуклеїнової та амінокислотної послідовності.

У конкретному варіанті здійснення даного винаходу комбінація двох молекул нуклеїнових кислот, описаних у пп. (а) і (b), надає стійкість до *Heterodera*, зокрема *Heterodera schachtii*, якщо присутній в рослині, переважно в рослині виду *Beta vulgaris*.

В іншому конкретному варіанті здійснення даного винаходу комбінація двох молекул нуклеїнових кислот, описаних у пп. (а) і (с), надає стійкість до *Heterodera*, зокрема *Heterodera schachtii*, якщо присутній у рослині, переважно в рослині виду *Beta vulgaris*.

У іншому конкретному варіанті здійснення даного винаходу комбінація двох молекул нуклеїнових кислот, описаних у пп. (b) і (с), надає стійкість до *Heterodera*, зокрема *Heterodera schachtii*, якщо присутній в рослині, переважно в рослині виду *Beta vulgaris*.

Комбінація може являти собою одну або кілька молекул нуклеїнової кислоти. При цьому комбінація також може бути включена в набір. Якщо комбінація включена в набір, нуклеїнові кислоти (а) (b) і/або (с) комбінації, описаної вище, можуть бути частиною однієї молекули нуклеїнової кислоти або можуть бути частиною окремих молекул нуклеїнової кислоти.

В даному контексті поліпептиди/білки, що кодуються комбінацією, визначеною вище, також є частиною винаходу. Комбінація білків може бути включена в набір, який також є частиною винаходу.

Крім того, частиною винаходу є рослина, яка містить комбінацію молекул нуклеїнових кислот, описаних вище. Комбінація може стати частиною рослини трансгенним або ендегеним способом. Крім того, одна або дві з послідовностей можуть стати частиною рослини як трансгени, в той час як інші одна або дві послідовності стають частиною рослин як ендегени.

В іншому варіанті здійснення молекула нуклеїнової кислоти за даним винаходом відрізняється тим, що, переважно якщо вона присутня в рослині або експресується в рослині, вона вже сама по собі додає домінуючий ефект стійкості до патогену роду *Heterodera*, переважно *Heterodera schachtii*, або що вона кодує поліпептид який здатний надавати домінуючий ефект стійкості до патогену роду *Heterodera*.

Отже, в одному варіанті здійснення молекула нуклеїнової кислоти, описана в п. (b) в контексті комбінації молекул нуклеїнових кислот за даним винаходом, надає стійкість до патогену роду *Heterodera*, зокрема *Heterodera schachtii*, переважно якщо присутній і/або експресується в рослині, зокрема в рослині підвиду *Beta vulgaris subsp. vulgaris*.

В іншому варіанті здійснення молекула нуклеїнової кислоти, описана в п. (с) в контексті комбінації молекул нуклеїнових кислот за даним винаходом, надає стійкість до патогену роду *Heterodera*, зокрема *Heterodera schachtii*, переважно якщо присутній і/або експресується в рослині, зокрема в рослині виду *Beta vulgaris*.

В найкращому варіанті здійснення молекули нуклеїнової кислоти, описані в п. (а) в контексті комбінації молекул нуклеїнових кислот за даним винаходом, надають стійкість до патогену роду *Heterodera*, зокрема *Heterodera schachtii*, якщо присутній і/або експресуються в рослині, зокрема в рослині підвиду *Beta vulgaris subsp. vulgaris*.

Як описано вище, до цього часу рослини *Beta vulgaris subsp. vulgaris*, стійкі до *Heterodera*, не могли бути отримані без введення часто небажаних ознак, таких як, наприклад, зниження врожайності через спадкування додаткових генів, пов'язаних із позитивною ознакою стійкості до *Heterodera*. Отже, недолік сортів, що володіють описаною стійкістю, полягає у великій трудомісткості та складності розробки сорту внаслідок складної спадковості, і у таких сортів помітно нижчі показники врожайності порівняно із звичайними сортами за відсутності зараження. Крім іншого, це може бути пов'язане з епігенетичною взаємодією деяких генів стійкості з генами, що відповідають за вироблення цукру, що призводить до зниження пристосованості рослин за відсутності патогену.

Крім того, для стійкої селекції проти бурякової цистоутворюючої нематоди, тобто для протидії небезпеці варіантів *Heterodera schachtii*, що долають стійкість, необхідно постійно виявляти нові гени стійкості та інтегрувати їх у генні пули культурних рослин, таких як цукрові буряки.

У цьому контексті автори винаходу вперше виділили та ідентифікували новий ген стійкості до *Heterodera*, який може бути використаний для спрощеної селекції. Завдяки

цілеспрямованому та спрощеному включенню цього гена в елітні лінії, зараз стало можливим дуже швидко виведення дуже високоврожайних сортів з високою стійкістю до *Heterodera* та забезпечення додаткового гена стійкості, який може бути використаний для боротьби з варіантами *Heterodera*, що подолали традиційну стійкість. Можливі зразки для інтрогресії однієї або декількох послідовностей, що надають стійкість за даним винаходом, можуть бути отримані, наприклад, шляхом скринінгу популяцій *B. vulgaris* subsp. *maritima*. Скринінг може ґрунтуватися на ідентифікації рослини, що містить одну або кілька послідовностей, що надають стійкості за даним винаходом. Ідентифікація може відбуватися так, як описано в інших розділах даного документа. Переважно скринінг або ідентифікація включають використання молекулярних маркерів для діагностики локусу стійкості. Крім того, рослини, що містять послідовності, що надають стійкості, можуть бути придбані у компанії CPO Wageningen, Postbus 18, 6700 AA Wageningen/Нідерланди, наприклад, зразка BMH.

Відповідно, в рамках даного винаходу вперше представлена рослина *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* як рослина цукрових буряків, рослина листового буряка, рослина червоного буряка або підсвекольника, рослина кормового буряка, що володіє стійкістю за даним винаходом до патогену роду *Heterodera*, зокрема *Heterodera schachtii*, і, таким чином, охоплюване цим винаходом. Оскільки всі перелічені рослини є культивованими рослинами, культурами або рослинами, придатними для сільськогосподарського вирощування, і мають стійкість за даним винаходом, вони є частиною винаходу. Зокрема, частиною винаходу є такі культури, які містять підземний запасуючий орган, що придатний для використання в як їжі, сировини або промислового джерела цукрів або іншої хімічної сполуки, і які містять стійкість за даним винаходом, і є додатковим аспектом даного винаходу. Запасуючим органом може бути, наприклад, бурякове тіло цукрових буряків, що містить сахарозу, споживане бурякове тіло червоного буряка або кормове бурякове тіло кормового буряка. Підземний запасуючий орган може утворювати більше 50 %, а для цукрових буряків – навіть більш 70 % від загальної біомаси дорослої рослини. Крім того, насіння або посівний матеріал цих рослин є частиною винаходу. Насіння або посівний матеріал можуть бути технічно оброблені, як докладно описано нижче.

В даному контексті винахід також включає нуклеїнову кислоту, яка кодує білок відповідно до будь-якого з SEQ ID №№ 3, 6 і 9, при цьому в конкретному варіанті здійснення виключається нуклеїнова кислота, що зустрічається в природі, відповідно до будь-якого з SEQ ID №№ 1, 4 та 7.

Крім того, даний винахід належить до рекомбінантної і/або гетерологічної молекули ДНК, яка містить послідовності молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом. Крім того, дана молекула ДНК має переважно регуляторну послідовність. Отже, вона може бути оперативно пов'язана з цією регуляторною послідовністю або перебувати під впливом цієї регуляторної послідовності. Дана регуляторна послідовність є переважно є промоторною послідовністю і/або іншими послідовностями елементів, що контролюють транскрипцію або трансляцію, наприклад, цис-елементів. Регуляторна послідовність, яка контролює експресію гена, що включає молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом, переважно являє собою послідовність, здатну забезпечувати або модулювати експресію в результаті патогенної інфекції. Цей промотор переважно здатний контролювати експресію послідовності ДНК безпосередньо в корінні рослини. Регуляторна послідовність може бути гетерологічною експресуючою послідовністю. Перевага такого підходу полягає в тому, що фахівець у даній галузі техніки може краще регулювати швидкість експресії послідовності, що підлягає експресії, тканина, в якій відбувається експресія, та момент часу, в який відбувається експресія, оскільки він вибирає ту регуляторну послідовність, яка найкраще підходить для відповідного варіанта використання. Гетерологічна послідовність ДНК переважно включає нуклеотидну послідовність, яка кодує компонент захисту рослин від патогенів (наприклад: гени стійкості (R-гени) або гени, що кодують ферменти, що беруть участь у передачі сигналу, такі як кінази або фосфатази, та для G-білка, або які кодують патогенний ефектор (які називаються генами авірулентності (Avr-генами))). Гетерологічна послідовність ДНК може бути однією з послідовностей ДНК за даним винаходом. Гетерологічна послідовність ДНК може також додатково кодувати додаткові компоненти захисту рослин від патогенів. Отже, гетерологічна послідовність ДНК може бути сконструйована таким чином, щоб після її транскрипції була утворена поліцистрона мРНК.

Крім того, даний винахід належить до поліпептиду, який може бути кодований молекулою нуклеїнової кислоти за даним винаходом та її функціонально і/або імунологічно активним фрагментом, а також до антитіла, яке специфічно зв'язується з поліпептидом або з його фрагментом. Поліпептид особливо переважно має амінокислотну послідовність відповідно до будь-якого SEQ ID №№ 3, 6 або 9. Рекомбінантне отримання білків, поліпептидів та фрагментів

знайоме фахівцю в даній галузі техніки (Sambrook та співавт., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е вид., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спрінг-Харбор, Нью-Йорк, 2001 р., або Wingfield P. T., 2008 р., *Production of Recombinant Proteins*, *Current Protocols in Protein Science*, 52:5.0:5.0.1–5.0.4). Поліклональні або моноклональні антитіла до білка за даним винаходом можуть бути отримані фахівцем у даній галузі техніки відповідно до відомих способів (E. Harlow та співавт., редактор, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988 р.)). Отримання моноклональних антитіл, а також фрагментів Fab та F(ab')₂, які також корисні для способів виявлення білка, може бути виконано за допомогою різних традиційних способів (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, стор. 98-118, Нью-Йорк, Academic Press (1983 р.)). Потім антитіла можуть бути використані для скринінгу бібліотек експресуючих кДНК з метою ідентифікації ідентичних, гомологічних або гетерологічних генів за допомогою імунологічного скринінгу (Sambrook та співавт., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 1989 р., або Ausubel та співавт., 1994 р., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons), або можуть бути використані для вестерн-блотингу. Зокрема, даний винахід належить до антитіл, які вибірково виявляють поліпептид, що кодується алелем, що надає стійкість до *Heterodera* за даним винаходом, і, по суті, не виявляють поліпептид, що кодується відповідним чутливим алелем, тобто вони виявляють у 2 рази, переважно в 5 разів і більш переважно в 10 або більше разів менше поліпептидів, що кодуються відповідним чутливим алелем, ніж поліпептидів, що кодуються алелем, що надають стійкість до *Heterodera* згідно з даним винаходом.

У найкращому варіанті здійснення антитіло за даним винаходом відрізняється тим, що воно є синтетичним поліпептидом, який не зустрічається в природі.

Крім того, антитіла за даним винаходом можуть бути пов'язані з флуоресцентним барвником, щоб їх можна було використовувати, наприклад, в імуногістохімічному методі і викликати забарвлення антитіл. Як флуоресцентний барвник може використовуватися флуорохром. Антитіла за даним винаходом можуть бути присутніми у зв'язку з іншими сигнальними молекулами. Серед них, наприклад, біотин, радіоізотопи, репортерні ферменти, такі як лужна фосфатаза, або олігонуклеотиди.

Додатковим предметом винаходу є вектори або експресійні касети, які включають молекулу нуклеїнової кислоти або молекулу рекомбінантної ДНК за даним винаходом, можливо, під контролем регуляторних елементів і, зокрема, під контролем функціональних регуляторних елементів в рослинах, а також маркерів негативного і/або позитивного відбору. Отже, кістяки вектора гетерологічні молекули нуклеїнової кислоти даного винаходу, що означає, що такий вектор не зустрічається в природі і не може бути виділений з природи. Вектор являє собою плазмід, космід, фаг або вектор експресії, вектор трансформації, човниковий вектор або вектор клонування; він може бути дволанцюговим або одностанцюговим, лінійним або кільцевим; або він може трансформувати прокаріотичний або еукаріотичний організм шляхом інтеграції до його геному або позахромосомно. Молекула нуклеїнової кислоти або молекула ДНК за даним винаходом в експресійному векторі або експресійній касеті переважно функціонально пов'язана з однією або декількома регуляторними послідовностями, які забезпечують транскрипцію та необов'язково експресію в прокаріотичній або еукаріотичній клітині; (Sambrook та співавт., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е вид., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спрінг-Харбор, Нью-Йорк, 2001 р.). Ці регуляторні послідовності переважно є промоторами або термінаторами, зокрема початковою точкою ініціації транскрипції, місцем зв'язування з рибосомою, сигналом обробки РНК, місцем завершення транскрипції і/або сигналом поліаденілювання. Наприклад, молекула нуклеїнової кислоти знаходиться тут під контролем придатного промотору і/або термінатору. Придатними промоторами можуть бути конститутивні промотори (приклад: промотор 35S з "Cauliflower mosaic virus" (Odell та співавт., *Nature*, 313 (1985 р.), стор. 810-812); особливо придатними є ті промотори, які є патогенно індукованими (приклад: промотор PR1 з петрушки (Rushton та співавт., *EMBO J.*, 15 (1996 р.), 5,690-5,700)). Особливо підходящими патогенно-індукованими промоторами є синтетичні або химерні промотори, які не зустрічаються в природі, складаються з безлічі елементів і містять мінімальний промотор, і мають щонайменше один цис-регуляторний елемент проти ходу транскрипції від мінімального промотору, при цьому щонайменше один цис-регуляторний елемент є місцем зв'язування для спеціальних факторів транскрипції. Химерні промотори розробляються відповідно до бажаних вимог та індукуються або пригнічуються різними факторами. Приклади таких промоторів можна знайти в WO 00/29592, WO 2007/147395 і WO 2013/091612. Наприклад, придатним термінатором є термінатор нопалін-синтази (Depicker і співавт., *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (1982 р.), стор. 561-573). Придатними промоторами та термінаторами також можуть бути нативний промотор та нативний термінатор. Вектори або експресійні касети додатково містять звичайні індикаторні/репортерні

гени або гени стійкості для виявлення перенесення бажаного вектора або молекули ДНК/молекули нуклеїнової кислоти та для відбору особин, які їх містять, оскільки пряме виявлення за допомогою експресії гена здебільшого досить важко. Оскільки молекула нуклеїнової кислоти за даним винаходом сама кодує поліпептид, який надає стійкість до

бурякової цистообразующей нематоди, забезпечення наявності додаткового гена стійкості для експресії в рослинних клітинах не обов'язково, але рекомендується з метою швидкої селекції. Прикладами індикаторних/репортерних генів є, наприклад, ген люциферази і ген, що кодує зелений флуоресцентний білок (GFP). Крім того, вони також дозволяють проводити тести на активність і/або регуляцію промотора гена. Прикладами генів стійкості, особливо для трансформацій рослин, є ген неоміцинфосфотрансферази, ген гігromіцинфосфотрансферази або ген, що кодує фосфінотрицинацетилтрансферазу. Додатковими маркерами позитивного відбору можуть бути ферменти, які забезпечують трансформованій рослині селекційну перевагу перед нетрансформованою рослиною, зокрема перевагу в живленні, наприклад, манноза-6-фосфатизомераза або ксилізоізомераза. Однак це не виключає додаткові індикаторні/репортерні гени або гени стійкості, відомі фахівцю в даній галузі техніки. У найкращому варіанті здійснення вектор являє собою рослинний вектор. Крім того, експресійна касета може бути у вигляді експресійної касети, інтегрованої в геном рослини.

В іншому аспекті даний винахід належить до клітин, які включають вектори, молекули рекомбінантної ДНК і/або молекули нуклеїнових кислот за даним винаходом. Клітина в сенсі винаходу може бути прокаріотичної (наприклад, бактеріальної) або еукаріотичної клітиною (наприклад, рослинної клітиною або дріжджової клітиною). Клітина переважно являє собою агробактерію, таку як *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes*, клітину *Escherichia coli* або клітину рослини; клітина рослини особливо переважно являє собою клітину рослини роду *Beta*, виду *Beta vulgaris* або підвиду *Beta vulgaris subsp. vulgaris*. Клітина також може бути у вигляді культури. Отже, винахід охоплює також культуру клітин, яка містить такі клітини. Культура клітин переважно являє собою чисту культуру або ізолят, який не містить клітини іншого типу.

Фахівцю в даній галузі техніки відомі не тільки численні способи, наприклад, кон'югація або електропорація, за допомогою яких він може вводити молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом, молекулу рекомбінантної ДНК і/або вектор або експресійну касету за даним винаходом в агробактерію, так і різноманітні способи трансформації (біологічна трансформація, трансформація, опосередкована агробактеріями), за допомогою яких він може вводити молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом, молекулу ДНК і/або вектор даного винаходу в рослинну клітину (Sambrook та співавт., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е вид., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спрінг-Харбор, Нью-Йорк, 2001 р.)

Крім того, даний винахід переважно належить до рослини, стійкої до *Heterodera*, переважно до рослини виду *Beta vulgaris subsp. vulgaris* або його частини, що містить молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом, що надає стійкості до *Heterodera*. Рослина, стійка до *Heterodera*, може містити молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом як трансген або як ендеген. В рамках винаходу вперше були отримані рослини підвиду *Beta vulgaris subsp. vulgaris*, які містять молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом. Даний винахід також включає рослини підвиду *Beta vulgaris subsp. vulgaris*, які містять молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом як ендеген.

Таким чином, частина може бути клітиною, тканиною, органом або комбінацією декількох клітин, тканин або органів. Прикладом комбінації кількох органів є квітка чи насіння. Рослина, стійка до *Heterodera*, за даним винаходом переважно демонструє сильнішу стійкість до *Heterodera*, зокрема, *Heterodera schachtii*, ніж відповідна рослина, яка не містить молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом (контрольна рослина). В ідеалі контрольна рослина має генотип, ідентичний генотипу рослини за даним винаходом, і вирощено в ідентичних умовах, але не містить молекули нуклеїнової кислоти, що надає стійкості. Рівень стійкості, наприклад, до патогену роду *Heterodera*, зокрема *Heterodera schachtii*, може бути якісно визначений у рослин роду *Beta* шляхом визначення оціночних балів (див., наприклад, Приклад 1). Більш висока стійкість проявляється в поліпшенні стійкості щонайменше на один оціночний бал, щонайменше на два оціночних бали і переважно щонайменше на три або більше оціночних балів.

Рослинна клітина або рослина, або його частина за даним винаходом, які містять молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом, зокрема, рослина роду *Beta*, переважно виявляє більш високу стійкість до патогену роду *Heterodera*, зокрема, до *Heterodera schachtii*, ніж відповідна рослинна клітина або рослина, або її частина, які не містять молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом, або можуть містити чутливий алельний варіант молекули

нуклеїнової кислоти. Рівень стійкості до патогену роду *Heterodera*, наприклад, *Heterodera schachtii*, може бути якісно визначений у рослин роду *Beta* шляхом визначення оцінних балів. Більш висока стійкість проявляється в поліпшенні стійкості щонайменше на один оцінний бал, щонайменше на два оцінних бали і переважно щонайменше на три або більше оцінних балів.

У разі трансгенної рослинної клітини, або рослини, або її частини, вони містять молекулу нуклеїнової кислоти або молекулу ДНК за даним винаходом у вигляді трансгену або вектора або експресійної касети за даним винаходом. Такою трансгенною рослинною клітиною або рослиною, або її частиною є, наприклад, рослинна клітина, рослина або її частина, трансформовані переважно стабільно молекулою нуклеїнової кислоти, молекулою ДНК за даним винаходом або вектором, або експресійною касетою за даним винаходом. У найкращому варіанті здійснення молекула нуклеїнової кислоти функціонально пов'язана з однією або декількома регуляторними послідовностями, які забезпечують транскрипцію і необов'язково експресію в рослинній клітині. Загальна структура, що складається з молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом і регуляторної (регуляторних) послідовностей (послідовностей), потім являє собою трансген. Такими регуляторними послідовностями є, наприклад, промотор або термінатор. Фахівцю в даній галузі техніки відомі численні функціональні промотори та термінатори, які застосовуються в рослинах.

Винахід також включає вакуоль клітини за даним винаходом та речовини вмісту, що в ній запасуються (такі як сахароза).

Крім того, винахід також належить до клітинного екстракту з клітини, переважно, з рослинної клітини, дуже переважно з клітини *Beta vulgaris* і, особливо переважно, з клітини однієї з наступних культур: цукрового буряка, листового буряка або підсвекольника. Жодна рослина не може бути регенерована з клітинного екстракту. Аналогічним чином, винахід охоплює геном рослини, що містить нуклеїнову кислоту за даним винаходом. Жодна рослина не може бути регенерована з геному рослини як такої.

Отже, концентрація цукру або сахарози в клітинному екстракті може бути збільшена в порівнянні з клітиною, яка не є клітиною за даним винаходом, але належить до того ж виду або культури. Це відноситься, зокрема, до умов зараження патогеном роду *Heterodera*.

Винахід також охоплює використання клітинного екстракту для виробництва цукру (цукрози) або для виробництва (сирого) соку, переважно бурякового (сирого) соку.

Аналогічним чином, винахід охоплює цукор, зокрема сахарозу, що міститься в клітинах за даним винаходом та їхніх вакуолях.

Додатковим аспектом винаходу є насіннєвий матеріал, що містить насіння, яке містить молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом. Молекула нуклеїнової кислоти за даним винаходом може бути присутньою трансгенно або ендегенно. Насіннєвий матеріал та насіння можуть бути технічно оброблені. Отже, винахід також включає технічно оброблений насіннєвий матеріал і технічно оброблене насіння. Різні варіанти здійснення технічно обробленого насіннєвого матеріалу докладно пояснюються нижче, при цьому термін насіннєвий матеріал також включає насіння: технічно оброблений насіннєвий матеріал може бути присутнім у шліфованому вигляді. Отже, видаляється найзовнішній шар насіння, щоб насіння набувало більш округлу форму. Це корисно при сівбі: оптимально рівномірна форма призводить до рівномірного розподілу зерен насіннєвого матеріалу. Крім того, технічно оброблений насіннєвий матеріал включає дражований насіннєвий матеріал. Таким чином, насіннєвий матеріал поміщають в масу для дражування, яка захищає насіннєвий матеріал, що міститься в ній, і призводить до збільшення маси таким чином, щоб дражований насіннєвий матеріал демонстрував більшу опірність вітровому зносу і, таким чином, був менш схильний до здування вітром, і, в той час, було забезпечено більш точне позиціонування під час сівби. В найкращому варіанті здійснення винаходу всі зерна дражованого насіннєвого матеріалу з партії або одиниці, призначеної для продажу, мають суттєво однакову форму та однакову масу. Можливі відхилення в діаметрі та масі на 5 %. Однак відхилення переважно не перевищують 1 %. Маса для дражування як одного з основних компонентів може містити, наприклад, мінеральну сполуку, таку як, наприклад, глина і/або торф. Додаткові можливі компоненти вказані в US 4,067,141. Крім того, маса для дражування може містити додаткові хімічні речовини, які позитивно впливають на культивування на практиці. В даному разі це можуть бути речовини, які належать до числа добривальних речовин. Крім того, це можуть бути фунгіциди, інсектициди і/або антифідантні речовини. Фунгіциди можуть бути представлені тирамом і/або гімексазолом і/або іншими фунгіцидами. Інсектицид може бути речовиною з групи неонікотиніодів. Речовина з групи неонікотиніодів переважно є імідаклоприд (код АТС: QP53AX17) і/або клотіанідин (номер

CAS 210880-92-5). Крім того, інсектицид також може являти собою цифлутрин (номер CAS 68359-37-5) або бета-цифлутрин.

Дражований насіннєвий матеріал є конкретним варіантом протруєного насіннєвого матеріалу. У цьому контексті технічно оброблений насіннєвий матеріал також включає протруєний насіннєвий матеріал. Однак винахід не обмежується дражованим насіннєвим матеріалом, а, швидше, може відноситися до будь-якої форми протруєного насіннєвого матеріалу. Отже, винахід належить до протруєного насіннєвого матеріалу, який включає дражований насіннєвий матеріал, але не обмежується ним. Таким чином, також включаються сухе протруювання, вологе протруювання та суспензійне протруювання. Таким чином, протруювання також може містити щонайменше один барвник, щоб протруєний насіннєвий матеріал можна було швидко відрізнити від непротруєного насіннєвого матеріалу, і, крім того, була забезпечена добра видимість в довкіллі після посіву. Протруювання також може містити агрохімікати, які описані в контексті маси для дражування. Отже, винахід включає такий протруєний насіннєвий матеріал, при якому протруювання містить щонайменше один антифідантний засіб, такий як інсектицид і/або щонайменше один фунгіцид. Необов'язково може бути застосоване так зване електронне протруювання (протруювання з використанням електричної енергії). Однак електронне протруювання не є протруюванням у строгому сенсі цього слова.

Додатковою формою технічно обробленого насіннєвого матеріалу є інкрустований насіннєвий матеріал. У даному контексті також йдеться про те, що називається покриттям, а також про насіннєвий матеріал, оброблений покриттям. Відмінність від дражованого насіннєвого матеріалу полягає в тому, що насіннєві зерна зберігають свою первісну форму, при цьому даний спосіб особливо економічний. Спосіб описаний, наприклад, в EP 0334258 A1. Додатковою формою технічно обробленого насіннєвого матеріалу є пророщений або праймірований насіннєвий матеріал. Пророщений насіннєвий матеріал попередньо обробляють за допомогою попереднього пророщування, а праймірований насіннєвий матеріал попередньо обробляють за допомогою праймінгу ("пророщування"). Перевага попереднього пророщеного та праймірованого насіннєвого матеріалу полягає у більш короткому часі появи сходів. У той же час, момент часу появи сходів після посіву більш сильно синхронізований. Це дозволяє покращити агротехнічну обробку під час вирощування та особливо під час збирання врожаю, та, крім того, збільшує кількість врожаю. При попередньому пророщуванні насіннєвий матеріал пророщують доти, поки корінець не вийде з оболонки насіннєвого матеріалу, і згодом процес зупиняють. При праймінгу процес зупиняється до виходу корінця з оболонки насіннєвого матеріалу. Порівняно з попередньо пророщеним насіннєвим матеріалом насіннєвий матеріал, підданий праймінгу, нечутливий до навантажень, пов'язаних з повторним сушінням, і після такого повторного сушіння має більш тривалий термін зберігання порівняно з попередньо пророщеним насіннєвим матеріалом, для якого повторне сушіння зазвичай не рекомендується. У даному контексті технічно попередньо оброблений насіннєвий матеріал також включає праймірований і повторно висушений насіннєвий матеріал. Процес попереднього пророщування описаний в US 4 905 411 A. Різні варіанти здійснення праймінгу описані в EP 0 686 340 A1. На додаток до цього, також можливо дражування насіннєвого матеріалу одночасно з праймінгом в одному процесі. Цей спосіб описаний в EP 2002702 B1. Даний винахід охоплює праймірований насіннєвий матеріал, який, крім того, дражований.

Технічно оброблений насіннєвий матеріал може бути додатково забезпечений одним або декількома з описаних вище засобів захисту від гербіцидів. Це дозволяє додатково покращити агротехнічну культивування, оскільки технічно оброблений насіннєвий матеріал може бути розміщений на полі, яке раніше було оброблено гербіцидом і, відповідно, не містить бур'яни.

На додаток до цього, винахід також охоплює суміш, що містить насіннєвий матеріал за даним винаходом або насіння за даним винаходом, масу для протруювання, як визначено вище. Отже, маса для протруювання переважно здійснена у вигляді маси для дражування, як визначено вище.

При зберіганні насіннєвого матеріалу за даним винаходом переважно вибирати умови зберігання, які не впливають негативно на стабільність або термін зберігання насіннєвого матеріалу. В даному разі коливання вологості, зокрема, можуть мати несприятливий вплив. Частиною винаходу є спосіб зберігання насіннєвого матеріалу в контейнері, який є одночасно водновідштовхуючим і повітропроникним. Такий контейнер може бути виконаний як коробка. Така коробка необов'язково може мати внутрішню пароізоляцію. Якщо коробка виконана у вигляді двохшарової коробки, її стабільність збільшується. Насіннєвий матеріал за даним винаходом, який включає такий контейнер і таку коробку, або технічно оброблений насіннєвий матеріал за даним винаходом також є частиною винаходу. Аналогічним чином, частиною

винаходу є зберігання насіннєвого матеріалу за даним винаходом або технічно обробленого насіннєвого матеріалу за даним винаходом в такій коробці.

В одному варіанті здійснення рослина за даним винаходом є гібридною рослиною або подвійною гаплоїдною рослиною. Гібридні рослини та подвійні гаплоїдні рослини не зустрічаються в природі і не можуть бути виділені із природи. У додатковому варіанті здійснення рослини за даним винаходом молекула нуклеїнової кислоти за даним винаходом присутня у гетерозиготній або гомозиготній формі. У разі гібридної рослини молекула нуклеїнової кислоти також може бути присутня в гемізиготній формі. Винахід також охоплює гібридне насіння і подвійне гаплоїдне насіння, яке містить нуклеїнову кислоту за даним винаходом або поліпептид за даним винаходом.

Додатковий варіант здійснення даного винаходу включає рослину, переважно виду *Beta vulgaris*, яке відрізняється тим, що стійкість до патогену роду *Heterodera* у цієї рослини додатково підвищена. Наприклад, це може бути реалізовано за допомогою "пірамідкування генів", тобто стійкість збільшується з використанням цього ефекту дози. Для цієї мети рослини за даним винаходом, що містять алель, що надає стійкість до *Heterodera*, піддаються надтрансформації за допомогою цього алелі стійкості, щоб збільшити кількість транскрипції гена в рослині. Альтернативний підхід включає редагування гена/сайт-спрямований мутагенез або опосередковану методикою TILLING модифікацію нативного промотору алелі, що надає стійкість, з метою збільшення швидкості його експресії, або модифікацію самого алелі гена LRR, що надає стійкість, з метою підвищення його активності або стабільності. Такий спосіб підвищення активності за допомогою модифікації гена стійкості описаний, наприклад, в WO 2006/128444 A2 і може бути здійснений за допомогою методик, відомих фахівцю в даній галузі техніки. Додатковий підхід може включати злиття молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом з гетерологічним промотором, який виявляє більш високу активність порівняно з нативним промотором, зокрема, при інфікуванні *Heterodera*.

В іншому варіанті здійснення рослина за даним винаходом додатково, трансгенно або ендегенно, містить другу молекулу нуклеїнової кислоти в іншій позиції в геномі, яка кодує поліпептид, здатний надавати стійкість до *Heterodera* в рослині, в якій експресується поліпептид. Наприклад, один або кілька генів стійкості або локусів стійкості, які описані в попередньому рівні техніки, можуть, в тій мірі, як вони ще не присутні у вихідному генотипі, бути введені в дану рослину за допомогою схрещування, трансформації, репарації, що спрямовується гомологією, або гомологічної рекомбінації у рослині. До них відноситься, наприклад, ген *Hs1pro-1 B. procumbens* (Cai та співавт., Science, 275 (1997 p.), стор. 832-834).

Підвищення стійкості може відбуватися за допомогою інтеграції молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом в геном щонайменше однієї клітини рослини виду *Beta vulgaris*, а також можливої регенерації рослини з рослинної клітини. Інтеграція може відбуватися як шляхом статевого схрещування, наприклад, з одним із вищезгаданих підвидів *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, та наступної селекції, або за допомогою репарації, що спрямовується гомологією, або гомологічної рекомбінації. Два останні згадані способи переважно підтримуються сайт-спрямованими нуклеазами, які можуть бути обрані з наступних нуклеаз без обмеження ними: нуклеаза CRISPR, включаючи нуклеазу Cas9, CasX, CasY або Cpf1, нуклеаза TALE, цинк-пальцева нуклеаза, мегануклеаза, нуклеаза Аргонаута, ендонуклеаза рестрикції, включаючи FokI або її варіант, рекомбіназа, або дві сайт-специфічні нікуючі ендонуклеази.

Альтернативний підхід включає збільшення експресії молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом в рослині. Це може відбуватися за допомогою модифікації нативного промотора, причому модифікація переважно відбувається за допомогою редагування гена або сайт-спрямованого мутагенезу, який опосередковується сайт-спрямованими нуклеазами, і, необов'язково, моделями репарації. Приклади таких нуклеаз вже наводилися вище. Збільшення експресії молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом може також відбуватися за допомогою злиття молекули нуклеїнової кислоти з гетерологічним промотором, який виявляє більш високу активність порівняно з нативним промотором, зокрема після інфікування *Heterodera*. Злиття також може відбуватися за допомогою сайт-спрямованої нуклеази та моделей репарації, а також за допомогою прямої вставки після дволанцюгового розриву.

Як уже згадувалося вище, спосіб посилення стійкості до *Heterodera* також може призвести до збільшення активності і/або стабільності поліпептиду за даним винаходом за допомогою модифікації нуклеотидної послідовності молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом. Такий спосіб підвищення активності за допомогою модифікації гена стійкості описаний, наприклад, в WO 2006/128444 A2 і може бути здійснений за допомогою методик, відомих фахівцю в даній галузі техніки. Цей підхід докладно пояснюється нижче.

Використовуваний тут термін "сайт-спрямована нуклеаза" (SDN) позначає фермент, здатний індукувати розрив дволанцюгової ДНК у конкретній нуклеотидній послідовності, яка називається "сайтом розпізнавання". Наприклад, SDN може бути обрана з групи, що складається з мегануклеази, ефекторної нуклеази TAL, цинк-пальцевої нуклеази, систем CRISPR, таких як CRISPR/Cas9, CRISPR/Cpf1, CRISPR/CasX або CRISPR/CasY. Ендонуклеази за методом RARE-розщеплення є SDN, які мають сайт розпізнавання переважно приблизно з 14 – 70 послідовних нуклеотидів і, отже, мають дуже низьку частоту розщеплення навіть в більших великих геномах, таких як більшість геномів рослин. Хомінг-ендонуклеази, також звані мегануклеазами, є сімейством таких ендонуклеаз за методом RARE-розщеплення. Вони можуть кодуватися інтронами, незалежними генами або проміжними послідовностями і мати чудові структурні та функціональні властивості, які відрізняють їх від більш класичних ферментів рестрикції, зазвичай з бактеріальних систем рестрикції-модифікації типу II. Їхні сайти розпізнавання мають загальну асиметрію, яка контрастує з характерною діадною симетрією більшості сайтів розпізнавання ферментів рестрикції. Було показано, що кілька хомінг-ендонуклеаз, що кодуються інтронами або інтеїнами, сприяють хомінгу їхніх відповідних генетичних елементів в алельні безінтронні або безінтеїнові сайти. Утворюючи сайт-специфічний дволанцюговий розрив у безінтронних або безінтеїнових алелях, ці нуклеази створюють рекомбіногенні кінці, які беруть участь у процесі перетворення гена, що дублює послідовність, що кодує, і що призводить до вставки інтрону або проміжної послідовності на рівні ДНК. Перелік інших мегануклеаз за методом RARE-розщеплення та їхніх відповідних сайтів розпізнавання наведено в таблиці I у WO 03/004659 (стор. 17-20) (включено до цього документа за допомогою посилання).

Крім того, існують способи створення спеціально підібраних ендонуклеаз за методом RARE-розщеплення, які розпізнають практично будь-яку обрану цільову нуклеотидну послідовність. Коротко, химерні ферменти рестрикції можуть бути отримані з використанням гібридів між цинк-пальцевим доменом, призначеним для розпізнавання специфічної нуклеотидної послідовності, та неспецифічним доменом розщеплення ДНК із природного ферменту рестрикції, такого як FokI. Такі способи описані, наприклад, в WO 03/080809, WO 94/18313 або WO 95/09233 і в Isalan і співавт., 2001 р., *Nature Biotechnology*, 19, стор. 656-660; Liu та співавт., 1997 р., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5525-5530).

Інший приклад спеціально розроблених ендонуклеаз включає так звані нуклеази TALE (TALEN), які засновані на ефекторах, подібних активаторам транскрипції (TALE) з бактеріального роду *Xanthomonas*, злитих з каталітичним доменом нуклеази (наприклад, FokI або її варіанту). Специфічність зв'язування ДНК цих TALE визначається варіабельними здвоєними залишками повтору (RVD) тандемно розташованих одиниць повтору 34/35 амінокислот таким чином, що один RVD специфічно розпізнає один нуклеотид у цільовій ДНК. Одиниці повтору можуть бути зібрані для розпізнавання практично будь-яких цільових послідовностей і злиті з каталітичним доменом нуклеази, утворюючи ендонуклеази, специфічні для послідовності (див., наприклад, Boch і співавт., 2009 р., *Science*, 326: стор. 1509-1512; Moscou і Bogdanove, 2009 р., *Science*, 326: стор. 1501; та WO 2010/079430, WO 2011/072246, WO 2011/154393, WO 2011/146121, WO 2012/001527, WO 2012/093833, WO 2012/104729, WO 2012/138927, WO 2012/138939). У WO2012/138927 далі описані мономерні (компактні) TALEN та TALEN з різними каталітичними доменами та їх комбінаціями.

Нещодавно був описаний новий тип адаптованої ендонуклеазної системи - так званої системи CRISPR / Cas. Система CRISPR у її природному середовищі описує молекулярний комплекс, що містить щонайменше одну невелику та індивідуальну некодуючу РНК у комбінації з нуклеазою Cas або іншою нуклеазою CRISPR, такою як нуклеаза Cpf1 (Zetsche та співавт., Cpf1 Is a Single RNA-Guides Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System, *Cell*, 163, стор. 1-13, жовтень 2015 р.), яка може утворити специфічний дволанцюговий розрив ДНК. В даний час системи CRISPR поділяються на два класи, що включають п'ять типів систем CRISPR, систему типу II, наприклад, що використовує Cas9 як ефектор, і систему типу V, що використовує Cpf1 як ефекторну молекулу (Макарова і співавт., *Nature Rev. Microbiol.*, 2015 р.). У штучних системах CRISPR синтетичну некодуючу РНК і нуклеазу CRISPR і/або необов'язково модифіковану нуклеазу CRISPR, модифіковану для дії як нікази або позбавлену будь-якої функції нуклеази, можна використовувати в комбінації щонайменше з однією синтетичною або штучною гідовою РНК або гРНК, РНК, що поєднує функцію кРНК і/або тракрРНК (Макарова та співавт., 2015 р., див. вище). Імунна відповідь, опосередкована CRISPR/Cas у природних системах, вимагає CRISPR-РНК (кРНК), причому дозрівання цієї гідової РНК, яка контролює специфічну активацію нуклеази CRISPR, значно різниться між різними системами CRISPR, охарактеризованими дотепер. По-перше, інвазивна ДНК, також звана спейсером, інтегрується

між двома сусідніми ділянками повтору на проксимальному кінці локусу CRISPR. Системи CRISPR типу II кодують нуклеазу Cas9 як ключовий фермент стадії інтерференції; дана система містить як крPHK, так і транскрибуючу PHK (тракрPHK) як спрямовуючий мотив. Вони гібридизуються і утворюють дволанцюгові (ds) ділянки PHK, які розпізнаються RNaseIII і можуть бути розщеплені для утворення зрілих крPHK. Потім вони, в свою чергу, зв'язуються з молекулою Cas з метою спрямування нуклеази специфічно в ділянку цільової нуклеїнової кислоти. Рекомбінантні молекули гPHK можуть містити як ділянку розпізнавання варіабельної ДНК, так і ділянку взаємодії Cas і таким чином можуть бути специфічно сконструйовані незалежно від конкретної цільової нуклеїнової кислоти та бажаної нуклеази Cas. Як додатковий механізм безпеки в ділянці цільової нуклеїнової кислоти повинні бути присутніми PAM (мотиви, що примикають до протоспейсера); це послідовності ДНК, які впливають безпосередньо з ДНК, розпізнаної комплексом Cas9/PHK. Послідовності PAM для Cas9 зі *Streptococcus pyogenes* описані як "NGG" або "NAG" (стандартний код нуклеотидів за номенклатурою IUPAC) (Jinek та співавт., A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, Science, 2012 р. 337: стор. 816-821). Послідовністю PAM для Cas9 з *Staphylococcus aureus* є "NNGRRT" або "NNGRR(N)". Відомі додаткові варіанти систем CRISPR/Cas9. Отже, Cas9 *Neisseria meningitidis* розщеплюється в послідовності PAM NNNNGATT. Cas9 *Streptococcus thermophilus* розщеплюється в послідовності PAM NNAGAAW. Нещодавно був описаний додатковий мотив PAM NNNNRYAC для системи CRISPR *Campylobacter* (WO 2016/021973 A1). Для нуклеаз Cpf1 було описано, що комплекс Cpf1-крPHK без тракрPHK ефективно розпізнає і розщеплює цільову ДНК, за якою слідує короткий Т-багатий PAM, на відміну від зазвичай G-багатих PAM, що розпізнаються системами Cas9 (Zetsche і співавт., див. вище). Крім того, за допомогою модифікованих поліпептидів CRISPR можна отримати специфічні одноланцюгові розриви. Комбіноване використання ніказу Cas з різними рекомбінантними гPHK також може індукувати високоспецифічні дволанцюгові розриви ДНК за допомогою подвійного нікування ДНК. Крім того, при використанні двох гPHK можна оптимізувати специфічність зв'язування ДНК та, відповідно, розщеплення ДНК. При цьому існують додаткові ефектори CRISPR, такі як ефектори CasX та CasY, спочатку описані для бактерій і являють собою додаткові ефектори, які можуть бути використані для цілей геномної інженерії (Burstin та співавт., New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes, Nature, 2017 р., 542, стор. 237-241).

Сайт розщеплення SDN належить до точного розташування на ДНК, де індукується розрив дволанцюгової ДНК. Сайт розщеплення може входити або не входити до сайту розпізнавання (збігатися з сайтом розпізнавання) SDN, і, отже, стверджується, що сайт розщеплення SDN розташований на його сайті розпізнавання або поблизу нього. Сайт розпізнавання ферменту SDN, також іноді званий сайтом зв'язування, є нуклеотидною послідовністю, яка (специфічно) розпізнається ферментом SDN та визначає його специфічність зв'язування. Наприклад, мономер TALEN або ZNF має сайт розпізнавання, який визначається їх RVD-повторами або ZF-повторами, відповідно тоді як його сайт розщеплення визначається його доменом нуклеази (наприклад, FokI) і зазвичай розташований поза сайтом розпізнавання. У разі димерних TALEN або ZFN, сайт розщеплення розташований між двома сайтами розпізнавання/зв'язування відповідних мономерів; ця проміжна ділянка ДНК, де відбувається розщеплення, називається ділянкою спейсера. У варіанті здійснення даного винаходу сайт розпізнавання розташований у цільовій ділянці.

Фахівець в даній галузі техніки може вибрати SDN, який розпізнає певний сайт розпізнавання і викликає розрив ланцюга в сайті розщеплення в попередньо обраному сайті або поблизу нього, або сконструювати такий SDN. В інших випадках сайт розпізнавання SDN може бути введений в цільовий геном з використанням будь-якого стандартного способу трансформації або шляхом схрещування з організмом, що має сайт розпізнавання SDN у його геномі, і будь-яка бажана ДНК може бути згодом введена сайт розщеплення цього SDN або поблизу нього.

В особливо переважному аспекті цього варіанту здійснення в рослинну клітину додатково вводять молекулу нуклеїнової кислоти репарації.

Вислів "матриця репарації", що використовується тут, позначає молекулу одноланцюгової або дволанцюгової ДНК, або молекулу PHK, яка використовується як матриця для модифікації геномної ДНК в попередньо обраному сайті поблизу сайту розщеплення або в сайті розщеплення. Вислів "використання як матриця для модифікації геномної ДНК", що використовується тут, означає, що матриця репарації копіюється або інтегрується в попередньо обраний сайт шляхом гомологічної рекомбінації між фланкуючою (фланкуючими) ділянкою (ділянками) і відповідною (відповідними) ділянкою (ділянками) гомології в цільовому геномі, що фланкує попередньо обраний сайт, необов'язково в комбінації з негомологічною сполукою кінців

(NHEJ) на одному з двох кінців матриці репарації (наприклад, якщо є тільки одна фланкуюча ділянка). Інтеграція шляхом гомологічної рекомбінації забезпечить точне з'єднання матриці репарації з цільовим геномом до рівня нуклеотидів, тоді як NHEJ може призвести до невеликих вставок/делецій на кордоні між матрицею репарації та геномною ДНК.

Використовуваний тут вислів "редактор основ" позначає білок або його фрагмент, що володіє здатністю опосередкувати цільову модифікацію основи, тобто перетворення основи, яка представляє інтерес, що призводить до точкової мутації, яка представляє інтерес. Переважно щонайменше один базовий редактор в контексті цього винаходу тимчасово або постійно з'єднаний щонайменше з одним SDN, переважно щонайменше з одним нефункціональним SDN або необов'язково з компонентом щонайменше одного (нефункціонального) SDN. Злиття може бути ковалентним і/або нековалентним. У кількох публікаціях показана цільова конверсія основ, в першу чергу цитидину (C) в тимін (T), з використанням нікази CRISPR/Cas9 або нефункціональної нуклеази, пов'язаної з доменом цитидиндезаміназ, каталітичного поліпептиду, аполіпропротеїну В (APOBEC1), що редагує мРНК, отриманого з щура. Дезамінування цитозину (C) каталізується цитидиндезаміназами і призводить до утворення урацилу (U), який має властивості спарювання основ тиміну (T). Більшість відомих цитидиндезаміназ діють на РНК, і ті деякі приклади, які, як відомо, приймають ДНК, вимагають одноланцюгової (ол) ДНК. Дослідження комплексу dCas9-цільової ДНК показують, що щонайменше дев'ять нуклеотидів (nt) зміщеного ланцюга ДНК залишаються неспареними при утворенні комплексу "R-петлі" Cas9 - гідової РНК - ДНК (Jore та співавт., Nat. Struct. Mol. Biol., 18, стор. 529-536 (2011 р.)). Справді, у структурі комплексу R-петлі Cas9 перші 11 nt протоспейсера на зміщеному ланцюзі ДНК не впорядковані, що дозволяє припустити, що їх рух не сильно обмежений. Також було висловлено припущення, що мутації, індуковані Cas9-ніказою в цитозинах у ланцюзі без матриці, можуть бути спричинені їх доступністю для клітинних ферментів цитозиндезаміназ. Було висловлено доказ про те, що підмножина цієї ділянки олДНК в R-петлі може служити ефективним субстратом для цитидиндезамінази, пов'язаної з dCas9, для здійснення прямої програмованої конверсії C в U ДНК (Komor та співавт., див. вище). Нещодавно Goudelli та співавт. ((2017 р.) Programmable base editing A-T to G-C in genomic DNA without DNA cleavage, Nature, 551(7681), 464) описали редактори основ аденіну (ABE), що опосередковують конверсію А•Т в G•C геномної ДНК.

Вислів "модифікація геному", що використовується тут, означає, що геном змінений щонайменше на один нуклеотид. Це може відбуватися шляхом заміни щонайменше одного нуклеотиду і/або делеції щонайменше одного нуклеотиду і/або вставки щонайменше одного нуклеотиду, за умови, що це призводить до повної зміни щонайменше одного нуклеотиду порівняно з нуклеотидною послідовністю попередньо обраного геномного цільового сайту перед модифікацією, що дозволяє ідентифікувати модифікацію, наприклад, за допомогою таких методик, як секвенування або ПЛР-аналізу тощо, які повинні бути добре відомі фахівцю.

Вислів "попередньо обраний сайт" або "попередньо визначений сайт", що використовується тут, вказує на конкретну нуклеотидну послідовність в геномі (наприклад, ядерному геномі), в місці розташування якої бажано вставити, замінити і/або видалити один або кілька нуклеотидів. Це може бути, наприклад, ендегенний локус або конкретна нуклеотидна послідовність в раніше введеної чужорідної ДНК або трансгені, або пов'язана з ними. Попередньо визначений сайт може бути конкретним положенням нуклеотиду, в який (після якого) передбачається здійснити вставку одного або декількох нуклеотидів. Попередньо обраний сайт також може містити послідовність одного або декількох нуклеотидів, які повинні бути обмінені (замінені) або видалені.

Вислів "фланкуюча ділянка", що використовується тут, означає ділянку молекули нуклеїнової кислоти репарації з нуклеотидною послідовністю, яка гомологічна нуклеотидній послідовності ділянки ДНК, фланкуючої (тобто розташованої проти перебігу або по перебігу транскрипції) попередньо визначений сайт. Буде зрозуміло, що довжина і відсоток ідентичності послідовностей фланкуючих ділянок повинні бути обрані таким чином, щоб забезпечити гомологічну рекомбінацію між зазначеними ділянками, що фланкують, і їхньою відповідною ділянкою ДНК проти перебігу або по перебігу транскрипції від попередньо визначеного сайту. Ділянка або ділянки ДНК, що фланкують попередньо визначений сайт і гомологічної фланкуючої ділянки або ділянкам ДНК молекули нуклеїнової кислоти репарації, також називаються ділянкою або ділянками гомології в геномній ДНК.

Для забезпечення достатньої гомології для рекомбінації, фланкуючі ділянки ДНК молекули нуклеїнової кислоти репарації можуть відрізнятися за довжиною і повинні мати довжину щонайменше близько 10 nt, близько 15 nt або близько 20 nt. При цьому фланкуюча ділянка може бути настільки довгою, наскільки це практично можливо (наприклад, приблизно до 100-

150 т.п.н., таких як бактеріальні повні штучні хромосоми (BAC). Переважно фланкуюча ділянка повинна становити приблизно від 50 nt до приблизно 2000 nt, наприклад, близько 100 nt, 200 nt, 500 nt або 1000 nt. Більш того, ділянки, фланкуючі ДНК, яка представляє інтерес, не обов'язково повинні бути ідентичні ділянкам гомології (ділянкам ДНК, фланкуючим попередньо визначений сайт) і можуть мати від приблизно 80 % до приблизно 100 % ідентичності послідовності, переважно від приблизно 95 % до приблизно 100 % ідентичності послідовності з ділянками ДНК, що фланкують попередньо визначений сайт. Чим довша ділянка, що фланкує, тим менш суворі вимоги до гомології. Крім того, для досягнення обміну цільової послідовності ДНК в попередньо визначеному сайті без зміни послідовності ДНК прилеглих послідовностей ДНК, що фланкують послідовності ДНК переважно повинні бути ідентичні розташованим проти перебігу і по перебігу транскрипції ділянкам ДНК, що фланкують попередньо визначений сайт.

Вислів "проти перебігу транскрипції", що використовується тут, вказує на місце розташування на молекулі нуклеїнової кислоти, яке знаходиться ближче до 5'-кінця зазначеної молекули нуклеїнової кислоти. Аналогічно термін "по перебігу транскрипції" належить до місця розташування на молекулі нуклеїнової кислоти, яке знаходиться ближче до 3'-кінця зазначеної молекули нуклеїнової кислоти. Щоб уникнути сумнівів, молекули нуклеїнових кислот та їхні послідовності зазвичай представлені у їхньому напрямку від 5' до 3' (зліва направо).

Додатковим варіантом здійснення цього винаходу є спосіб отримання рослини, стійкої до *Heterodera*, який може здійснюватися шляхом трансформації рослинної клітини молекулою нуклеїнової кислоти за даним винаходом, рекомбінантною молекулою ДНК або вектором, або експресійною касетою, і регенерації трансгенної рослини з трансформованої рослинної клітини (див. Приклад 3), або шляхом схрещування і селекції, наприклад, з однією з рослин вищезгаданого підвиду *Beta vulgaris* subsp. *maritima*. Вектори або експресійні касети, а також способи трансформації рослин описані вище.

Спосіб отримання рослини, стійкої до *Heterodera*, альтернативно включає, як описано вище, введення сайт-спрямованої нуклеази і матриці репарації в клітину рослини, переважно рослини виду *Beta vulgaris*, в якій сайт-спрямована нуклеаза здатна генерувати щонайменше один односторонній розрив або щонайменше один двосторонній розрив ДНК у геномі клітини, переважно проти перебігу і/або по перебігу транскрипції від цільової ділянки, і матриця репарації містить молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом. Крім того, даний спосіб включає культивування цієї клітини в умовах, які допускають репарацію, що спрямовується гомологією, або гомологічну рекомбінацію, при цьому молекула нуклеїнової кислоти включається з матриці репарації в геном рослини. Крім того, охоплюється регенерація рослини з модифікованої рослинної клітини.

В найкращому варіанті здійснення цільова ділянка являє собою алельний варіант молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом, причому алельний варіант, якщо він присутній у рослині, не надає стійкості до *Heterodera*. Було встановлено, що алельний варіант містить ретротранспозони.

Як описано у зв'язку з молекулою нуклеїнової кислоти за даним винаходом, можуть бути введені заміщення, делеції, вставки, приєднання і/або будь-які інші зміни, які окремо або в комбінаціях фактично змінюють нуклеотидну послідовність, але виконують ту ж функцію, що і вихідна послідовність – в даному випадку, нуклеотидна послідовність алельного варіанта молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом. Отже, у додатковому варіанті здійснення винахід включає нуклеотидну послідовність, яка являє собою похідну нуклеотидної послідовності алельного варіанту молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом, або амінокислотну послідовність, яка являє собою похідну амінокислотної послідовності алельного варіанту за даним винаходом. Похідна нуклеотидна або амінокислотна послідовність, яка має щонайменше одне заміщення, делецію, вставку або приєднання однієї або декількох нуклеїнових кислот або амінокислот, при яких функціональність гена зберігається, є похідною нуклеотидної або амінокислотної послідовності. Отже, в нуклеотидну послідовність можуть бути введені заміщення, делеції, вставки, приєднання і/або будь-які інші зміни окремо або в комбінаціях з геном, які фактично змінюють нуклеотидну послідовність, але виконують ту ж функцію, що і вихідна послідовність, з використанням стандартних способів, відомих з попереднього рівня техніки, наприклад, за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу, методики TILLING, ПЛР-опосередкованого мутагенезу, хімічно індукovanого мутагенезу, редагування геному, редагування основ і т.д.

Щодо амінокислотної послідовності, то після модифікації за допомогою вищезгаданого способу, вона також має загальний структурний домен і/або має загальну функціональну активність. Нуклеотидні послідовності або амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 91 %, щонайменше на

92 %, щонайменше на 93 %, щонайменше на 94 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 %, щонайменше на 99 % або щонайменше на 100 % ідентичні нуклеотидній послідовності або амінокислотної послідовності зазначеного алельного варіанта молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом, визначені тут як досить

5 подібні. Відповідно, даний винахід включає нуклеотидну послідовність, яка здатна гібридизуватися в суворих умовах з нуклеотидною послідовністю, яка комплементарна нуклеотидній послідовності алельного варіанта молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом або нуклеотидній послідовності, яка кодує відповідну амінокислотну послідовність.

10 У додатковому найкращому варіанті здійснення способу за даним винаходом відрізняється тим, що щонайменше один дволанцюговий розрив відбувається в позиції, яка становить не більше 10000 пар основ, переважно щонайменше 5000 пар основ, більш переважно щонайменше 1000 пар основ проти перебігу і/або по перебігу транскрипції від цільової ділянки, або яка видалена не більш ніж на 10000 пар основ, переважно щонайменше на 5000 пар основ, більш переважно щонайменше на 1000 пар основ від алельного варіанту за даним винаходом.

15 Для фахівця в даній галузі техніки може бути очевидним, що можливе виникнення декількох різних чутливих послідовностей, які походять з молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом, але не надають стійкості до *Heterodera*, так що послідовність, зазначену вище, слід розглядати тільки як приклад послідовності, і даний винахід не обмежується вищезгаданим алельним варіантом молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом. Зрозуміло, чутливі

20 варіанти молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом можуть містити ретротранспозиції не тільки як описано вище, але всі види мутацій, відомі фахівцю в даній галузі техніки і згадані вище в послідовності ДНК або кДНК, або в промоторній ділянці, можуть призводити до чутливих алелів.

Як описано вище, при кількісній спадковості QTL (локуса кількісних ознак) в рослину часто

25 привноситься не тільки бажана стійкість до патогену роду *Heterodera*, але й нерідко небажані ознаки, такі як, наприклад, зниження врожайності внаслідок успадкування додаткових генів, які не пов'язані з позитивною ознакою стійкості. Отже, в найкращому варіанті здійснення введення молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом або вищеприписаної комбінації молекул нуклеїнової кислоти за даним винаходом, яка вже сама по собі виявляє домінуючий ефект

30 стійкості, або вектора або експресійної касети, не пов'язано з введенням небажаних ознак, при цьому переважно відсутній негативний вплив на врожайність. Крім того, винахід охоплює рослину, отриману таким способом.

Хоча аналізи QTL, які раніше стали відомі з попереднього рівня техніки, могли виявляти фактичні QTL, основні ділянки геному, які показали ефект QTL, також опосередковували

35 недоліки, описані вище, і тому в даному контексті також розглядається "зчеплений вантаж". У той же час QTL і пов'язані з ними ефекти не були описані одноманітно у відповідному попередньому рівні техніки і просто опосередковували слабкий ефект, внаслідок чого використання цих результатів у селекції рослин, стійких до *Heterodera*, було можливе лише обмеженою мірою і було значною мірою невизначеним. Цілеспрямована селекція та

40 контрольована інтеграція гена стійкості до генного пулу цукрових буряків тепер можливі за рахунок ідентифікації описаного тут гена стійкості. Це забезпечує селекцію та отримання абсолютно нових сортів, стійких до *Heterodera*, які виявляють високу стійкість до патогену, не надаючи негативного впливу на вихід цукру.

Даний винахід також належить до способу ідентифікації і, можливо, отримання стійкої до

45 патогену *Heterodera* рослини виду *Beta vulgaris*, який відрізняється тим, що даний спосіб включає етап виявлення присутності і/або експресії молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом, або поліпептиду за даним винаходом в рослині або її зразку/частини. Присутність і/або експресію молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом, або поліпептиду за даним винаходом можна перевірити за допомогою стандартних методів, відомих фахівцю в даній

50 галузі техніки, наприклад, за допомогою ПЛР, ОТ-ПЛР або вестерн-блотингу.

Крім того, спосіб ідентифікації за даним винаходом також включає виявлення молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом за допомогою виявлення щонайменше одного поліморфізму в послідовності, що надає стійкість, тобто послідовностях молекули нуклеїнової

55 кислоти за даним винаходом. Як вже було описано вище, фахівцю в даній галузі техніки може бути очевидно, що існує кілька чутливих послідовностей, тобто кілька послідовностей, які кодують алельний варіант молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом. Отже, найкращий варіант здійснення способу за даним винаходом включає виявлення щонайменше одного поліморфізму з використанням молекулярних маркерів, які виявляють поліморфізми, зокрема, діагностичні поліморфізми. Таке виявлення переважно відбувається з використанням

60 щонайменше одного молекулярного маркера на поліморфізм, зокрема на діагностичний

поліморфізм. Фахівцю у даній галузі техніки відомо, які методи маркування слід застосовувати для виявлення відповідного поліморфізму, і як створюються молекулярні маркери для нього (див. *Advances in Seed Science and Technology*, том I, Vanangamudi та співавт., 2008 р.). Крім того, даний винахід охоплює молекулярні маркери, які описують або виявляють поліморфізм у

5 послідовностях молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом. Таким чином, також можливо використовувати маркери, які не розрізняють різні поліморфізми, за умови, що маркери здатні виявляти такий поліморфізм, який зустрічається в молекулі нуклеїнової кислоти за даним винаходом, але не містить чутливого алельного варіанту.

Альтернативно або додатково спосіб ідентифікації за даним винаходом включає етап виявлення щонайменше одного маркерного локусу в нуклеотидній послідовності молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом. В результаті цього генерується сигнал, наприклад сигнал флуоресценції або підсилювач послідовності. Крім того, попередні способи ідентифікації також є способами селекції рослини, яка виявляє стійкість до *Heterodera* за даним винаходом. Спосіб селекції включає заключний етап селекції стійкої рослини.

15 У даному контексті даний винахід також включає розробку або отримання молекулярних маркерів, які підходять для виявлення вищезгаданих поліморфізмів стійкого алелю, або конструювання гібридизаційних зондів, які специфічно зв'язуються з нуклеотидною послідовністю молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом, або отримання пари молекул нуклеїнової кислоти, яка придатна для ампліфікації в ділянці ПЛР, специфічної для молекули

20 нуклеїнової кислоти за даним винаходом, і, таким чином, для їх виявлення у рослині або рослинній клітині.

Винахід переважно включає спосіб отримання олігонуклеотидів довжиною щонайменше 15, 16, 17, 18, 19 або 20, переважно щонайменше 21, 22, 23, 24 або 25, дуже переважно щонайменше 30, 35, 40, 45 або 50, і особливо переважно щонайменше 100, 200, 300, 500 або

25 1000 нуклеотидів, які специфічно гібридизуються з нуклеотидною послідовністю молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом, або молекулою нуклеїнової кислоти, яка комплементарна їй, або парою молекул нуклеїнової кислоти – переважно, у формі олігонуклеотидів, – яка придатна для приєднання як прямого та зворотного праймера до ділянки, яка специфічна для молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом, та для її

30 ампліфікації в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР), або яка придатна для гібридизації як прямого та зворотного праймера з ділянкою в геномі *Beta vulgaris*, яка в *Beta vulgaris* має косегрегацію із стійкістю до *Heterodera*, що надається поліпептидом за даним винаходом, або молекулою нуклеїнової кислоти за даним винаходом.

Спосіб отримання олігонуклеотидів спочатку включає в себе етапи, на яких: порівнюють нуклеотидну послідовність молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом з нуклеотидною послідовністю відповідної молекули нуклеїнової кислоти, яка не надає стійкості; ідентифікують

35 відмінності у послідовності між двома нуклеотидними послідовностями; і генерують молекули нуклеїнової кислоти – тут маються на увазі олігонуклеотиди, – які специфічно зв'язуються з молекулою нуклеїнової кислоти за даним винаходом, але не з молекулою нуклеїнової кислоти, яка не опосередковує стійкість.

Крім того, олігонуклеотид за даним винаходом може бути з'єднаний з флуоресцентним барвником для генерації сигналу флуоресценції, наприклад, при збудженні світлом відповідної довжини хвилі. Як флуоресцентний барвник може використовуватися флуорохром. Олігонуклеотиди за даним винаходом можуть бути спряжені з іншими сполуками, придатними

45 для генерації сигналу. Такі олігонуклеотиди не зустрічаються в природі, а також не можуть бути виділені із природи. Для отримання таких маркованих олігонуклеотидів виконується наступне: ДНК може бути маркована биортогонально. Для цього ДНК може бути маркована *in vivo* або *in vitro* аналогами нуклеозидів, які, наприклад, згодом можуть бути пов'язані з флуорофором реакції Штаудінгера. Крім цього, ДНК також може бути хімічно забезпечена флуорофорами.

50 Олігонуклеотиди можуть бути марковані за допомогою синтезу фосфорамідиту за допомогою флуорофорів, які, наприклад, використовуються в кПЛР, секвенуванні ДНК та гібридизації *in situ*. Крім того, ДНК може бути генерована ферментативно під час полімеразної ланцюгової реакції з флуоресцентними нуклеотидами або бути маркована лігазою або термінальною дезоксинуклеотидилтрансферазою. ДНК також може бути виявлена опосередковано за

55 допомогою біотинілування та флуоресцентного авідину. Для спряження як флуорофори, крім іншого, використовуються флуоресцеїн, флуоресцентні лантанові іони, наночастинки золота, вуглецеві нанотрубки або квантові точки. Одним з найбільш часто використовуваних флуоресцентних речовин є FAM (карбоксіфлуоресцеїн). Отже, винахід охоплює олігонуклеотиди і, зокрема, праймери, які мають маркування FAM. FAM переважно

60 представлений у вигляді 6-FAM, проте, при цьому - залежно від бажаної довжини хвилі

випромінювання та збудження - можуть використовуватися інші варіанти FAM, наприклад, 5-FAM. Прикладами додаткових флуоресцентних маркерів є AlexaFluor, ATTO, Dabcyl, HEX, Rox, TET, Texas Red та Yakima Yellow. Залежно від галузі застосування олігонуклеотиди можуть бути забезпечені модифікаціями основ або сахарофосфатного кістяка. До них належать, крім іншого, 5-аміно-dT, азид-dT, 2-амінопурин, 5-Br-dC, 2'-дезоксіінозін (INO), 3'-дезоксид-А, С, G, 5-мет-dC, 5-ОН-мет-dCN6-мет-dA та інші.

Крім того, даний винахід належить до маркерного чіпа ("ДНК-чіпу" або мікрочіпу), який містить щонайменше один олігонуклеотид за даним винаходом, придатний для виявлення. Маркерний чіп придатний для застосування в одному або кількох способах виявлення за даним винаходом.

Винахід також включає спосіб отримання білка за даним винаходом. Спосіб включає отримання або культивування культури клітин, яка містить будь-який з SEQ ID №№ 2, 5 і 8, та наступну експресію білка, що кодується будь-яким з SEQ ID №№ 2, 5 і 8.

Крім того, даний винахід належить до стійкої до *Heterodera* рослини або її частини, які були ідентифіковані і, якщо застосовно, відібрані за допомогою способу, описаного вище. Зокрема, даний винахід належить до популяції рослин, що включає рослини, які доступні за одним зі способів даного винаходу, як описано вище, і які переважно стійкі до бурякової цистоутворюючої нематоди, і відрізняються присутністю молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом. Популяція переважно містить щонайменше 10, переважно щонайменше 50, більш переважно щонайменше 100, особливо переважно щонайменше 500 і, зокрема, при сільськогосподарському вирощуванні переважно щонайменше 1000 рослин. Частка рослин у популяції, які не несуть молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом і/або сприйнятливі до зараження *Heterodera*, зокрема *Heterodera schachtii*, переважно становить менше 25 %, переважно менше 20 %, більш переважно менше 15 %, ще більш переважно 10 %, і особливо переважно менше 5 %, якщо вона взагалі присутня.

За допомогою точного картування, описаного вище, можна ідентифікувати ген (гени) в геномі, що надає (надають) стійкість до *Heterodera*. Це, у свою чергу, являє собою основу для розробки зондів гібридизації ДНК або генетичних маркерів у цільовій ділянці, за допомогою яких можна виявити ген, що опосередковує стійкість до *Heterodera* або відрізнити ген, що опосередковує стійкість до *Heterodera*, від гена, який не надає стійкості.

Зонди гібридизації ДНК можуть бути отримані з послідовності гена (генів), що надає (надають) стійкість до *Heterodera*, і використовуватися для скринінгу геномних банків і/або банків кДНК потрібного організму. Зонди можуть бути використані для ампліфікації ідентифікованих гомологічних генів за допомогою відомого процесу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і для перевірки гена, що надає стійкість до *Heterodera*, щодо ендемічної присутності в організмі або його успішного введення гетерологічним способом.

У цьому випадку фахівець у даній галузі техніки може вдаватися до звичайних способів гібридизації, клонування та секвенування, які, наприклад, перераховані в Sambrook та співавт., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е вид. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001 р. Фахівець у даній галузі техніки також може синтезувати та використовувати олігонуклеотидні праймери для ампліфікації послідовностей гена (генів), що надає (надають) стійкість до *Heterodera*. Для досягнення специфічної гібридизації такі зонди повинні бути специфічними і мати довжину щонайменше 15 нуклеотидів, переважно щонайменше 20 нуклеотидів. Докладний посібник з гібридизації нуклеїнових кислот можна знайти в Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Acid Probes*, частина 1, розділ 2, "Огляд принципів гібридизації та стратегія аналізів з використанням зондів нуклеїнових кислот". Elsevier, Нью-Йорк (1993 р.); і в *Current Protocols in Molecular Biology*, глава 2, Ausubel та співавт., ред., видання Greene Publishing і Wiley Interscience, Нью-Йорк (1995 р.).

Отже, предметом даного винаходу є молекула нуклеїнової кислоти довжиною щонайменше 15, 16, 17, 18, 19, або 20, переважно щонайменше 21, 22, 23, 24 або 25, дуже переважно щонайменше 30, 35, 40, 45 або 50, і особливо переважно щонайменше 100, 200, 300, 500 або 1000 нуклеотидів, при цьому дана молекула нуклеїнової кислоти специфічно гібридується з раніше описаною нуклеотидною послідовністю за даним винаходом, яка містить ген (гени), що надає (надають) стійкість до *Heterodera*. Сюди також явно входить діапазон від 15 % до 35 % нуклеотидів.

Отже, даний винахід також належить до маркерів у вигляді олігонуклеотидів, зокрема, до праймерних олігонуклеотидів. Вони включають молекулу нуклеїнової кислоти довжиною щонайменше 15 нуклеотидів, яка специфічно гібридується з нуклеотидною послідовністю, визначеною вище.

Зокрема, даний винахід охоплює пару молекул нуклеїнової кислоти – переважно у формі олігонуклеотидів або набору, що містить цю пару олігонуклеотидів, – яка придатна для гібридизації як прямий і зворотний праймер до ділянки, яка специфічна для молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом, та для її ампліфікації в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР), або яка придатна як прямий і зворотний праймер для гібридизації з ділянкою в геномі *Beta vulgaris*, який у *Beta vulgaris* виявляє косегрегацію зі стійкістю до патогену роду *Heterodera*, що надається поліпептидом за даним винаходом, або з молекулою нуклеїнової кислоти за даним винаходом. Переважно ділянка в геномі *Beta vulgaris* розташована між маркером s5e3001s02 і маркером s5e4668xxx, фланкована s5e3001s02 маркером і маркером s5e4668xxx або містить хромосомний інтервал між маркером s5e3001s02 і маркером s5e4668xxx.

За допомогою даного винаходу також можуть бути досягнуті наступні переваги для селекції і розробки нових стійких ліній рослин роду *Beta*. Інформація про послідовність, а також ідентифіковані поліморфізми, які дозволяють проводити диференціацію між стійкими та потенційно чутливими алелями розкритого гена, тобто між алелями, що надають стійкості до патогену роду *Heterodera*, та алелями, які не здатні надавати цю стійкість, дозволяють розробити маркер, який є важливим сприянням для селекціонера, зокрема, щодо розробки оптимізованих елітних ліній без "зчепленого вантажу". Більш того, знання про послідовну структуру можуть бути використані для ідентифікації додаткових генів стійкості, зокрема, до *Heterodera*, які є, наприклад, гомологічними або ортологічними.

Отже, даний винахід також включає спосіб ідентифікації додаткових молекул нуклеїнових кислот, які надають стійкість до патогену роду *Heterodera*, якщо присутні в рослині, і які кодують поліпептиди або додаткові білки, які здатні надавати стійкість до патогену роду *Heterodera* в рослині, в якій експресується поліпептид, відповідно. Отже, фахівець у даній галузі техніки може використовувати бази даних, застосовуючи відповідні профілі пошуку та комп'ютерні програми для скринінгу гомологічних послідовностей або для порівняння послідовностей. Більш того, за допомогою звичайних методів молекулярної біології фахівець у даній галузі техніки може самостійно одержати додаткові послідовності ДНК, що кодують білки, стійкі до *Heterodera*, та використовувати їх у рамках даного винаходу. Наприклад, відповідні гібридизаційні зонди можуть бути отримані з послідовності молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом і використовуватися для скринінгу геномних банків і/або банків кДНК потрібного організму. У цьому випадку фахівець у даній галузі техніки може вдатися до звичайних способів гібридизації, клонування та секвенування, які, наприклад, перераховані в Sambrook та співавт., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е вид. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001 р. Використовуючи відомі послідовності, фахівець у даній галузі техніки може також синтезувати та використовувати олігонуклеотидні праймери для ампліфікації послідовностей молекул нуклеїнових кислот, що надають стійкості до *Heterodera*.

Отже, в одному варіанті здійснення даний винахід охоплює спосіб ідентифікації молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид, здатний надавати стійкість до *Heterodera* у виду рослини *Beta vulgaris*, в якій експресується поліпептид. Отже, спосіб включає порівняння амінокислотної послідовності поліпептиду згідно винаходу, який в *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* надає стійкість до патогену роду *Heterodera* завдяки амінокислотним послідовностям з бази даних послідовностей, або завдяки послідовностям алельних варіантів поліпептиду за даним винаходом в генотипах виду *Beta vulgaris*. Крім того, спосіб за даним винаходом включає ідентифікацію амінокислотної послідовності або алельного варіанту, який щонайменше на 70 %, переважно щонайменше на 80 % ідентичний амінокислотної послідовності поліпептиду за даним винаходом, а також введення молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує ідентифіковану амінокислотну послідовність або алельний варіант у рослині виду *Beta vulgaris*; експресію молекули нуклеїнової кислоти у рослині; та необов'язково наступну перевірку стійкості до патогену роду *Heterodera*.

Як описано вище, додаткові білки, що надають стійкість до *Heterodera*, або їхні кодуючі гени, тобто гомологи, аналоги і ортологи, які щонайменше на 70 %, переважно щонайменше на 80 %, дуже переважно щонайменше на 90 %, особливо переважно щонайменше на 95 % або навіть на 98 % ідентичні амінокислотної послідовності поліпептиду, яка кодується молекулою нуклеїнової кислоти за даним винаходом, можуть бути ідентифіковані за допомогою класичних біоінформаційних підходів (пошук у базі даних та комп'ютерні програми для скринінгу гомологічних послідовностей).

Додатковий варіант здійснення винаходу належить до рослини або насіння, що містить нуклеїнову кислоту за даним винаходом, як описано тут, причому рослина або насіння такої рослини має геном, що дозволяє розвивати тіло буряка з мінімальною свіжою масою, що

дорівнює 200 г, 250 г, 300 г, 400 г, 450 г або 500 г і максимальною масою 100 г, 1100 г, 1200 г, 1300 г, 1400 г, 1500 г, 1600 г, 1700 г, 1800 г, 1900 г або 2000 г. Відповідний генетичний склад для розвитку такого тіла буряка є, наприклад, у наступних сортів: BTS 8629, BTS 8735, BTS 8500, BTS 8767 або BTS 8749. Фахівець у даній галузі техніки знає, як перенести нуклеїнову кислоту за даним винаходом в рослину, що має такий генетичний склад. Насіння в цьому варіанті здійснення може являти собою дражоване насіння.

Додатковий варіант здійснення винаходу належить до рослини або насіння, що містить нуклеїнову кислоту за даним винаходом, як описано тут, причому рослина або насіння такої рослини має геном, що дозволяє розвивати тіло буряка з концентрацією сахарози у свіжій масі тіла буряка, щонайменше 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % або навіть 20 % (відсотків за масою). Відповідний генетичний склад для розвитку такого тіла буряка є, наприклад, у наступних сортів: BTS 8629, BTS 8735, BTS 8500, BTS 8767 або BTS 8749. Фахівець у даній галузі техніки знає, як перенести нуклеїнову кислоту за даним винаходом в рослину, що має такий генетичний склад. Насіння в цьому варіанті здійснення може являти собою дражоване насіння.

Отже, термін "гомолог(и)" означає, що відповідні гени (з двох різних видів рослин) мають по суті одну і ту ж функцію та загального предка, і, отже, зазвичай демонструють значну ідентичність у своїх послідовностях нуклеїнових кислот або кодованих амінокислот. При цьому також існує багато генів, які гомологічні один одному, без білкових послідовностей, що призводять до значного парного вирівнювання. На відміну від цього, термін "аналог(и)" описує гени або білки, які (аналогічно) мають ідентичну або подібну функцію, але не створені з однієї і тієї ж структури, тобто не мають спільного предка. У цьому випадку часто неможливо встановити значну ідентичність в їхній нуклеїновій кислоті або амінокислотній послідовності, що кодується, або, у кращому випадку, в конкретних функціональних доменах.

У контексті секвенування геному гомологи з метою анотації класифікуються більш точно. З цією метою були введені терміни "ортологія" та "паралогія". Ортологи – це гени, пов'язані через подію видоутворення. Паралоги - це гени, які сягають події дуплікації.

Отже, ген, по суті, є гомологом, аналогом або ортологом в сенсі даного винаходу, якщо він здатний надавати рослині стійкість до *Heterodera*. Для перевірки використовуються способи, які вже описані вище і відомі фахівцю в даній галузі техніки, наприклад, ампліфікація ідентифікованого гомолога або аналога, або ортолога за допомогою ПЛР, клонування у векторах експресії, введення в цільову рослину або рослинну клітину, та перевірка стійкості.

Як описано вище, розкриті тут використання алелю стійкого гена в цис- або трансгенетичних підходах відкриває можливість нових стійких видів роду *Beta*, які, використовуючи ефект дози, виявляють підвищену стійкість, або в яких можна уникнути розриву стійкості і оптимізувати розвиток стійкості за допомогою пірамідування розкритого гена з іншими генами стійкості. Також можливі модифікації гена з використанням методики TILLING або цілеспрямованої інженерії для вироблення нових алелів стійкості.

Даний винахід належить до використання в рослині ідентифікованого алелю гена, що надає стійкість до *Heterodera*, в генетичному або молекулярному пакеті з іншими генетичними елементами, які можуть надавати агрономічно вигідні властивості. Отже, економічна цінність культурних рослин може бути помітно збільшена, у тому сенсі, що, наприклад, показники врожайності підвищуються в порівнянні з рослинами, які мають таку ж генетику, але не забезпечені нуклеїною кислотою за даним винаходом. Крім того, можуть бути відкриті нові посівні площі для рослин, які раніше були недоступні для вирощування цієї рослини внаслідок біотичних факторів, таких як сильний тиск патогенів. Зокрема, даний винахід належить до використання ідентифікованого алелю гена, що надає стійкість до *Heterodera*, у способах боротьби з зараженням патогеном *Heterodera schachtii* при сільськогосподарському або садівничому вирощуванні рослин роду *Beta*, наприклад, включаючи ідентифікацію та селекцію рослин роду *Beta* за допомогою одного із способів, описаних вище, і/або культивування обраних таким чином рослин, або їх нащадків. Отже, даний винахід включає спосіб культивування рослин виду *Beta vulgaris*, що включає на першому етапі отримання стійких до *Heterodera* рослин виду *Beta vulgaris* за даним винаходом або отримання рослин виду *Beta vulgaris* за допомогою способу отримання за даним винаходом, або ідентифікацію і селекцію рослин виду *Beta vulgaris* за допомогою способу ідентифікації за даним винаходом, який був описаний вище; і включаючи на другому етапі культивування рослин з першого етапу або розміщення насіннєвого матеріалу з рослини з першого етапу або вирощування рослин з першого етапу. Отже, спосіб культивування протидіє зараженню *Heterodera* культурних рослин. Спосіб культивування може бути частиною способу виробництва цукру. Спосіб виробництва цукру

включає етапи способу культивування і додатково, як передостаннього етапу, збір врожаю культурних рослин і, як останнього етапу, екстракцію цукру з вищезгаданих рослин.

Спосіб культивування також може бути частиною способу отримання насіннєвого матеріалу. Спосіб отримання насіннєвого матеріалу включає етапи способу культивування і додатково, як передостаннього етапу, яровизацію культурних рослин і, як останнього етапу, екстракцію насіння з вищезгаданих рослин. Екстраговане насіння необов'язково може бути дражовані для отримання дражированного насіннєвого матеріалу виду *Beta vulgaris*. У цьому випадку йдеться про спосіб отримання дражованого насіннєвого матеріалу.

Більш того, спосіб отримання насіннєвого матеріалу може бути розроблений як спосіб отримання насіннєвого матеріалу, стійкого до *Heterodera*. Спосіб отримання насіннєвого матеріалу, стійкого до *Heterodera*, включає в себе етапи описаного вище способу отримання насіннєвого матеріалу і додатково, як останнього етапу, перевірку нуклеїнової кислоти за даним винаходом відповідно до описаного тут способу щонайменше в одному з екстрагованих насінин, переважно по щонайменше 0,1 % або щонайменше 1 % екстрагованих насінин. Перевірка особливо переважно здійснюється таким чином, щоб насіння залишалося придатним для проростання. Це означає, що вилучення з насіння ДНК, необхідної для перевірки, не нейтралізує схожість насіння. У такому випадку перевірка нуклеїнової кислоти за даним винаходом по могла бути проведена в особливо великій частки усіх екстрагованих насінин. Наприклад, перевірка може проводитися щонайменше у 2 %, переважно щонайменше у 3 %, особливо переважно щонайменше у 4 % від усіх екстрагованих насінин.

Рослини за даним винаходом, їхні клітини або насіння, або насіннєвий матеріал за даним винаходом можуть мати додаткові, агрономічно вигідні властивості або бути забезпечені такими. Одним із прикладів є толерантність або стійкість до гербіцидів, таких як гліфосат, глюфосинат або інгібітори ALS. Переважна стійкість до гліфосату або гербіциду, що інгібує ALS. Конкретний варіант здійснення стійкості до гліфосату розкритий в US 7 335 816 B2. Така стійкість до гліфосату, наприклад, є в насіннєвому матеріалі, що зберігається в NCIMB, Абердін (Шотландія, Сполучене Королівство), за номером доступу NCIMB 41158 або NCIMB 41159. Таке насіння може бути використане для отримання толерантної до гліфосату рослини цукрового буряка. Стійкість до гліфосату може бути передана іншим видам роду *Beta* шляхом схрещування.

Отже, винахід також охоплює рослини, їхні клітини або насіння, або насіннєвий матеріал, що відрізняються тим, що вони містять молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом, і, крім того, тим, що фрагмент ДНК геномної ДНК рослини, його частин або насіння може бути ампліфікований за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з першим та другим праймером.

Конкретний варіант здійснення стійкості до гербіцидів, що інгібують ALS, розкритий в документі WO 2012/049268 A1. Наприклад, така стійкість до гербіцидів, що інгібують ALS, є в матеріалі, що зберігається в NCIMB, Абердін, Сполучене Королівство, під номером NCIMB 41705. Крім того, така стійкість до ALS-інгібітора може бути отримана за методикою TILLING або шляхом сайт-спрямованого мутагенезу, наприклад, за допомогою редагування генів, наприклад, за допомогою CRISPR/Cas. Отже, винахід також охоплює рослини, їх клітини або насіння, або насіннєвий матеріал, що відрізняються тим, що вони містять молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом, і, крім того, тим, що вони демонструють мутацію в ендегенному гені ацетолактатсинтази, при цьому ген ацетолактатсинтази кодує білок ацетолактатсинтази, який внаслідок мутації в позиції 569 має амінокислоту, що відрізняється від триптофану. В результаті мутації амінокислота в позиції 569 переважно являє собою аланін, гліцин, ізолейцин, лейцин, метіонін, фенілаланін, пролін, валін або аргінін. Крім того, мутація може бути присутньою як гетерозиготно, так і гомозиготно в рослинах, їхніх клітинах або насінні, або насіннєвому матеріалі. Ми рекомендуємо гомозиготну присутність мутації, оскільки це сприяє більш стабільному або більш інтенсивному фенотиповому виникненню стійкості.

З попереднього рівня техніки фахівцю в даній галузі техніки відомі численні додаткові гербіциди та їх застосування. З метою забезпечення відповідної толерантності рослин він може звернутися до попереднього рівня техніки для отримання знань про те, які генетичні елементи повинні використовуватися, та яким чином.

Додатковим прикладом агрономічно вигідної властивості є додаткова стійкість до патогенів, причому патогенами можуть бути, наприклад, комахи, віруси, нематоди, бактерії або гриби. Наприклад, широкий захист рослини від патогенів може бути досягнутий за рахунок комбінації різних стійкостей/толерантностей до патогенів, оскільки генетичні елементи можуть проявляти адитивні ефекти між собою. Наприклад, фахівцю в даній галузі техніки відомі різні гени такої стійкості як генетичні елементи. Наприклад, в US 2016/0152999 A1 розкрито ген стійкості RZ до захворювання *Rhizomania*. Це захворювання викликає збудник "вірус некротичного пожовтіння

жилок буряка". Декілька видів стійкості до хвороб, що містяться в одній рослині, здійснюють синергічний вплив один на одного. Якщо рослина вперше заражається патогеном, його імунна система зазвичай буває ослаблена, і епідерміс як зовнішній бар'єр часто буває пошкоджений, внаслідок чого зростає ймовірність подальших інфекцій. Додатковим прикладом агрономічно вигідної властивості є стійкість до холоду чи морозостійкість. Рослини, які виявляють цю властивість, можуть бути посіяні вже на початку року або можуть залишатися в полі довше, що може призвести, наприклад, до збільшення врожайності. У цьому випадку фахівець у даній галузі техніки також може звернутися до попереднього рівня техніки для пошуку відповідних генетичних елементів. Додатковими прикладами агрономічно вигідних властивостей є ефективність використання води, ефективність використання азоту та врожайність. Генетичні елементи, які можуть бути використані для надання таких властивостей, можуть бути знайдені на попередньому рівні техніки.

Крім того, фахівцю в даній галузі техніки відомі різні модифікації для захисту від патогенів. На додаток до сімейств R-генів, які часто описуються, можна ефективно використовувати підхід Avr/R, комплементацию гена Avr (WO 2013/127379), автоактивация R-гена (WO 2006/128444) або підхід HIGS (індукований хазяїном сайленсінг генів) (наприклад, WO 2013/050024). Зокрема, автоактивация R-гена може бути важлива для цього винаходу. Для цього необхідно створити нуклеїнову кислоту, яка кодує автоактивований білок стійкості для утворення стійкості до патогенів у рослин. Потім ця нуклеїнова кислота містить лише обмежену частину гена стійкості NBS-LRR, такого як wb-R-ген, яка простягається по перебігу транскрипції від 5'-кінця кодуєчої ділянки гена стійкості NBS-LRR до початку кодування домену NBS гена стійкості NBS-LRR.

У цьому контексті також включений спосіб, який містить етап видалення тієї ділянки нуклеїнової кислоти за даним винаходом, яка кодує N-кінцеву ділянку і яка починається з р-петлі в домені NBS і продовжується до кінця N-кінцевої ділянки.

Білки стійкості, які кодуються такими вкороченими нуклеїновими кислотами, зазвичай є автоактивованими, оскільки ці білки стійкості викликають імунну реакцію в рослині навіть у відсутність асоційованого патогену і, таким чином, підвищують базовий імунітет рослини. Крім того, включені така укорочена нуклеїнова кислота по даному винаходу та поліпептид, який вона кодує.

Крім того, винахід також включає використання алелю гена, що надає стійкість до *Heterodera*, ідентифікованого описаним вище способом, для комбінації з однією з попередніх модифікацій або з генетичним елементом, описаним вище, який може передавати рослині одну або кілька агрономічно вигідних властивостей.

На додаток до рослини за даним винаходом, даний винахід також належить до насіння або нащадків, або до органу, частини рослини, тканини або її клітини при виробництві продуктів, які зазвичай виробляють з екологічно стійких сировинних матеріалів, таких як харчові продукти і корми для тварин, переважно цукор або сироп (меляса), при цьому меляса також використовується для промислового застосування, наприклад, у виробництві спирту або як живильне середовище для виробництва біотехнологічних продуктів, у виробництві матеріалів або речовин для хімічної промисловості, наприклад, очищених хімікатів, фармацевтичних препаратів або їхніх прекурсорів, діагностичних засобів, косметичних засобів, біоетанолу або біогазу. Приклад використання цукрового буряка як біогенний сировинний матеріал у біогазових установках описаний у заявці DE 10 2012 022 178 A1; див., наприклад, пункт 10.

Наступні приклади пояснюють винахід, але не обмежують предмет винаходу. Якщо не зазначено інше, використано стандартні методи молекулярної біології; див., наприклад, Sambrook та співавт., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е вид., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спрінг-Харбор, Нью-Йорк, 2001 р., Fritsch та співавт., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989 р.; Mayer та співавт., *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*, ред., Academic Press, Лондон, 1987 р., і Weir та співавт., *Handbook of Experimental Immunology*, томи I-IV, Blackwell, ред., 1986 р.

Деякі з найбільш важливих послідовностей за даним винаходом докладно пояснені нижче:

- SEQ ID № 1: послідовність геномної ДНК гена LLR2, що надає стійкість до *Heterodera*, з *Beta vulgaris. maritima*.

- SEQ ID № 2: послідовність кДНК гена LLR2, що надає стійкість до *Heterodera*, оскільки він не зустрічається в природі.

- SEQ ID № 3: амінокислотна послідовність білка LLR2, що надає стійкість до *Heterodera*, оскільки він кодується і SEQ ID № 1 або SEQ ID № 2.

- SEQ ID № 4: послідовність геномної ДНК гена LLR1, що надає стійкість до *Heterodera*, з *Beta vulgaris. maritima*.

- SEQ ID № 5: послідовність кДНК гена LLR1, що надає стійкість до *Heterodera*, оскільки він не зустрічається в природі.
- SEQ ID № 6: амінокислотна послідовність білка LLR1, що надає стійкість до *Heterodera*, оскільки він кодується iSEQ ID № 4 або SEQ ID № 5.
- 5 - SEQ ID № 7: послідовність геномної ДНК гена LLR3, що надає стійкість до *Heterodera*, з *Beta vulgaris. maritima*.
- SEQ ID № 8: послідовність кДНК гена LLR3, що надає стійкість до *Heterodera*, оскільки він не зустрічається в природі.
- 10 - SEQ ID № 9: амінокислотна послідовність білка LLR3, що надає стійкість до *Heterodera*, оскільки він кодується iSEQ ID № 7 або SEQ ID № 8.
- SEQ ID № 10: аллельна версія молекулярного маркера s5e3001s02, що надає стійкість
- SEQ ID № 11: чутлива аллельна версія молекулярного маркера s5e3001s02
- SEQ ID № 12: аллельна версія молекулярного маркера s5e4668xxx, що надає стійкість
- SEQ ID № 13: чутлива аллельна версія молекулярного маркера s5e4668xxx
- 15 Молекулярний маркер s5e3001s02 та молекулярний маркер s5e4668xxx є зовнішніми фланкуючими маркерами ділянки, що надає стійкість, яка містить гени, що надають стійкість, за SEQ ID № 1 i/або SEQ ID № 4.
- Додаткові молекулярні маркери, придатні для ідентифікації генів стійкості SEQ ID № 1 i/або SEQ ID № 4, або для ідентифікації геномних ділянок, що кодують поліпептид, що надає стійкість, за SEQ ID № 3 або SEQ ID № 6, наведені в табл. 4. Маркери також можуть бути використані для розрізнення між алельною версією генів, що надає стійкість, за даним винаходом і алельною версією цих генів, яка не надає стійкості.
- 20

Таблица 4

Маркер	SEQ ID №	Алельний варіант, що надає стійкості
s5e4355xxx	14	ні
s5e4355xxx	15	так
s5e7304s01	16	ні
s5e7304s01	17	так
s5e3316xxx	18	ні
s5e3316xxx	19	так
s5e3735xxx	20	так
s5e3735xxx	21	ні
s5p8662s01	22	так
s5p8662s01	23	ні
s5e4282xxx	24	ні
s5e4282xxx	25	так
s5e5857s01	26	так
s5e5857s01	27	ні
s5e5006xxx	28	ні
s5e5006xxx	29	так
s5p4394s01	30	ні
s5p4394s01	31	так
s5e5974s01	32	ні
s5e5974s01	33	так
s5e5869s01	34	так
s5e5869s01	35	ні
s5e5976s01	36	так
s5e5976s01	37	ні
s5p4361s01	38	ні
s5p4361s01	39	так
s5e5865s01	40	ні
s5e5865s01	41	так
s5p2211s01	42	ні
s5p2211s01	43	так
s5e5868s01	44	ні
s5e5868s01	45	так
s5e5890s01	46	ні

s5e5890s01	47	так
sxi0735s01	48	ні
sxi0735s01	49	так
s5e5894s01	50	так
s5e5894s01	51	ні
s5e5893s01	52	так
s5e5893s01	53	ні
s5p4401d01	54	так
s5p4401d01	55	ні
s5e5883s01	56	так
s5e5883s01	57	ні
s5e5887s01	58	ні
s5e5887s01	59	так
s5e5888s01	60	ні
s5e5888s01	61	так
s5e4503s02	62	так
s5e4503s02	63	ні
s5e4503xxx	64	так
s5e4503xxx	65	ні
s5e4021xxx	66	ні
s5e4021xxx	67	так
s5e5771s05	68	так
s5e5771s05	69	ні
s5e5771s01	70	ні
s5e5771s01	71	так
s5e5771s02	72	ні
s5e5771s02	73	так
s5e5771s03	74	так
s5e5771s03	75	ні
s5e3504xxx	76	ні
s5e3504xxx	77	так
s5e2943xxx	78	ні
s5e2943xxx	79	так
s5e2730xxx	80	так
s5e2730xxx	81	ні
s5e5182s03	82	ні
s5e5182s03	83	так
s5e6157s02	84	так
s5e6157s02	85	ні
s5e6157s03	86	так
s5e6157s03	87	ні

ПРИКЛАДИ

Приклад 1: Проведення тесту на нематоду

1) Рослини за даним винаходом висівали в тепличний торф'яний субстрат

5 2) Рослини пересажували після появи сходів у стадії сім'ядолей у пластикові ящики (розміром приблизно 2*1*15 см), місткістю приблизно 30 мл, заповнені кварцовим піском у вигляді окремих рослин (одна рослина на ящик). Як альтернатива саджанці з тканинної культури можуть бути перенесені безпосередньо в пластикові ящики. Умови температури та освітлення: 16/8 годин світла/темряви зі зміною температури 23 °C/12 °C.

10 3) За тиждень після пересадки імітували зараження шляхом застосування 600 личинок *Heterodera schachtii*.

4) Оцінка рослин та кількості цист проводилася під бінокуляром за 4 тижня після зараження.

Приклад 2: Збір генів

15 Локус стійкості розташований на хромосомі 5, і цільова ділянка була зменшена в кілька етапів картування до фланкуючих маркерів s5e5864s01 (інтегрована генетична карта: 9,17 cM) та s5e4503s02 (9,74 cM), що охоплюють фізичну відстань 11934 п.о. на еталонній фізичній карті (ZR_BPMv7 – чутлива до моногермії еталонна послідовність). Під час скринінгу ВАС стійкої донорської лінії були ідентифіковані три клони ВАС для цільової ділянки генома. Клон ВАС

були секвеновані з використанням методу PacBio (Fichot, Erin B., та R. Sean Norman. *Microbial phylogenetic profiling with the Pacific Biosciences sequencing platform*. *Microbiome* 1.1 (2013 p.): 10). Цей спосіб дозволяє одержувати більш довгі контиги послідовностей контигів і, таким чином, полегшує подальше складання контигів, згенерованих з геномних ділянок, що містять послідовності, що повторюються. Була зібрана стійка послідовність без проломів, що дозволяє проводити порівняння послідовностей між стійким і чутливим еталонним генотипом і розробляти нові маркери в цільовій ділянці. На новому етапі точного картування з використанням доступних рекомбінантів цільова ділянка була зменшена до двох нових фланкуючих маркерів, що охоплюють ділянку послідовності 26484 п.о. у стійкого та 39587 п.о. у чутливих генотипів. Зменшена цільова ділянка містить лише 9 анотованих генів. Серед цих генів три тандемно повторювані гени LRR були ідентифіковані як потенційні причинні гени-кандидати для стійкості до NRBMH (LRR1, LRR2 та LRR3 (фігура 1)). Цільова ділянка демонструє високий рівень складності: а) стійка послідовність містить велику дуплікацію послідовності; б) гени LRR демонструють подібність послідовностей; с) у чутливих генотипах кілька ретротранспозонів вбудовані в цільову ділянку. Зважаючи на складність послідовності збірка послідовностей RR та ss була дуже трудомісткою і дуже складною процедурою.

У межах зменшеної цільової ділянки було виявлено п'ять рекомбінацій, і 180 нащадків цих рекомбінантів були фенотиповані. Фенотипи визначалися за допомогою інтенсивних статистичних методів (t-критерій, ступеневий аналіз). Вибірка, що складається з 10 рослин на відсоток збігів, серед цих п'яти рекомбінантів була проаналізована з використанням специфічних домінантних маркерів, розроблених для трьох генів LRR. Вдалося протестувати на функціональність три гена LRR. Ген LRR1 як приблизний результат не показує жодних суперечливих даних в жодному з рекомбінантів, тобто всі рекомбінанти, що несуть ген LRR1, є стійкими.

Процес "клонування на основі карти" включав наступні етапи: генетичне точне картування, фізичне картування, аналіз послідовності WHG (всього геному), побудова декількох великих сегрегуючих популяцій, рекомбінантний скринінг, розробка маркера в цільовій ділянці, порівняльне секвенування ВАС в стійкому генотипі, аналіз послідовностей стійкого та чутливого генотипу, біоінформатичні аналізи, прогнозування білків, порівняння білків. Наступні етапи мали вирішальне значення для даного винаходу: точне картування у поєднанні з інтенсивним фенотипуванням, ідентифікація та секвенування стійких клонів ВАС, розробка домінантних маркерів для трьох генів LRR, аналіз послідовностей, та порівняння послідовностей і білків між RR (стійкими) та ss (чутливими) генотипами.

Приклад 3: Введення гена, що надає стійкість, як трансген за допомогою трансформації гена в *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*

Трансгенний підхід до отримання рослин, стійких до *Heterodera*, застосовувався не тільки для альтернативної перевірки гена (генів) LRR як гена (генів), що надає (надають) стійкість, але і як засіб отримання трансгенних подій стійкості, які надають нову стійкість до *Heterodera* або покращують вже існуючу стійкість до *Heterodera*.

Ген LRR, який представляє інтерес, був клонований в бінарний вектор pZFN-nptII (фігура 2) за допомогою наступних стандартних процедур клонування: всередині Т-ДНК цього вектора була клонована кДНК гена стійкості між дуплікованим промотором CaMV 35S і термінатором нопалінсинтази (NOS), з метою забезпечення високого конститутивного рівня експресії гена стійкості у трансгенній рослині. Крім того, Т-ДНК включає ген неоміцинфосфотрансферази II (nptII), який надає стійкість до ряду аміноглікозидних антибіотиків, таких як канаміцин або паромоміцин. Ці стійкості до антибіотиків були використані для відбору трансгенних рослинних клітин та тканин. Промотор NOS і термінатор pAG7 фланкують ген nptII. Крім того, кістяк бінарного вектора містить джерело ColE1 та pVS1 для реплікації плазміди в *Escherichia coli* або *Agrobacterium tumefaciens*. Ген aadA надає стійкості до стрептоміцину/спектиноміцину для відбору бактерій. Плазмиду pZFN-nptII-LRR трансформували в штамі агробактерії AGL-1 за допомогою стандартної процедури.

Трансформацію цукрового буряка проводили відповідно до Lindsey & Gallois (1990 p.), *Transformation of sugarbeet (Beta vulgaris) by Agrobacterium tumefaciens*, *Journal of experimental botany*, 41.5, стор. 529-536). Для цього як вихідний матеріал використовували "мікророзмножені пагони" генотипу 04E05B1DH5, який несе виключно чутливі алелі ідентифікованого гена. Пагони розмножували у відповідному середовищі відповідно до Lindsey & Gallois (1990 p.). З метою індукції максимально великої кількості меристем, "пагони" переносили в інше середовище (див. Lindsey & Gallois (1990 p.)) і інкубували в темному місці протягом декількох тижнів при температурі приблизно 30 °C. Штам агробактерії AGL-1 з вектором pZFN-nptII-LRR культивували у додатковому середовищі (див. Lindsey & Gallois (1990 p.)), додатково

забезпеченою відповідними антибіотиками для відбору. Зрізи меристемної тканини на основі пагіна, що обробляється, інкубували з агробактерією протягом декількох годин у додатковому середовищі (див. Lindsey & Gallois (1990 p.)). Експлантати рослин та агробактерії спільно культивували в темному місці протягом щонайменше 2 днів у середовищі (див. Lindsey & Gallois (1990 p.)), а потім інокульовані експлантати інкубували в темному місці протягом приблизно 2 тижнів у додатковому середовищі (див. Lindsey & Gallois (1990 p.)). Після цього експлантати були розмножені додатково в додатковому середовищі (див. Lindsey & Gallois (1990 p.)) і субкультивовані з метою забезпечення можливості відбору трансгенної тканини. Потім листовий матеріал екстрагували із зелених зростаючих "пагонів" і досліджували за допомогою ПЛР на наявність трансгену. Відповідні "пагони" були вкорінені і згодом перенесені в теплицю для отримання насіннєвого матеріалу T1. Стійкість до *Heterodera* в рослинах T1 може бути протестована згодом за допомогою протоколу, описаного в прикладі 1. Результати наведено у табл. 1–3.

Таблиця 1:

Лінія	Генотип	Кількість цист, підрахованих на промитому корінні кожної окремої рослини																												Σ рослин	середня кількість цист	Σ рослин не більше ніж з 30 цистами
A	чутливий гібрид	78	83	70	63	61	42	46	53	58	57	70	23	54	37	59	43	50	72	45	33	35							21	54	1	
B	гомозиготна стійка лінія – зразок	7	16	18	11	13	21	14	12	17	16	24	23	13	17	7	14	7	11	12	11								20	14	20	
C	контроль трансформації	8	35	46	26	41	25	23	41	31	61	45	48	38	28	33	47	55	18	13	42	13	29						25	34	8	
D	контроль трансформації	47	38	21	9	29	24	24	10	34	32	35	41	40	33	19	30	44	50	53	34	49	38	47	52	31		25	34,5	8		
E	контроль трансформації	36	>60	40	25	48	6	45	54	>60	50	44	>60	53	44	30	58	53	40	43	44	22	17	26	34	45		25	-	6		
F	контроль трансформації	31	34	37	24	34	17	29	25	29	48	34	23	34	34	42	41	43	47	40	32	27	28	24	53		25	34	9			
G	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 2	21	14	5	16	1	12	3	19	0	0																	10	-	10		
H	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 2	33	8	36	45	3	23	51	9	16	5	1	39	22	15	43	19	23	22	11	19	43	20	23	16	25		25	-	18		
I	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 2	33	24	20	25	24	23	42	25	22	24	15	31	17	10	10	17	19	22	14	34	24	20	21	21		25	-	20			
J	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 2	19	22	30	11	14	13	14	36	18	38	6	7	24	15	3	20	25	18	17	17	6	19	20	14	6		25	-	23		
K	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 2	20	10	28	8	5	25	3	5	7	5	11	7	9	17	31	15	11	3	40								19	-	17		
L	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	46	36	36	>60	60	58	29	44	43	21	25	28	13	38	42	34	41	0	8	33	16	5	18	38	34		25	-	10		
M	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	>60	54	19	30	56	24	>60	30	44	>60	34	40	>60	18	16	39	>60	>60	51	>60	>60	45	22				25	-	7		
N	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	26	28	36	32	45	27	30	57	44	58	1	18	>60	37	46	>60	19	39	14	19	58	18	32	16	14		25	-	12		
O	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	53	27	30	26	31	41	37	38	34	22	50	17	52	14	46	43	34										17	-	6		
P	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	26	1	31	31	16	28	51	11	9	32	23	47	8	48	30	18	28	51	53	49	44	50	50	46	14		25	-	12		
Q	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	17	46	12	49	19	12	5	3	34	42	9	2	37	2	7	12	9	4									18	-	13		
R	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	34	44	31	21	>60	>60	57	42	54	61	42	>60	48	38	>60	19	39	14	19	58	18	32	16	14			25	-	7		
S	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	32	22	31	6	24	50	29	18	17	6	14	12	58	18	10	25	19	39	15	11	22	24	14			25	-	18			
T	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	19	13	61	22	38	9	37	42	49	55	17	58	39	34	25	29	51	22	>60	53	20	13	29			25	-	11			
U	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	36	56	39	43	43	40	28	21	18	21	16	5	9	20	13	36	11	12	34	23	39	19	18	30	13		25	-	16		
V	сегрегуюча	35	34	47	21	23	33	16	13	25	48	54	35	24	14	26	36	27	35	43	63	33	24	39				25	-	10		

[illegible]

Оскільки нематоди вражають кореневу тканину, до аналізу, показаного у таблицях, були включені лише рослини, які показували типовий розвиток коренів. Сегрегуючі рослини є самовідтворення гетерозиготних трансгенних регенерантів. Очікувана фенотипічна сегрегація становить 3 (стійких) до 1 (чутливого). Рослини з 30 або менш цистами вважаються фенотипно стійкими, і відповідні значення в табл. 1 виділено жирним шрифтом. Оскільки слід очікувати певного стандартного відхилення, для статистичної оцінки було отримано досить велику кількість ліній та окремих особин.

Таблиця 2

Лінія	Генотип	Співвідношення рослин не більше ніж з 30 цистами (рослин із стійким фенотипом) щодо загальної кількості рослин [%]
A	чутливий гібрид	4,8
B	гомозиготна стійка лінія – зразок	100
C	контроль трансформації	32
D	контроль трансформації	32
E	контроль трансформації	24
F	контроль трансформації	36
G	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 2	100
H	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 2	72
I	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 2	80
J	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 2	92
K	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 2	89
L	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	40
M	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	28
N	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	48
O	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	35
P	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	48
Q	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	72
R	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	28
S	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	72
T	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	44
U	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	64
V	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	40
W	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	56
X	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	68
Y	сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	80

10

У табл. 2 показаний відсоток рослин не більше ніж з 30 цистами, які вважаються фенотипно стійкими рослинами. Лінія А є типово чутливою лінією, і лише 4,8 % протестованих особин показали стійкий фенотип. Лінія В є лінією, відомою своєю гарною стійкістю. 100 % протестованих особин лінії В показали стійкий фенотип. Оскільки тільки певні лінії адаптовані до застосування для генетичної трансформації, лінії, використовувані для перетворень, також були протестовані на стійкість (в нетрансгенному стані): протестовані чотири лінії С-Е показали 24-36 % фенотипічно стійких особин.

Таблиця 3

Генотип	Середнє співвідношення рослин, що демонструють стійкий фенотип по всіх лініях [%]
чутливий гібрид	4,8
гомозиготна стійка лінія – зразок	100
контроль трансформації	31
сегрегуюча конструкція SEQ ID № 2	86,6
сегрегуюча конструкція SEQ ID № 5	51,6
конструкція SEQ ID № 2 з поправкою на сегрегацію	~ 100
конструкція SEQ ID № 5 з поправкою на сегрегацію	~ 86,6

- 5 Внаслідок сегрегації статистично очікується, що 25 % трансформантів не є носіями гена стійкості. Зважаючи на це, значення 75 % фенотипно стійких рослин буде дорівнювати 100 % стійкості, що надається відповідним трансгеном. Отже, останні два рядки табл. 3 показують статистично скориговані значення (множення на коефіцієнт 1,33). Значення табл. 3 показують значне збільшення кількості рослин, що мають стійкий фенотип, після трансформації SEQ ID № 2 і SEQ ID № 5 порівняно з контрольною групою трансформації

10 Перелік послідовностей

<110> КВС СААТ СЕ ЕНД КО. КГАА

<120> ГЕН СТІЙКОСТІ ДО ПАТОГЕНУ РОДУ HETERODERA

<130> KWS0271PCT

<160> 87

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4327

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 1

atggcagctg aagcaggtaa tgtcaaatatc ttttggtcat ttcttagaga agcgggaagtg 60

gaggtatccc gcgtatatga tgacggttac ctgtttttgg aggaggatcc agtggcatgg 120

attcaaagtc accctgctgc tgctgatcgt ctctctgtgc gaatcttaga gttgaaattg 180

gggctgaatg gtgtggagaa gataacagac atgatatagg agctgtctga gctcactcac 240

ctctatgtct atttgtgtca taacctgat tgtttgcctg acaccatcac aaggctgtcc 300

aaattaccag aaaatttgga agagctggag agccttacc atctctctct tccttattgt 360

gtagatatca agtcccttcc taatagtctt gcaaacctat ccaacttgac gactttggat 420

cttattggat gccattccct tacagaattg cctccaaatt tgaatgtgt acacctcatt 480

attaaacgtt gctgcaaaat caaggccctt cctacaggtt taaataacct ggccagctta 540

catctcaaac aatgtaacta ttgtcttgcc aatttaaagc actcgctcaa cctacgccac 600

ctcacccttc agagttgcga ttttcattct cagctgacg ttatagaatt cctgccaaat	660
ttggatgagc tgctacaatt atctcttctt gatatccagg ataccaaat cagatatctt	720
ccttgagca tcacaaagct actcaatttg aaatttctat gtctccctcg gggttttata	780
ctcgaaacac taccatatca tctgaatgat tccgtcatca tttatatgaa ggattgtcac	840
gatcgcaaaa ctggaaaga actcaaaaca gagattcaag gtaagtgtt cgcctattta	900
tctcacgaat tattgtttca tgttcgcttc tcttccggca gggccgtctt gaagattttg	960
ggggccggat tctaactga aaattgggcc cctaaattta tagaaaataa agatggaaga	1020
ttaaagttct aaagatggaa agttgaaaat gaagataaat cattgacaaa tttattatag	1080
gtgggaaaca aggggtgattt cttcaaataa aaagtaaaat tttcaaaaca atatattttg	1140
gggcctttat aattttggag gccatgtgca attgggctct ttgcacaccc tcatctaccc	1200
ctctgtcttc cggtaaatag caaatagcaa atagcatcgc cctcttttta tcgcaatatg	1260
caaacatggg aaagttatat ttcaaatgta tatattcata attcaagcat tgttgtttca	1320
tgttctcctt tctataccaa aatgtttgtt tgtcctccta atccaagtcc aaccaattat	1380
gcaaataagg aaagattaga ttcagactat atataataat gttaatatat tttcctgttc	1440

ttcaatttta tttcttaatt atcttcctct ttgtcctcct ccagtggata atttgggaat	1500
atcaatgtct gtacctcgga actcctcttg ttacctttgg ttggactcca acaagagcct	1560
acatccatgg ctgcagaata attacgattt tcaaccgtct gtgaaattcc tcgatttaaa	1620
ttttttggat gatgagtttg gagatctcac gttgctgaaa gagctcacac atgtgacaca	1680
tctctatatt tctggtcatg tagacctctg ccgcctccct gacacactca caaatattac	1740
ccatctctct cttcatactg aagatgacac tgatgattca ttgattcct ttcttgatag	1800
gctggcagag ccatcaaact tggatatctt agatgtagat cttagtgaat catacttgcc	1860
gtcaaacatc catcaattcg tcaaccttaa atgtctcact gtaagatatg ccaacagcaa	1920
gccattagta cctgataact gggaaaagct atctaatttg aaatcttttg ttctctatac	1980
atgttataat gtatcattgc caacacattt gaatctcact aacctcaagc ttttcaattg	2040
ctttttcgag aatgtcagct tactacctac aagtctacac cgcctagaat tattgcatag	2100
caacgactat tgcagtcctt ttgctgtga tgacggggat tgtagtgaag agcctatact	2160
atgcttgaat cagtttgta acctagagac gctctctata acatgttacg agtacactgg	2220

cacccgactt cccagcatag caggactacg caacttgaaa gaattacaac ttaaggattg	2280
tttcggcctc aaagaattac ccccagattt ggatgagcta gtggaattat ccatttctca	2340
tatcagcggc accagagtca agtcctttcc tgattgcatc acaaagctac aaaagttgaa	2400
acacgtagtc ctgcccaagt gcttcaaaaa ggaaaattta cccaataatt caaaaacgaa	2460
gtacaccact gatgacacgg atgaagaata ctacaagcat agaggctatt atagtagtga	2520
atatgaaacc tcaaatataa cctctgatga aagtaatgag atcacagtag tagattctgc	2580
agaggtagcc gacaaagtgg tticagaata ttcacaggaa ggcatcattt cgcagcagat	2640
atcatcacc ccaactcctga gtatacctaa tgctaatacag tttcttgag gtacgtgctt	2700
ctactatttc agaaatcatt gtgtggagta cattgcaatt cttctatctt aaaatcagaa	2760
tctaattgtc aaatgatcaa ggtagtgtgc ttccaagttc caacactcct taacccatt	2820
aatggggtct gatagagttt gtttcattat attaaacttt attgcgtggg tttgaatatt	2880
aagttttttt atacaagcag atactcattt caatggtaga agcaatacga tgggcgagaa	2940
ttcacaagtt caagagatgg aaacttcac tacaggactc aattcaaata caaatgaaat	3000
aaatgtcacc gaccagatgt tggaattcct atttggaac tcacatttg attttgggca	3060

catttcttat agtgatgtga ctaatatga tcgtgttgag aataacgac atgcttcaga	3120
atatacgtag aacaacgaga atccaccaag tgatgagaac cagggaaga gacagaaga	3180
ggagattact catgagaaaa atccatgtct gatggataaa aacatgacac atgaggagct	3240
aggcggtagt ttttatcctt taaaaagtat tttctcagtt ctcttttaaa ttcagaagta	3300
tatcgtgata tgcttactgt gactggtgat tatcaactat ttaaaaagca aagtttgatt	3360
ttgacaagaa taaatgggaa ctccattaat ttaaaagatt ctgcttttgg tgccaataga	3420
atttaacac aatggaggag aggatgcagt ttatgagatc agtcacagcg cttcttgagg	3480
ttcaccggac caagacatgg agaatatgcc tgtaggaaat gataaagatt caacatccac	3540
catagttcgc cgagggaac gtaacaaaat agagttaat ttgactagag aggaacttga	3600
atcatactgg tccagaaaca tgacggtaga agatgttgca aaagacatag gtggtatgtt	3660
tccattctct acaaaactata cggatcattca ctgcatttaa ttgatagatg catttgatgt	3720
tatatgattc attccagtgt caaggtctac atttaaagc tggttgaagg cctccggtat	3780
taaatggcaa acaagcagga tttcgaaaag tcaatgtgcc aacaacaaga ataccaatac	3840

tgcatcattc tctggaagta aacctgcaga ggtcaactgt catgaacatg cacctgagtg	3900
tttaagtgat gcaaatgaat gtgatgtcgt taacaactta acccttgctg tgacaatgga	3960
tactgaggaa gagcctggag tagcaacgca atgcatagc aatggtagca aacaggcctc	4020
tgacactctg gtgggtgcag atcagggtac tcaacaagag agtccaagtt taagcaaaat	4080
catttgtaaa gccacttaca aagatgatac tgttagattt catatctctt caactgctag	4140
tttccatgaa ctagaaaaag aagtggcaaa aaatctaaaa ctcaagctaa gcaaatttaa	4200
aataaaatat caagatgagg acaaagagtt gatgctaatt accttgact ctcacttgaa	4260
ggaacttctc gatctttcaa aatcatctgg tagcaaaatt gttcggttgt taatatttga	4320
tttgtga	4327

<210> 2

<211> 3255

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> кДНК LRR2 (БЛП2)

<400> 2

atggcagctg aagcaggtaa tgtcaaatac tgttggtcat ttcttagaga agcggaagtg	60
gaggatcccc gcgtatatga tgacggttac ctgtttttgg aggaggatcc agtggcatgg	120
attcaaagtc accctgctgc tgctgatcgt ctctctgtgc gaatcttaga gttgaaattg	180
gggctgaatg gtgtggagaa gataacagac atgatagagg agctgtctga gctcactcac	240
ctctatgtct atttgtgtca taacctgat tgtttgcctg acaccatcac aaggctgtcc	300
aaattaccag aaaatttggg agagctggag agccttacct atctctctct tccttattgt	360
gtagatatca agtcccttcc taatagtctt gcaaacctat ccaacttgac gactttggat	420
cttattggat gccattccct tacagaattg cctccaaatt tgaatgttgt acacctcatt	480
attaaacgtt gctgcaaaat caaggccctt cctacagggt taaataacct ggccagctta	540
catctcaaac aatgtaacta ttgtcttgcc aatttaaagc actcgctcaa cctacgccac	600
ctcacccttc agagttgcca ttttcattct cagctgacg ttatagaatt cctgccaaat	660
ttggatgagc tgctacaatt atctcttctt gatatccagg ataccaaat cagatatctt	720
ccttgagaca tcacaaagct actcaatttg aaatttctat gtctccctcg gggttttata	780

ctcgaaacac taccatatca tctgaatgat tccgtcatca tttatatgaa ggattgtcac	840
gatcgcaaaa ctgggaaaga actcaaaaca gagattcaag tggataattt gggaatatca	900
atgtctgtac ctcggaactc ctcttgttac ctttggttgg actccaacaa gagcctacat	960
ccatggctgc agaataatta cgattttcaa ccgtctgtga aattcctcga tttaaatttt	1020
ttggatgatg agtttgaga tctcacgttg ctgaaagagc tcacacatgt gacacatctc	1080
tatatttctg gtcattgaga cctctgccgc ctccctgaca cactcacaaa tattacccat	1140
ctctctcttc atactgaaga tgacactgat gattcatttg attcctttct tgataggctg	1200
gcagagccat caaacttggg atcttttagat gtagatctta gtgaaacata cttgccgtca	1260
aacatccatc aattcgtcaa ccttaaatgt ctactgtaa gatatgcaa cagcaagcca	1320
ttagtacctg ataactggga aaagctatct aatttgaaat ctttggttct ctatacatgt	1380
tataatgtat cattgccaac acatttgaat ctactaacc tcaagctttt caattgcttt	1440
ttcgagaatg tcagcttact acctacaagt ctacaccgcc tagaattatt gcatagcaac	1500
gactattgca gtgccttttg ctgtgatgac ggggattgta gtgaagagcc tatactatgc	1560
ttgaatcagt ttgtcaacct agagacgctc tctataacat gttacgagta cactggcacc	1620

cgacttccca gcatagcagg actacgcaac ttgaaagaat tacaacttaa ggattgtttc	1680
ggcctcaaag aattaccccc agatttggat gagctagtgg aattatccat tctcaatatc	1740
agcggtagca gagtcaagtc ctttcctgat tgcatacaca agctacaaaa gttgaaacac	1800
gtagtcctgc ccaagtgctt caaaaaggaa aatttaccca ataattcaaa aacgaagtac	1860
accactgatg acacggatga agaatactac aagcatagag gctattatag tagtgaatat	1920
gaaacctcaa atataacctc tgatgaaagt aatgagatca cagtagtaga ttctgcagag	1980
gtagccgaca aagtggtttc agaataattca caggaaggca tcatttcgca gcagatatca	2040
tcacccaac tcctgagtat acctaagtct aatcagtttc ttggagatac tcatttcaat	2100
ggtagaagca atacgatggg cgagaattca caagttcaag agatggaaac ttcactaca	2160
ggactcaatt caaatacaaa tgaaataaat gtcaccgacc agatgttgga attcctattt	2220
gggaactcat catttgattt tgggcacatt tcttatagt atgtgactaa tattgatcgt	2280
gttgagaata acgatcatgc ttcagaatat acgcagaaca acgagaatcc accaagtgat	2340
gagaaccagg gaaagagaca gaagaaggag attactcatg agaaaaatcc atgtctgatg	2400

gataaaaaca tgacacatga ggagctaggc gaatttaatc acaatggagg agaggatgca	2460
gtttatgaga tcagtcacag cgcttcttgc ggttcaccgg accaagacat ggagaatatg	2520
cctgtaggaa atgataaaga ttcaacatcc accatagttc gccgaggga acgtaacaaa	2580
atagagttaa atttgactag agaggaactt gaatcatact ggtccagaaa catgacgta	2640
gaagatgttg caaaagacat aggtgtgtca aggtctacat ttaaagctg gttgaaggcc	2700
tccggtatta aatggcaaac aagcaggatt tcgaaaagtc aatgtgcaa caacaagaat	2760
accaatactg catcattctc tggaagtaaa cctgcagagg tcaactgtca tgaacatgca	2820
cctgagtgtt taagtgatgc aaatgaatgt gatgtcgtta acaacttaac cttgctgtg	2880
acaatggata ctgaggaaga gcctggagta gcaacgcaat gccatagcaa tggtagcaaa	2940
caggcctctg acactctggt gggtgcagat cagggtactc aacaagagag tccaagtta	3000
agcaaaatca ttgtgaaagc cacttacaaa gatgatactg ttagatttca tatctcttca	3060
actgctagtt tccatgaact agaaaaagaa gtggcaaaaa atctaaaact caagctaagc	3120
aaatttaaaa taaaatatca agatgaggac aaagagttga tgctaatac cttggactct	3180
cacttgaagg aacttctcga tctttcaaaa tcatctggtg gcaaaattgt tcggttgta	3240

atatttgatt tgtga

3255

<210> 3

<211> 1084

<212> ПРТ

<213> Буряк звичайний

<400> 3

Met Ala Ala Glu Ala Gly Asn Val Lys Tyr Cys Trp Ser Phe Leu Arg

1 5 10 15

Glu Ala Glu Val Glu Val Ser Arg Val Tyr Asp Asp Gly Tyr Leu Phe

20 25 30

Leu Glu Glu Asp Pro Val Ala Trp Ile Gln Ser His Pro Ala Ala Ala

35 40 45

Asp Arg Leu Ser Val Arg Ile Leu Glu Leu Lys Leu Gly Leu Asn Gly

50 55 60

Val Glu Lys Ile Thr Asp Met Ile Glu Glu Leu Ser Glu Leu Thr His
65 70 75 80

Leu Tyr Val Tyr Leu Cys His Asn Leu Asp Cys Leu Pro Asp Thr Ile
85 90 95

Thr Arg Leu Ser Lys Leu Pro Glu Asn Leu Glu Glu Leu Glu Ser Leu
100 105 110

Thr His Leu Ser Leu Pro Tyr Cys Val Asp Ile Lys Ser Leu Pro Asn
115 120 125

Ser Leu Ala Asn Leu Ser Asn Leu Thr Thr Leu Asp Leu Ile Gly Cys
130 135 140

His Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Asn Leu Asn Val Val His Leu Ile
145 150 155 160

Ile Lys Arg Cys Cys Lys Ile Lys Ala Leu Pro Thr Gly Leu Asn Asn
165 170 175

Leu Ala Ser Leu His Leu Lys Gln Cys Asn Tyr Cys Leu Ala Asn Leu
 180 185 190

Lys His Ser Leu Asn Leu Arg His Leu Thr Leu Gln Ser Cys Asp Phe
 195 200 205

His Ser His Ala Asp Val Ile Glu Phe Leu Pro Asn Leu Asp Glu Leu
 210 215 220

Leu Gln Leu Ser Leu Leu Asp Ile Gln Asp Thr Lys Ile Arg Tyr Leu
 225 230 235 240

Pro Trp Ser Ile Thr Lys Leu Leu Asn Leu Lys Phe Leu Cys Leu Pro
 245 250 255

Arg Gly Phe Ile Leu Glu Thr Leu Pro Tyr His Leu Asn Asp Ser Val
 260 265 270

Ile Ile Tyr Met Lys Asp Cys His Asp Arg Lys Thr Trp Lys Glu Leu
 275 280 285

Lys Thr Glu Ile Gln Val Asp Asn Leu Gly Ile Ser Met Ser Val Pro
 290 295 300

Arg Asn Ser Ser Cys Tyr Leu Trp Leu Asp Ser Asn Lys Ser Leu His
 305 310 315 320

Pro Trp Leu Gln Asn Asn Tyr Asp Phe Gln Pro Ser Val Lys Phe Leu
 325 330 335

Asp Leu Asn Phe Leu Asp Asp Glu Phe Gly Asp Leu Thr Leu Leu Lys
 340 345 350

Glu Leu Thr His Val Thr His Leu Tyr Ile Ser Gly His Val Asp Leu
 355 360 365

Cys Arg Leu Pro Asp Thr Leu Thr Asn Ile Thr His Leu Ser Leu His
 370 375 380

Thr Glu Asp Asp Thr Asp Asp Ser Phe Asp Ser Phe Leu Asp Arg Leu

385 390 395 400

Ala Glu Pro Ser Asn Leu Val Ser Leu Asp Val Asp Leu Ser Glu Thr

405 410 415

Tyr Leu Pro Ser Asn Ile His Gln Phe Val Asn Leu Lys Cys Leu Thr

420 425 430

Val Arg Tyr Ala Asn Ser Lys Pro Leu Val Pro Asp Asn Trp Glu Lys

435 440 445

Leu Ser Asn Leu Lys Ser Leu Val Leu Tyr Thr Cys Tyr Asn Val Ser

450 455 460

Leu Pro Thr His Leu Asn Leu Thr Asn Leu Lys Leu Phe Asn Cys Phe

465 470 475 480

Phe Glu Asn Val Ser Leu Leu Pro Thr Ser Leu His Arg Leu Glu Leu

485 490 495

Leu His Ser Asn Asp Tyr Cys Ser Ala Phe Cys Cys Asp Asp Gly Asp
 500 505 510

Cys Ser Glu Glu Pro Ile Leu Cys Leu Asn Gln Phe Val Asn Leu Glu
 515 520 525

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Tyr Glu Tyr Thr Gly Thr Arg Leu Pro Ser
 530 535 540

Ile Ala Gly Leu Arg Asn Leu Lys Glu Leu Gln Leu Lys Asp Cys Phe
 545 550 555 560

Gly Leu Lys Glu Leu Pro Pro Asp Leu Asp Glu Leu Val Glu Leu Ser
 565 570 575

Ile Leu Asn Ile Ser Gly Thr Arg Val Lys Ser Phe Pro Asp Cys Ile
 580 585 590

Thr Lys Leu Gln Lys Leu Lys His Val Val Leu Pro Lys Cys Phe Lys
 595 600 605

Lys Glu Asn Leu Pro Asn Asn Ser Lys Thr Lys Tyr Thr Thr Asp Asp
610 615 620

Thr Asp Glu Glu Tyr Tyr Lys His Arg Gly Tyr Tyr Ser Ser Glu Tyr
625 630 635 640

Glu Thr Ser Asn Ile Thr Ser Asp Glu Ser Asn Glu Ile Thr Val Val
645 650 655

Asp Ser Ala Glu Val Ala Asp Lys Val Val Ser Glu Tyr Ser Gln Glu
660 665 670

Gly Ile Ile Ser Gln Gln Ile Ser Ser Pro Gln Leu Leu Ser Ile Pro
675 680 685

Asn Ala Asn Gln Phe Leu Gly Asp Thr His Phe Asn Gly Arg Ser Asn
690 695 700

Thr Met Gly Glu Asn Ser Gln Val Gln Glu Met Glu Thr Ser Ser Thr
705 710 715 720

Gly Leu Asn Ser Asn Thr Asn Glu Ile Asn Val Thr Asp Gln Met Leu
725 730 735

Glu Phe Leu Phe Gly Asn Ser Ser Phe Asp Phe Gly His Ile Ser Tyr
740 745 750

Ser Asp Val Thr Asn Ile Asp Arg Val Glu Asn Asn Asp His Ala Ser
755 760 765

Glu Tyr Thr Gln Asn Asn Glu Asn Pro Pro Ser Asp Glu Asn Gln Gly
770 775 780

Lys Arg Gln Lys Lys Glu Ile Thr His Glu Lys Asn Pro Cys Leu Met
785 790 795 800

Asp Lys Asn Met Thr His Glu Glu Leu Gly Glu Phe Asn His Asn Gly
805 810 815

Gly Glu Asp Ala Val Tyr Glu Ile Ser His Ser Ala Ser Cys Gly Ser

820

825

830

Pro Asp Gln Asp Met Glu Asn Met Pro Val Gly Asn Asp Lys Asp Ser

835

840

845

Thr Ser Thr Ile Val Arg Arg Gly Lys Arg Asn Lys Ile Glu Phe Asn

850

855

860

Leu Thr Arg Glu Glu Leu Glu Ser Tyr Trp Ser Arg Asn Met Thr Val

865

870

875

880

Glu Asp Val Ala Lys Asp Ile Gly Val Ser Arg Ser Thr Phe Lys Arg

885

890

895

Trp Leu Lys Ala Ser Gly Ile Lys Trp Gln Thr Ser Arg Ile Ser Lys

900

905

910

Ser Gln Cys Ala Asn Asn Lys Asn Thr Asn Thr Ala Ser Phe Ser Gly

915

920

925

Ser Lys Pro Ala Glu Val Asn Cys His Glu His Ala Pro Glu Cys Leu
 930 935 940

Ser Asp Ala Asn Glu Cys Asp Val Val Asn Asn Leu Thr Leu Ala Val
 945 950 955 960

Thr Met Asp Thr Glu Glu Glu Pro Gly Val Ala Thr Gln Cys His Ser
 965 970 975

Asn Gly Ser Lys Gln Ala Ser Asp Thr Leu Val Gly Ala Asp Gln Gly
 980 985 990

Thr Gln Gln Glu Ser Pro Ser Leu Ser Lys Ile Ile Val Lys Ala Thr
 995 1000 1005

Tyr Lys Asp Asp Thr Val Arg Phe His Ile Ser Ser Thr Ala Ser
 1010 1015 1020

Phe His Glu Leu Glu Lys Glu Val Ala Lys Asn Leu Lys Leu Lys
 1025 1030 1035

Leu Ser Lys Phe Lys Ile Lys Tyr Gln Asp Glu Asp Lys Glu Leu
 1040 1045 1050

Met Leu Met Thr Leu Asp Ser His Leu Lys Glu Leu Leu Asp Leu
 1055 1060 1065

Ser Lys Ser Ser Gly Ser Lys Ile Val Arg Leu Leu Ile Phe Asp
 1070 1075 1080

Leu

<210> 4

<211> 8671

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 4

atggtttctg cgggtgtaat tcgttttgta gctgggatta ttgtaagta tattcacaaa 60

ctatcttgct ctattaaatt acaaataaga aaaatgaagt atttattctt caacgaatgt 120

aatatgttct aacttatatg tattaatttc tttccttgca atattgtaat taataaagtt	180
ggtttatttt ggtttgcagg taatatgaca gcttttttct tattcttgtc tccagtgtaa	240
gttattcatg atggatttgc ttcgtactat attcatgtgc ataatttaca atatatgaag	300
atgaagctat ataatgtgta cccctctctt gcttatgcaa tggaaggaat cattattatt	360
cattatagta ggtatttatg aaaattctat aatttggagt acagatttgt aataaaaaga	420
tttaactaa tgaattcaat caaaagctta agctgatggt tagagtccca cgaatagttt	480
tatactctat cacaccccc tcacgcgaga tcccattgag cttaaagtgt ggatgtagcg	540
taggtctccc tcatactaga catattccac ttagaaagaa ggggtggacg agatttgaac	600
ccgtgacatt tatgtcacgt tggctctgat accatgtcaa aggaccaact caaccaagag	660
cttaagctta tggttggaga ctggagtccc aaaaatagtt ttatactatg tcggttatat	720
ttgcacatga ttttcattct tgctttccat cttttaggcc aacattcatc ggaatatgca	780
agaagaagac ggtggaacaa tactcgccag tgccatactt agccacattt gtgaattgca	840
tgctttgggt tgtgtatggt ctgcctatta ttcaccctaa tagcatttta gtggtgacaa	900
tcaatggagc tgggtttttt attgaactgc tttacttgat actcttcgtg ctttactctg	960

acaaaaagaa taggctcaaa attgtgttga ttgcaattat tgagatcgta attgtgggaa	1020
ttatgactac cttggtcctc aactttgttc atactaccaa gcgtaggtct tcaattgtg	1080
gtatgattgc catcatatgt aacatcatga tgtatgcctc tcctttatcc gtcttggtaa	1140
ttatgcttaa ttaatctccc tttctcttta ctacttgcta acaagtagc ggaactagaa	1200
ttattttcta aattacttaa tatttcctcc gtttcaaatt aaatgcaaca gcttctaaaa	1260
acgacagttt caaattaaat gcaacgtttt acttctttct attcttggtg aagacttttt	1320
agtgtgaaat tacagatata accttactaa aacaaattaa gcgttattaa cttagtcaca	1380
tgtccttact ttttcttaat ctcacctaag aagttttgcc taagagaatg tatcatctaa	1440
atcgttacat ttaatttggg acagaggaaa taatataaat ccctaatttt gtgtttttgg	1500
acagaaattg gtgataacaa caaaaagcgt ggaatacatg ccgttatctt tatcaattgc	1560
ttcatttgct aatggcattg catggacagt ctatgctttg tatcctttcg atccttacat	1620
tgccgtaagc ctccctttga cccttaaatt gcaaataaat tacatattgc aagttctaag	1680
atttttattg ttgtgaataa atttgacatg ctaattatta gattcctcgt tctattagct	1740

tatattgtgt atgtgtagta ttgcatctac caaaatatcc ttctaaattc acaaatcaat	1800
gcataatcaa aaatattaaa tcatataaaa gaaaatcaac catgcaggta gatattgttg	1860
tatagcgata tattttactt aatttaagac gtttgatgaa ttttttttcg ctacagtatg	1920
ttactctcat tatatacttc gttcgtttcg ttttaaatgc acaaagcgg tattttttat	1980
gagatataaa atattttattc gttgcattta aaacgaaacg gaagaagtaa tcagaaaaga	2040
ctagtaaata gtacgagcta aagaaaatgg cttttgtttt acaacacagg caccaaattg	2100
gctgggtaca ctatttgtag tgggtccaact gattctgtat gcaacatact acaagtccac	2160
aaaagagcag atggcagcaa gaaaagccaa aaatgcagtg ggcctgactg aagttgtctt	2220
caacggagac tctggaaaaa tgggccaagt accacataat agtcgggccc aaatcccttg	2280
aagcccaatc caatttttagc tcatgggttc ccaagctcac cggctgac aaattccttt	2340
ttttcctttt tcttgcttct catgaattct ctttactatt atcaaccaat aaaacatgga	2400
gtcatttatg gaattttttt ttttctttt gttgaataga attattaact gaaataatgt	2460
tgttttgtca tctataatct cgattagttt tagcttaatg acaagatatt gaatggtctt	2520
tggattgaac ggttgattaa tgatatactt cttccgtttt gaattactcc gttatttatt	2580

tatgagattt gaccatatat tatttacaat tagataaaat caaatgttat aatgtaatat	2640
gttggttgat tgtctcaatg tatattttca taaaatcaaa ttttggtgt cccccctct	2700
tcccttatat aatagagatg attcgaattc aacaatattg ctatataatt aaattgtttg	2760
cctcgaagtt acgaacttaa aattgaacaa atcaatctat ttcaactttc aagcatagaa	2820
agttgaaata cagaacaaaa caagtcccc aattggaaaa tatgaatttg aatctagctt	2880
caaatctac acatagtcgt ttctaattgtt gaaattgagg ggaagataaa tcgtactgta	2940
ctaattgtct aattgaaaca ataaacaaaa tcaattggtt attcaacata tctataaact	3000
cagctgaata aacattaaca tattcaaaca ctgcacaaaa tcataataag tattcaaatt	3060
gaacacaatc aaaattcatc aaaaaaattc atataacgac tctgtttggg gaagtatttt	3120
agctacctta aatgattagg tgctaacata ttttaggtac taaaataatt agtagtgttt	3180
ggggagcccc taaaataaat ttcaggcgac taaatgact taaatgataa gttaaaaatt	3240
ttaccttttc aaaatcaggt gattgaaatt ttggaaaatc tttccaaat ttgacaaca	3300
attaattttg ctaaaataat ttattgactt aatcaactaa tattgctaaa cagttaaact	3360

aatcaattac cttatggatt caaggcttct aacaccttat cttttatfff cagctaataa	3420
tgctaaacag agccaaacaa ctgatttatc aattacaata cagagattca aacctcfff	3480
catttcccta atcaactgaa aataagccct agaaaacgaa acctaaccac cgaaaccgta	3540
aagatatcaa gtttctgtgc ctctttgctc caccctttcc caaacccaa cctcccttc	3600
ctctttctga cattttctct ctctctttc tgggttttct tctttctgtg attttttcag	3660
tttgaattgt tttgggtgt ggatgtgaat gttgtgggaa tggagaaaga agaggtgggt	3720
gattatatag tgaatggatt gttgaaatct tgagatttgg ttttgatact agagtaaagc	3780
aagctcctcc atagtccata gtccatagcc ctgaaaaaaa aaaaaaaga ggtcctccat	3840
tgaagagagt aaagtagcat ctgcaaaata atagtagagt tttagatcta atttcttcaa	3900
ttttacgcct ttgataatg gcagctgaag cagtaggtaa tgtcaaatac tgtcggtcat	3960
atcttagagg agtagatgtc gaagtatccc gcgtatatga tgacggttac ctgtttttgg	4020
aggaggatcc agtggcatgg attgaaagtc acccagctgc tgctgatcgt ctctctgtgc	4080
gaatcttgga gttgaaatgg atggatgatg tggataagat aacagacatg ataggggagc	4140
tgtctgagct cactcacctc tatttctatt ggtgtccaaa cctcaagtct ttgactgaca	4200

ccatcacaag gctgtccaac ttacagttgt taaaacttga aggttggtat aaactggaag	4260
aattaccaga aaatttggga gagctggaga gccttaccca tctctctatt tcttcttgta	4320
gagatatcaa gtcccttcct aatagcttta caaacctatc caacttgacg actttggatc	4380
tttttggatg cgattccctt acagaattgc ctccaaattt aaacgttata cacctcatta	4440
ttaaacattg ctgcagcatc aaggcccttc ctacaggttt aagtaacctg gccagcttac	4500
atctcaaaca aagtcactat tgtcttgcca atttaaagga ctgctcaac ctacgccacc	4560
ttacccttga gaggttgat tttcatggtc acgctaactg tatagaattc ctgccaaatt	4620
tggatgagct gctacaatta tctcttggg atatccagga taccaaagtc agatatcttc	4680
cttgagcat cacaaagtta ctcaatttga aaattctatg tctccccggg gactttatac	4740
ttgaaacact accatatcat ttgaatgatt ccgtcatcat ttctatgaag gattgtcaca	4800
atcgcaaac ttggaaagaa ctcaaacag agattcaagg taagtgtttt cgctattatc	4860
tcacgaattg ttgtttcatg taatgtttgc ttctcttcg gtaaatagca aatagcaaat	4920
agcatagccc tctttttatg tcaagaaact tattcgtacc attgtgcaaa catgggatgg	4980

aactgggaag gttatatttc aagcattggt gtttcatgct ctccttttct atccctaacg	5040
gcccccttgg ttagtggtta taaatagtgg taatggtaat gaaatttagt gtaaatttgt	5100
aaagattttc acatgtccat aacctaggga atgaaacttt atcacaaaac atgggttttc	5160
ctttataaat ttttattacc accttcccaa gtggtaatgg atagtaatga gattttagga	5220
agaaaatgga tatcttgtga ttaagtagca ttaccattgg taatgacatt ggatttctag	5280
cacaaattta cactataatg cattaccatt cacatcattt ataacctctt accaaacggg	5340
ccgttaaaag tttatttgtc ctcctagtcc aaccaattat gcaaaataag gagagattaa	5400
attcagacta tacatactgt tcatatattt tcctgttctt caattttatt tcttaattat	5460
cttcctcttt gtgctcctcc tccagtgaag aatttgggaa tatcaatgtc tgtacctcgg	5520
aaccctctt gtacaccttg gttggacacc aacaagaaac tacatccatg gctgcagaat	5580
aattaccatc gtcaaccgtt tgtgaaatcc ctgcatttgc aatttttga tgatgagttt	5640
ggagatctca agttgttgaa agagctcaca catgtgacac atctctatat ttctggtgat	5700
gtagaccact gccgcctccc tgacacactc acaaataatta cccatctctc tttcatcat	5760
tggtacactt aactgatga ttcatttaag tccttattac tcgatagcct ggcagagcca	5820

tcaaacttgg tatctttaga thtagatctt agtgaaacat acttgccgtc gaacatccat	5880
caattcgtca accttaaag tctcactgta agaaatgacc acagcgagca attagtacct	5940
gatgactggg aaaagctatc taatttgaaa tctttgggtc tctacagatg ttatgatgta	6000
tcattgccaa cacatttgaa tctcaccaac ctcaagcttt ttgattgctt tttcaagaat	6060
gtcagcttac tacctacaag tatacaccgc ctagaattat ggcatagcaa atacttttgc	6120
tgtaaaaaca ggtattgtag taaagagcct atagtatgct tgaatcagtt ggtcaaccta	6180
aagacgctct caataacatg ttacaagtac actagcaacc tacttcccag catagcagga	6240
ctacgcaact tgaaagaatt acaacttaag gattgtttcg gcctcaaaga attaccccca	6300
gatttggatg agctagtggg attatccatt ctcaatatca gcggtaccag agtcaagtcc	6360
tttcctgatt gcatcacaaa gctacaaaag ttgaaacacg tagtcctgcc caagtgttc	6420
aaaaaggaaa atttaccaat taatttcgaa acgacgtatg atgtcacgga tgaagagtac	6480
tacgagaata gaggctatta tgatagtac tatgatacat tctctgatga tgaaagcaat	6540
gagttcgcag tagtagattc tgcagagtca gccgacgaac tggtttcaga atattcacag	6600

gaaggcatta ttgctcagca gatatcagct aatgctaag tcaatcagct tcttgagggt	6660
acgtgcttct actatttcag aaatcatagt gtggagtaca ttgcaattct tctattttaa	6720
aatcagaatc taattgtcaa atgatcaagg tagtgtgctt ccaagttcca acactcctta	6780
accccattaa tggggctcga accgtctgat agagtttggt tcataatatt aacttttatt	6840
gcgtgggttt gaatattaag tttttttata caagcagata ctcatctcaa tggtagaagc	6900
aataccatgg gcgagagttc acaagttcaa gagatggaaa cttcatctac aggactcaat	6960
tcatatacaa atgaaataaa tctcaccgac cagatgtcgg aattcgaatt aattgagatc	7020
tcatcatttg attttgggcc tatttcctct tgtgatgtaa ataatttgc tgggtttgag	7080
aacaaccata atgcttcaga atatacacag aacaacgaga attcaccaag tgatgagaac	7140
cagggaaaga gacaggagga gattattcat gagaaaaatc catgtctgaa tctgatggat	7200
aaaattatga cacaggtgaa ccttggcaag gagctaggtg gtacgttttt atcctttaca	7260
aagtattttc tcagtcctct ttggaattca gaatatgatt accatgagta tgattttctt	7320
gtattgatga atattaattt tttcataca agcagatact catttcaatg gtagaagcaa	7380
tacaattggc gagagttcac atgatgaaga gatggaaact tcattctacag gactcaattc	7440

agatacacat gaaataaatc cacaaagtgg tgataagcag cgaaagagac agaagaagga	7500
gattacccgt gagaaaaatg catgtcttct tggcaaggag ctaggtggta cgtttttatc	7560
ctttacatag tatttcctcc gtcctctttt aaattcagaa gcatatcgtg atatgcttcc	7620
gtgactatgg gtttcttgta tattatattg gtgattatta actatttaaa cagcaaagtt	7680
tgattttgac aagaataagt aggaacttta aaagattttg tttttggtgc aatagaatt	7740
taatcacaat ggacgagaag atgcagttga tgggatcagt caccgcgctt ctttgggtct	7800
accagaccaa gacatggaga atatgcctgt aggaaatgat aaagattcaa catccaccat	7860
agttcgccga gggaaacgta acaaaataga gtttaatttg actagagagc aacttcaatc	7920
atactggtcc agaaacatga cggtagaaga tgttgacta gaattacgtg gtatgtttcc	7980
attctctgca aactatacgg tcattcactg cacttaattg atagatgcat ttgatgttat	8040
atgattcatt ccagtggcaa ggtcttcatt tagacgtgg ttgacggcct ccgaaattcc	8100
atggcaaaca agcaggattt cgaaaagtca atgtgccaac aacaagaata ccaatactgc	8160
atcatcctct ggaagtaaac ctgcagaggt caatttagtg aaacccttta atactccaac	8220

tggtcatgaa catgcacctg agtgtttaag tgatgcaaac gaatgcgttg tcgttaacaa	8280
cttcagcctt gctgtgacga cggacgctga gggagagcct ggagtagcaa cgagatgcca	8340
tagcaatggt cgtgaacaag cttctgacgc ttgtgtgggt acaaatcagg gtactcgaca	8400
agagagccca agtttaagca aattcgttgt gaaagccact tataaagatg atgattatag	8460
aattgagtta cttcaactg ctagtttcca tgaactaaag aaagaagtgg ctcggactct	8520
agaacttgag atgtgcaaat tcaaaataag atataaggac gaggataacg agtggacgcg	8580
aatgagcatt gacttcatt taaagcatct tatggatctt tcaagatcat ctggtaaaaa	8640
tgttattcgg ttgtcagtaa ttgatttg a	8671

<210> 5

<211> 4290

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> κДНК LRR1 (БЛП1)

<400> 5

atgggtttctg cgggtgtaat tcgttttgta gctgggatta ttgtaatat gacagctttt	60
---	----

ttcttattct tgtctccagt gccaacattc atcggaatat gcaagaagaa gacggtggaa	120
caatactcgc cagtgccata cttagccaca tttgtgaatt gcatgctttg ggttgtgtat	180
ggtctgccta ttattcaccc taatagcatt ttagtggtga caatcaatgg agctggggtt	240
tttattgaac tgctttactt gatactcttc gtgctttact ctgacaaaaa gaataggctc	300
aaaattgtgt tgattgcaat tattgagatc gtaattgtgg gaattatgac taccttggtc	360
ctcaactttg ttcatactac caagcgtagg tcttcaattg ttggtatgat tgccatcata	420
tgtaacatca tgatgtatgc ctctccttta tccgtcttga aattggtgat aacaacaaaa	480
agcgtggaat acatgccgtt atctttatca attgcttcat ttgctaattg cattgcatgg	540
acagtctatg ctttgtatcc tttcgatcct tacattgccg caccaaatgg gctgggtaca	600
ctatttgcag tggccaact gattctgtat gcaacatact acaagtcac aaaagagcag	660
atggcagcaa gaaaagccaa aaatgcagtg ggcctgactg aagttgtctt caacggagac	720
tctggaaaaa tgggccaatt tgaattgtt tgggttggtg atgtgaatgt tgtgggaatg	780
gagaaagaag aggtggctga agcagtaggt aatgtcaaact actgtcggtc atatcttaga	840

ggagtagatg tcgaagtatc ccgcgtatat gatgacggtt acctgttttt ggaggaggat	900
ccagtggcat ggattgaaag tcaccagct gctgctgatc gtctctctgt gcgaatcttg	960
gagttgaaat ggatggatga tgtggataag ataacagaca tgataggga gctgtctgag	1020
ctcactcacc tctatttcta ttggtgtcca aacctcaagt ctttgactga caccatcaca	1080
aggctgtcca acttacagtt gttaaaactt gaaggttggt ataaactgga agaattacca	1140
gaaaatttgg gagagctgga gagccttacc catctctcta tttcttcttg tagagatatc	1200
aagtccttc ctaatagtct tacaaccta tccaacttga cgactttgga tctttttgga	1260
tgcgattccc ttacagaatt gcctccaaat ttaaagttta tacacctcat tattaacat	1320
tgctgcagca tcaaggccct tcctacaggt ttaagtaacc tggccagctt acatctcaaa	1380
caaagtcact attgtcttgc caatttaaag gactcgtca acctacgcca cttaccctt	1440
gagagtttg attttcatgg tcacgctaac gttatagaat tcctgcaaaa tttggatgag	1500
ctgctacaat tatctcttgt ggatatccag gataccaaag tcagatatct tccttgagc	1560
atcacaaagt tactcaattt gaaaattcta tgtctccccg gggactttat acttgaaaca	1620
ctaccatatc atttgaatga ttccgtcatc atttctatga aggattgtca caatcgcaaa	1680

acttggaag aactcaaac agagattcaa gtgaaaaatt tgggaatata aatgtctgta	1740
cctcggaacc cctcttgta cctttggtg gacaccaaca agaaactaca tccatggctg	1800
cagaataatt accatcgta accgtttgtg aaatccctgc atttgcaatt tttggatgat	1860
gagtttgag atctcaagtt gttgaaagag ctacacatg tgacacatct ctatatttct	1920
ggtgatgtag accactgccg cctccctgac aactcaca atattacca tctctctctt	1980
catcattgtt acacttacac tgatgattca ttttaagtcct tattactcga tagcctggca	2040
gagccatcaa acttggatc ttttagatga gatcttagtg aaacatactt gccgtcgaa	2100
atccatcaat tcgtcaacct taaatgtctc actgtaagaa atgaccacag cgagcaatta	2160
gtacctgatg actgggaaaa gctatctaatt ttgaaatctt tggttctcta cagatgttat	2220
gatgtatcat tgccaacaca tttgaatctc accaactca agctttttga ttgctttttc	2280
aagaatgtca gcttactacc tacaagtata caccgcctag aattatggca tagcaaatac	2340
ttttgctgta aaaacaggta ttgtagtaaa gagcctatag tatgcttgaa tcagttggtc	2400
aacctaaaga cgctctcaat aacatgttac aagtacacta gcaacctact tcccagcata	2460

gcaggactac gcaacttgaa agaattacaa ctttaaggatt gtttcggcct caaagaatta	2520
ccccagatt tggatgagct agtggaatta tccattctca atatcagcgg taccagagtc	2580
aagtcctttc ctgattgcat cacaaagcta caaaagttga aacacgtagt cctgcccgaag	2640
tgcttcaaaa aggaaaaattt accaattaat ttcgaaacga cgtatgatgt cacggatgaa	2700
gagtactacg agaatagagg ctattatgat agtgactatg atacattctc tgatgatgaa	2760
agcaatgagt tcgcagtagt agattctgca gagtacgccg acgaactggt ttcagaatat	2820
tcacaggaag gcattattgc tcagcagata tcagctaata ctaatgtcaa tcagcttctt	2880
ggagatactc atttcaatgg tagaagcaat accatgggcg agagttcaca agttcaagag	2940
atggaaactt catctacagg actcaattca tatacaaatg aaataaatct caccgaccag	3000
atgtcggaaat tcgaattaat tgagatctca tcatttgatt ttgggcctat ttcctcttgt	3060
gatgtaaata atattgctgg tgttgagaac aaccataatg cttcagaata tacacagaac	3120
aacgagaatt caccaagtga tgagaaccag ggaaagagac aggaggagat tattcatgag	3180
aaaaatccat gtctgaatct gatggataaa attatgacac aggtgaacct tggcaaggag	3240
ctaggtgata ctcatttcaa tggtagaagc aatacaattg gcgagagttc acatgatgaa	3300

gagatggaaa cttcatctac aggactcaat tcagatacac atgaaataaa tccacaaagt	3360
ggtgataagc agcgaaagag acagaagaag gagattaccc gtgagaaaaa tgcattgtctt	3420
cttggcaagg agctaggtga atttaatcac aatggacgag aagatgcagt tgatgggatc	3480
agtcaccgcg cttctttggg tctaccagac caagacatgg agaatatgcc tgtaggaaat	3540
gataaagatt caacatccac catagtctgc cgagggaac gtaacaaaat agagtttaat	3600
ttgactagag agcaacttca atcatactgg tccagaaaca tgacggtaga agatgttgca	3660
ctagaattac gtgtggcaag gtcttcattt agacgctggt tgacggcctc cgaaattcca	3720
tggcaaacaa gcaggatttc gaaaagtcaa tgtgccaaca acaagaatac caatactgca	3780
tcaccccttg gaagtaaacc tgcagaggtc aatttagtga aaccctttaa tactccaact	3840
ggtcatgaac atgcacctga gtgtttaagt gatgcaaacg aatgcgttgt cgtaacaac	3900
ttcagccttg ctgtgacgac ggacgctgag ggagagcctg gagtagcaac gagatgccat	3960
agcaatggtc gtgaacaagc ttctgacgct ttggtgggta caaatcaggg tactcgacaa	4020
gagagcccaa gtttaagcaa attcgttgtg aaagccactt ataaagatga tgattataga	4080

```

attgagttac cttcaactgc tagtttccat gaactaaaga aagaagtggc tcggactcta 4140

gaacttgaga tgtgcaaatt caaaataaga tataaggacg aggataacga gtggacgcga 4200

atgagcattg actctcattt aaagcatctt atggatcttt caagatcatc tggtaaaaat 4260

gttattcggg tgtcagtaat tgatttgtga 4290

```

<210> 6

<211> 1429

<212> ПРТ

<213> Буряк звичайний

<400> 6

Met Val Ser Ala Gly Val Ile Arg Phe Val Ala Gly Ile Ile Gly Asn

1 5 10 15

Met Thr Ala Phe Phe Leu Phe Leu Ser Pro Val Pro Thr Phe Ile Gly

20 25 30

Ile Cys Lys Lys Lys Thr Val Glu Gln Tyr Ser Pro Val Pro Tyr Leu

35 40 45

Ala Thr Phe Val Asn Cys Met Leu Trp Val Val Tyr Gly Leu Pro Ile
 50 55 60

Ile His Pro Asn Ser Ile Leu Val Val Thr Ile Asn Gly Ala Gly Phe
 65 70 75 80

Phe Ile Glu Leu Leu Tyr Leu Ile Leu Phe Val Leu Tyr Ser Asp Lys
 85 90 95

Lys Asn Arg Leu Lys Ile Val Leu Ile Ala Ile Ile Glu Ile Val Ile
 100 105 110

Val Gly Ile Met Thr Thr Leu Val Leu Asn Phe Val His Thr Thr Lys
 115 120 125

Arg Arg Ser Ser Ile Val Gly Met Ile Ala Ile Ile Cys Asn Ile Met
 130 135 140

Met Tyr Ala Ser Pro Leu Ser Val Leu Lys Leu Val Ile Thr Thr Lys
 145 150 155 160

Ser Val Glu Tyr Met Pro Leu Ser Leu Ser Ile Ala Ser Phe Ala Asn
 165 170 175

Gly Ile Ala Trp Thr Val Tyr Ala Leu Tyr Pro Phe Asp Pro Tyr Ile
 180 185 190

Ala Ala Pro Asn Gly Leu Gly Thr Leu Phe Ala Val Val Gln Leu Ile
 195 200 205

Leu Tyr Ala Thr Tyr Tyr Lys Ser Thr Lys Glu Gln Met Ala Ala Arg
 210 215 220

Lys Ala Lys Asn Ala Val Gly Leu Thr Glu Val Val Phe Asn Gly Asp
 225 230 235 240

Ser Gly Lys Met Gly Gln Phe Glu Leu Phe Trp Val Val Asp Val Asn
 245 250 255

Val Val Gly Met Glu Lys Glu Glu Val Ala Glu Ala Val Gly Asn Val

260 265 270

Lys Tyr Cys Arg Ser Tyr Leu Arg Gly Val Asp Val Glu Val Ser Arg

275 280 285

Val Tyr Asp Asp Gly Tyr Leu Phe Leu Glu Glu Asp Pro Val Ala Trp

290 295 300

Ile Glu Ser His Pro Ala Ala Ala Asp Arg Leu Ser Val Arg Ile Leu

305 310 315 320

Glu Leu Lys Trp Met Asp Asp Val Asp Lys Ile Thr Asp Met Ile Gly

325 330 335

Glu Leu Ser Glu Leu Thr His Leu Tyr Phe Tyr Trp Cys Pro Asn Leu

340 345 350

Lys Ser Leu Thr Asp Thr Ile Thr Arg Leu Ser Asn Leu Gln Leu Leu

355 360 365

Lys Leu Glu Gly Cys Tyr Lys Leu Glu Glu Leu Pro Glu Asn Leu Gly
 370 375 380

Glu Leu Glu Ser Leu Thr His Leu Ser Ile Ser Ser Cys Arg Asp Ile
 385 390 395 400

Lys Ser Leu Pro Asn Ser Leu Thr Asn Leu Ser Asn Leu Thr Thr Leu
 405 410 415

Asp Leu Phe Gly Cys Asp Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Asn Leu Asn
 420 425 430

Val Ile His Leu Ile Ile Lys His Cys Cys Ser Ile Lys Ala Leu Pro
 435 440 445

Thr Gly Leu Ser Asn Leu Ala Ser Leu His Leu Lys Gln Ser His Tyr
 450 455 460

Cys Leu Ala Asn Leu Lys Asp Ser Leu Asn Leu Arg His Leu Thr Leu
 465 470 475 480

Glu Ser Cys Asp Phe His Gly His Ala Asn Val Ile Glu Phe Leu Pro
 485 490 495

Asn Leu Asp Glu Leu Leu Gln Leu Ser Leu Val Asp Ile Gln Asp Thr
 500 505 510

Lys Val Arg Tyr Leu Pro Trp Ser Ile Thr Lys Leu Leu Asn Leu Lys
 515 520 525

Ile Leu Cys Leu Pro Gly Asp Phe Ile Leu Glu Thr Leu Pro Tyr His
 530 535 540

Leu Asn Asp Ser Val Ile Ile Ser Met Lys Asp Cys His Asn Arg Lys
 545 550 555 560

Thr Trp Lys Glu Leu Lys Thr Glu Ile Gln Val Lys Asn Leu Gly Ile
 565 570 575

Ser Met Ser Val Pro Arg Asn Pro Ser Cys Tyr Leu Trp Leu Asp Thr
 580 585 590

Asn Lys Lys Leu His Pro Trp Leu Gln Asn Asn Tyr His Arg Gln Pro
 595 600 605

Phe Val Lys Ser Leu His Leu Gln Phe Leu Asp Asp Glu Phe Gly Asp
 610 615 620

Leu Lys Leu Leu Lys Glu Leu Thr His Val Thr His Leu Tyr Ile Ser
 625 630 635 640

Gly Asp Val Asp His Cys Arg Leu Pro Asp Thr Leu Thr Asn Ile Thr
 645 650 655

His Leu Ser Leu His His Cys Tyr Thr Tyr Thr Asp Asp Ser Phe Lys
 660 665 670

Ser Leu Leu Leu Asp Ser Leu Ala Glu Pro Ser Asn Leu Val Ser Leu
 675 680 685

Asp Val Asp Leu Ser Glu Thr Tyr Leu Pro Ser Asn Ile His Gln Phe

690	695	700	
Val Asn Leu Lys Cys Leu Thr Val Arg Asn Asp His Ser Glu Gln Leu			
705	710	715	720
Val Pro Asp Asp Trp Glu Lys Leu Ser Asn Leu Lys Ser Leu Val Leu			
	725	730	735
Tyr Arg Cys Tyr Asp Val Ser Leu Pro Thr His Leu Asn Leu Thr Asn			
	740	745	750
Leu Lys Leu Phe Asp Cys Phe Phe Lys Asn Val Ser Leu Leu Pro Thr			
	755	760	765
Ser Ile His Arg Leu Glu Leu Trp His Ser Lys Tyr Phe Cys Cys Lys			
	770	775	780
Asn Arg Tyr Cys Ser Lys Glu Pro Ile Val Cys Leu Asn Gln Leu Val			
785	790	795	800

Asn Leu Lys Thr Leu Ser Ile Thr Cys Tyr Lys Tyr Thr Ser Asn Leu
805 810 815

Leu Pro Ser Ile Ala Gly Leu Arg Asn Leu Lys Glu Leu Gln Leu Lys
820 825 830

Asp Cys Phe Gly Leu Lys Glu Leu Pro Pro Asp Leu Asp Glu Leu Val
835 840 845

Glu Leu Ser Ile Leu Asn Ile Ser Gly Thr Arg Val Lys Ser Phe Pro
850 855 860

Asp Cys Ile Thr Lys Leu Gln Lys Leu Lys His Val Val Leu Pro Lys
865 870 875 880

Cys Phe Lys Lys Glu Asn Leu Pro Ile Asn Phe Glu Thr Thr Tyr Asp
885 890 895

Val Thr Asp Glu Glu Tyr Tyr Glu Asn Arg Gly Tyr Tyr Asp Ser Asp
900 905 910

Tyr Asp Thr Phe Ser Asp Asp Glu Ser Asn Glu Phe Ala Val Val Asp
 915 920 925

Ser Ala Glu Ser Ala Asp Glu Leu Val Ser Glu Tyr Ser Gln Glu Gly
 930 935 940

Ile Ile Ala Gln Gln Ile Ser Ala Asn Ala Asn Val Asn Gln Leu Leu
 945 950 955 960

Gly Asp Thr His Phe Asn Gly Arg Ser Asn Thr Met Gly Glu Ser Ser
 965 970 975

Gln Val Gln Glu Met Glu Thr Ser Ser Thr Gly Leu Asn Ser Tyr Thr
 980 985 990

Asn Glu Ile Asn Leu Thr Asp Gln Met Ser Glu Phe Glu Leu Ile Glu
 995 1000 1005

Ile Ser Ser Phe Asp Phe Gly Pro Ile Ser Ser Cys Asp Val Asn
 1010 1015 1020

Asn Ile	Ala Gly Val	Glu Asn	Asn His	Asn Ala Ser	Glu Tyr Thr
1025		1030		1035	

Gln Asn	Asn Glu Asn Ser	Pro Ser Asp	Glu Asn Gln	Gly Lys Arg
1040		1045		1050

Gln Glu	Glu Ile Ile His	Glu Lys Asn	Pro Cys Leu	Asn Leu Met
1055		1060		1065

Asp Lys	Ile Met Thr Gln	Val Asn Leu	Gly Lys Glu	Leu Gly Asp
1070		1075		1080

Thr His	Phe Asn Gly Arg	Ser Asn Thr	Ile Gly Glu	Ser Ser His
1085		1090		1095

Asp Glu	Glu Met Glu Thr	Ser Ser Thr	Gly Leu Asn	Ser Asp Thr
1100		1105		1110

His Glu	Ile Asn Pro Gln	Ser Gly Asp	Lys Gln Arg	Lys Arg Gln
---------	-----------------	-------------	-------------	-------------

1115

1120

1125

Lys Lys Glu Ile Thr Arg Glu Lys Asn Ala Cys Leu Leu Gly Lys

1130

1135

1140

Glu Leu Gly Glu Phe Asn His Asn Gly Arg Glu Asp Ala Val Asp

1145

1150

1155

Gly Ile Ser His Arg Ala Ser Leu Gly Leu Pro Asp Gln Asp Met

1160

1165

1170

Glu Asn Met Pro Val Gly Asn Asp Lys Asp Ser Thr Ser Thr Ile

1175

1180

1185

Val Arg Arg Gly Lys Arg Asn Lys Ile Glu Phe Asn Leu Thr Arg

1190

1195

1200

Glu Gln Leu Gln Ser Tyr Trp Ser Arg Asn Met Thr Val Glu Asp

1205

1210

1215

Val Ala Leu Glu Leu Arg Val Ala Arg Ser Ser Phe Arg Arg Trp
1220 1225 1230

Leu Thr Ala Ser Glu Ile Pro Trp Gln Thr Ser Arg Ile Ser Lys
1235 1240 1245

Ser Gln Cys Ala Asn Asn Lys Asn Thr Asn Thr Ala Ser Ser Ser
1250 1255 1260

Gly Ser Lys Pro Ala Glu Val Asn Leu Val Lys Pro Phe Asn Thr
1265 1270 1275

Pro Thr Gly His Glu His Ala Pro Glu Cys Leu Ser Asp Ala Asn
1280 1285 1290

Glu Cys Val Val Val Asn Asn Phe Ser Leu Ala Val Thr Thr Asp
1295 1300 1305

Ala Glu Gly Glu Pro Gly Val Ala Thr Arg Cys His Ser Asn Gly
1310 1315 1320

Arg Glu Gln Ala Ser Asp Ala Leu Val Gly Thr Asn Gln Gly Thr
1325 1330 1335

Arg Gln Glu Ser Pro Ser Leu Ser Lys Phe Val Val Lys Ala Thr
1340 1345 1350

Tyr Lys Asp Asp Asp Tyr Arg Ile Glu Leu Pro Ser Thr Ala Ser
1355 1360 1365

Phe His Glu Leu Lys Lys Glu Val Ala Arg Thr Leu Glu Leu Glu
1370 1375 1380

Met Cys Lys Phe Lys Ile Arg Tyr Lys Asp Glu Asp Asn Glu Trp
1385 1390 1395

Thr Arg Met Ser Ile Asp Ser His Leu Lys His Leu Met Asp Leu
1400 1405 1410

Ser Arg Ser Ser Gly Lys Asn Val Ile Arg Leu Ser Val Ile Asp
1415 1420 1425

Leu

<210> 7

<211> 3773

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 7

atggcagatg aagcaggtaa tgtcaactac tgttggacgt gttggtcac tattagaaaa 60

gtggaagtcg aagtatcccc catatatgat gacggttacc tgttattgaa ggaggatcca 120

gtggcatgga ttcaaagtca ccccgctgct gctgacgctc tctctgtgcg aatcttgag 180

ttgacattgg agctgtatgg tgtggataag ataacagaca tgataggga gctgtctgag 240

ctcactcacc tctatttcta ttggtgtctt tacctaaagt gtttgcctga caccatcaca 300

aggctgtcca acttacagtt gttaaaactt gtaggttggt atgaattgga agaattacca 360

gaaaatttgg gagagctgga gagccttacc catctctctc tttctcagag tcaaggtatc 420

aagtccttc ctaatagtct tacaaccta tccaacttga caacttgaa tatttttcaa 480

tgcaattccc ttacagaatt gcctccaaat ttgggagagc tggagagcct taccatctc	540
tctctttctt tttgtgaagg tatcaagtcc cttcctaata gtcttgcaaa cctaaccaac	600
ttgacaactt tggatcttca gtattgcaag tcccttagaa aattgcctcc aaatttgaat	660
gtgtacacc tcattattaa aggttgctgc agcatcaagg ccttcctac aggtttaagt	720
aacctggcca gcttacatct cacacaatgt aactatgatc ttgccaattt aaaggactcg	780
ctcaacctac gccacctcac ccttgagagt tgcgaatgta atgttcacgc tgacgttata	840
gaattcctgg caaatttggg tgagctgcta caattatctg ttgttgatat ccaggataca	900
aaagtcagat atcttccttg gagcatcaca aagttactca atttgaaatt tctatgtctc	960
cctcagggtt ttatactcga aacactacca tatcatctga atgattccgt catcatttat	1020
atgaaggatt gtgacgatcg caaaacttgg aaagaactca aaacagagat tgaaggtaag	1080
tgttttcgct attatctcac gaattgttgt ttcattgttg cttctcttcc ggtaaatagc	1140
aaataacaaa tagcatagcc ctctttttat gtcaaaaaac ttattcgtac cattgtgcaa	1200
acatgggaag gttatatattc aagcattggt gtttcatgct ctcctttcta tcccaaaaag	1260

tttgtttgtc ctccaatcc aagtccaacc aattatgcaa ataaggaaag attagattca	1320
gactatatat aataatgtta atatatatttc ctgttcttca attttatattc ttaattatct	1380
tcctctttgt cctcctccag tggataattt gggaatatca atgtctgtac ctcggaaccc	1440
ctcttggttac ctttggttg actccaacaa gagcctacat ccatggctgc agaataatta	1500
cgattttcaa cgtctgtga aattcctcga tttaaatttt ttggatgatg agtttggaga	1560
tctcacgttg ctgaaagagc tcacacatgt gacacatctc tatatttctg gtcattgtaga	1620
cctctaccgc ctccctgaca cactcacaaa tattacccat ctctctcttc atactgaaga	1680
tgacactgat gattcatttg attcctttct tgataggctg gcagagccat caaacttggg	1740
atcttttagat ctagatctta gtgaaacata cttgccgtca aacatccatc aattcgtcaa	1800
ccttaaatgt ctactgtaa gatatgcaa cagcaagcca ttagtacctg ataactggga	1860
aaagctatct aatttgaaat ctttggttct ctatacatgt tatgatgtat cattgccaac	1920
acatttgaat ctactaacc tcaagctttt caattgcttt ttcgagaatg tcagcttact	1980
acctacaagt ctacaccgcc tagaattatt gcatagcaac gactattgca gtgccttttg	2040
ctgtgatgac ggggattgta gtgaagagcc tatactatgc ttgaatcagt ttgtcaacct	2100

agagacgctc tctataacat gttacgagta cactggcacc cgacttcca gcatagcagg	2160
actacgcaac ttgaaagaat tacaacttaa ggattgtttc ggcctcaaag aattaccccc	2220
agatttggat gagctagtgg aattatccat tctcaatatc agcggtagca gagtcaagtc	2280
ctttcctgat tgcatacaaa agctacaaaa gttgaaacac gtagtcctgc ccaagtgcctt	2340
caaaaaggaa aatttaccga ataattcaaa aacgaagtac accactgatg acacggatga	2400
agaatactac aagcatagag gctattatag tagtgaatat gaaacctcaa ataaaacctc	2460
tgatgaaagt aatgagatca cagtagtaga ttctgcagag gtagccgaca aagtggtttc	2520
agaatattca caggaaggca tcatttcgca gcagatatca tcacccaac tcctgagtat	2580
acctaagtct aatcagtttc ttggaggtag gtgcttctac tatttcagaa atcattgtgt	2640
ggagtacatt gcaattcttc tatcttaaaa tcaaaatcta attgtcaaat gatcaaggta	2700
gtgtgcttcc aagttccaac actccttaac cccattaatg gggctctaata gattttgttt	2760
cataatatta acttttatgg cgtgggtttg aatattaagt tttttatac aaacagatac	2820
tcatttcact ggtagaagca atacaatggg cgaaagttca caagttcaag agatggaaac	2880

ttcatctaca ggactcaatt caaatacaaa tgaaataaat ctcaccgacc agatgttgga	2940
attcggattt gggaactcat catttgattt tgggcacatt tcttatagt atgtgactaa	3000
tattgatcgt gttgagaata accatcatgc ttcagaatat acgcagaaca aagagaatcc	3060
accaagtgat gagaaccagg ggaagagaca gaagaaggag attactcatg agaaaaataa	3120
tccatgtctg atggatataa acatgacaca agtgcacctt ggagaggagc taggcggtac	3180
gtttttatcc ttacaaaagt attttatcag ttctctttt aattcagaag tatatcggga	3240
tatgcttact ttgactgttg attatcaact atttaaaaag caaagtttga tttgacaag	3300
aataaatggg aactccatta atttagaaga ttttctttt ggtgcgaata gaatttaatc	3360
acaatggagg agaggatgca gtcgatggga tcaatcaciaa tggaggagag gatgcagttt	3420
atgagatcag tcacagcgct tcttgcggtt caccagacca agacatggag aatatgcctg	3480
taggaaatga taaagagtca acatccacca tagttggccg agggagaggt aagaaaatag	3540
agattaaatt gactagagag gaacttcaat catactggtc tagaaacatg acggtagaag	3600
atgttgcaaa agacatagat ggtatgtttc cattctctgc aaactatacg gtcattcact	3660
gcatttaatt gatagatgca tttgatgttc tatgattcat tccagtgtca aggtctacat	3720

ttaaacgctg gttgaaggcc tccggtatta aatggcaaac aaaacctaataa 3773

<210> 8

<211> 2898

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> κДНК LRR3 (БЛПЗ)

<400> 8

atggcagatg aagcaggtaa tgtcaactac tgttgacgt gttggtcatc tattagaaaa 60

gtggaagtcg aagtatcccg catatatgat gacggttacc tgttattgaa ggaggatcca 120

gtggcatgga ttcaaagtca ccccgctgct gctgatcgtc tctctgtgcg aatcttgag 180

ttgacattgg agctgtatgg tgtggataag ataacagaca tgatagggga gctgtctgag 240

ctcactcacc tctatttcta ttggtgtctt tacctaaagt gtttgcctga caccatcaca 300

aggctgtcca acttacagtt gttaaaactt gtaggttgtt atgaattgga agaattacca 360

gaaaatttgg gagagctgga gacgcttacc catctctctc tttctcagag tcaagaattg 420

cctccaaatt tgggagagct ggagagcctt acccatctct ctctttcttt ttgtgaaggt	480
atcaagtccc ttcctaatag tcttgcaaac ctaaccaact tgacaacttt ggatcttcag	540
tattgcaagt cccttagaaa attgcctcca aatttgaatg ttgtacacct cattattaaa	600
ggttgctgca gcatcaaggc ccttcctaca ggtttaagta acctggccag cttacatctc	660
acacaatgta actatgatct tgccaattta aaggactcgc tcaacctacg ccacctcacc	720
cttgagagtt gcgaatgtaa tgttcacgct gacgttatag aattcctggc aaatttggat	780
gagctgctac aattatctgt tgttgatata caggatacaa aagtcagata tcttccttgg	840
agcatcacia agttactcaa ttgaaattt ctatgtctcc ctcagggttt tatactcgaa	900
acactaccat atcatctgaa tgattccgct atcatttata tgaaggattg tgacgatcgc	960
aaaacttggg aagaactcaa aacagagatt gaagtgata atttggaat atcaatgtct	1020
gtacctcgga acccctcttg ttacctttgg ttggactcca acaagagcct acatccatgg	1080
ctgcagaata attacgattt tcaaccgtct gtgaaattcc tcgatttaaa ttttttggat	1140
gatgagtttg gagatctcac gttgctgaaa gagctcacac atgtgacaca tctctatatt	1200
tctggcatg tagacctcta ccgcctccct gacacactca caaatattac ccattctct	1260

cttcatactg aagatgacac tgatgattca ttgattcct ttcttgatag gctggcagag	1320
ccatcaaact tggatatctt agatctagat cttagtgaac catacttgcc gtcaaacatc	1380
catcaattcg tcaaccttaa atgtctcact gtaagatatg ccaacagcaa gccattagta	1440
cctgataact gggaaaagct atctaatttg aaatctttgg ttctctatac atgttatgat	1500
gtatcattgc caacacattt gaatctcact aacctcaagc ttttcaattg ctttttcgag	1560
aatgtcagct tactacctac aagtctacac cgcctagaat tattgcatag caacgactat	1620
tgtagtgctt ttgtctgtga tgacggggat tgtagtgaag agcctatact atgcttgaat	1680
cagtttgta acctagagac gctctctata acatgttacg agtacactgg caccgactt	1740
cccagcatag caggactacg caacttgaaa gaattacaac ttaaggattg tttcggcctc	1800
aaagaattac ccccagattt ggatgagcta gtggaattat ccattctcaa taccagcgtt	1860
accagagtca agtcctttcc tgattgcac acaaagctac aaaagttgaa acacgtagtc	1920
ctgcccgaat gcttcaaaaa ggaaaattta cccaataatt caaaaacgaa gtacaccact	1980
gatgacacgg atgaagaata ctacaagcat agaggctatt atagtagtga atatgaaacc	2040

tcaaataaaa cctctgatga aagtaatgag atcacagtag tagattctgc agaggtagcc	2100
gacaaagtgg ttccagaata ttcacaggaa ggcatcattt cgcagcagat atcatcacc	2160
caactcctga gtatacctaa tgctaatacag tttcttgag atactcattt cactggtaga	2220
agcaatacaa tgggcgaaag ttcacaagtt caagagatgg aaacttcac tacaggactc	2280
aattcaata caaatgaaat aaatctcacc gaccagatgt tggaattcgg atttggaac	2340
tcatcatttg attttgggca ctttcttat agtgatgtga ctaatatga tctgttgag	2400
aataaccatc atgcttcaga atatacgag aacaaagaga atccaccaag tgatgagaac	2460
caggggaaga gacagaagaa ggagattact catgagaaaa ataatccatg tctgatggat	2520
ataaacatga cacaagtga ccttgagag gagctaggcg aatttaatca caatggagga	2580
gaggatgcag tcatgggat caatcacaat ggaggagagg atgcagttta tgatcagat	2640
cacagcgctt cttgcggtc accagaccaa gacatggaga atatgcctgt aggaaatgat	2700
aaagagtcaa catccacat agttggccga gggagaggta agaaaataga gattaaattg	2760
actagagagg aacttcaatc atactggtct agaaacatga cggtagaaga tgttgcaaaa	2820
gacatagatg tgtcaaggtc tacatttaaa cgctggtga aggcctccgg tattaaatgg	2880

caaacaaaac ctaattaa

2898

<210> 9

<211> 965

<212> ПРТ

<213> Буряк звичайний

<400> 9

Met Ala Asp Glu Ala Gly Asn Val Asn Tyr Cys Trp Thr Cys Trp Ser

1 5 10 15

Ser Ile Arg Lys Val Glu Val Glu Val Ser Arg Ile Tyr Asp Asp Gly

20 25 30

Tyr Leu Leu Leu Lys Glu Asp Pro Val Ala Trp Ile Gln Ser His Pro

35 40 45

Ala Ala Ala Asp Arg Leu Ser Val Arg Ile Leu Glu Leu Thr Leu Glu

50 55 60

Leu Tyr Gly Val Asp Lys Ile Thr Asp Met Ile Gly Glu Leu Ser Glu
65 70 75 80

Leu Thr His Leu Tyr Phe Tyr Trp Cys Leu Tyr Leu Lys Cys Leu Pro
85 90 95

Asp Thr Ile Thr Arg Leu Ser Asn Leu Gln Leu Leu Lys Leu Val Gly
100 105 110

Cys Tyr Glu Leu Glu Glu Leu Pro Glu Asn Leu Gly Glu Leu Glu Ser
115 120 125

Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Gln Ser Gln Glu Leu Pro Pro Asn Leu
130 135 140

Gly Glu Leu Glu Ser Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Phe Cys Glu Gly
145 150 155 160

Ile Lys Ser Leu Pro Asn Ser Leu Ala Asn Leu Thr Asn Leu Thr Thr
165 170 175

Leu Asp Leu Gln Tyr Cys Lys Ser Leu Arg Lys Leu Pro Pro Asn Leu
 180 185 190

Asn Val Val His Leu Ile Ile Lys Gly Cys Cys Ser Ile Lys Ala Leu
 195 200 205

Pro Thr Gly Leu Ser Asn Leu Ala Ser Leu His Leu Thr Gln Cys Asn
 210 215 220

Tyr Asp Leu Ala Asn Leu Lys Asp Ser Leu Asn Leu Arg His Leu Thr
 225 230 235 240

Leu Glu Ser Cys Glu Cys Asn Val His Ala Asp Val Ile Glu Phe Leu
 245 250 255

Ala Asn Leu Asp Glu Leu Leu Gln Leu Ser Val Val Asp Ile Gln Asp
 260 265 270

Thr Lys Val Arg Tyr Leu Pro Trp Ser Ile Thr Lys Leu Leu Asn Leu
 275 280 285

Lys Phe Leu Cys Leu Pro Gln Gly Phe Ile Leu Glu Thr Leu Pro Tyr
 290 295 300

His Leu Asn Asp Ser Val Ile Ile Tyr Met Lys Asp Cys Asp Asp Arg
 305 310 315 320

Lys Thr Trp Lys Glu Leu Lys Thr Glu Ile Glu Val Asp Asn Leu Gly
 325 330 335

Ile Ser Met Ser Val Pro Arg Asn Pro Ser Cys Tyr Leu Trp Leu Asp
 340 345 350

Ser Asn Lys Ser Leu His Pro Trp Leu Gln Asn Asn Tyr Asp Phe Gln
 355 360 365

Pro Ser Val Lys Phe Leu Asp Leu Asn Phe Leu Asp Asp Glu Phe Gly
 370 375 380

Asp Leu Thr Leu Leu Lys Glu Leu Thr His Val Thr His Leu Tyr Ile

385	390	395	400
Ser Gly His Val Asp Leu Tyr Arg Leu Pro Asp Thr Leu Thr Asn Ile			
	405	410	415
Thr His Leu Ser Leu His Thr Glu Asp Asp Thr Asp Asp Ser Phe Asp			
	420	425	430
Ser Phe Leu Asp Arg Leu Ala Glu Pro Ser Asn Leu Val Ser Leu Asp			
	435	440	445
Leu Asp Leu Ser Glu Thr Tyr Leu Pro Ser Asn Ile His Gln Phe Val			
	450	455	460
Asn Leu Lys Cys Leu Thr Val Arg Tyr Ala Asn Ser Lys Pro Leu Val			
465	470	475	480
Pro Asp Asn Trp Glu Lys Leu Ser Asn Leu Lys Ser Leu Val Leu Tyr			
	485	490	495

Thr Cys Tyr Asp Val Ser Leu Pro Thr His Leu Asn Leu Thr Asn Leu
 500 505 510

Lys Leu Phe Asn Cys Phe Phe Glu Asn Val Ser Leu Leu Pro Thr Ser
 515 520 525

Leu His Arg Leu Glu Leu Leu His Ser Asn Asp Tyr Cys Ser Ala Phe
 530 535 540

Cys Cys Asp Asp Gly Asp Cys Ser Glu Glu Pro Ile Leu Cys Leu Asn
 545 550 555 560

Gln Phe Val Asn Leu Glu Thr Leu Ser Ile Thr Cys Tyr Glu Tyr Thr
 565 570 575

Gly Thr Arg Leu Pro Ser Ile Ala Gly Leu Arg Asn Leu Lys Glu Leu
 580 585 590

Gln Leu Lys Asp Cys Phe Gly Leu Lys Glu Leu Pro Pro Asp Leu Asp
 595 600 605

Glu Leu Val Glu Leu Ser Ile Leu Asn Ile Ser Gly Thr Arg Val Lys
610 615 620

Ser Phe Pro Asp Cys Ile Thr Lys Leu Gln Lys Leu Lys His Val Val
625 630 635 640

Leu Pro Lys Cys Phe Lys Lys Glu Asn Leu Pro Asn Asn Ser Lys Thr
645 650 655

Lys Tyr Thr Thr Asp Asp Thr Asp Glu Glu Tyr Tyr Lys His Arg Gly
660 665 670

Tyr Tyr Ser Ser Glu Tyr Glu Thr Ser Asn Lys Thr Ser Asp Glu Ser
675 680 685

Asn Glu Ile Thr Val Val Asp Ser Ala Glu Val Ala Asp Lys Val Val
690 695 700

Ser Glu Tyr Ser Gln Glu Gly Ile Ile Ser Gln Gln Ile Ser Ser Pro
705 710 715 720

Gln Leu Leu Ser Ile Pro Asn Ala Asn Gln Phe Leu Gly Asp Thr His
725 730 735

Phe Thr Gly Arg Ser Asn Thr Met Gly Glu Ser Ser Gln Val Gln Glu
740 745 750

Met Glu Thr Ser Ser Thr Gly Leu Asn Ser Asn Thr Asn Glu Ile Asn
755 760 765

Leu Thr Asp Gln Met Leu Glu Phe Gly Phe Gly Asn Ser Ser Phe Asp
770 775 780

Phe Gly His Ile Ser Tyr Ser Asp Val Thr Asn Ile Asp Arg Val Glu
785 790 795 800

Asn Asn His His Ala Ser Glu Tyr Thr Gln Asn Lys Glu Asn Pro Pro
805 810 815

Ser Asp Glu Asn Gln Gly Lys Arg Gln Lys Lys Glu Ile Thr His Glu

820 825 830

Lys Asn Asn Pro Cys Leu Met Asp Ile Asn Met Thr Gln Val His Leu

835 840 845

Gly Glu Glu Leu Gly Glu Phe Asn His Asn Gly Gly Glu Asp Ala Val

850 855 860

Asp Gly Ile Asn His Asn Gly Gly Glu Asp Ala Val Tyr Glu Ile Ser

865 870 875 880

His Ser Ala Ser Cys Gly Ser Pro Asp Gln Asp Met Glu Asn Met Pro

885 890 895

Val Gly Asn Asp Lys Glu Ser Thr Ser Thr Ile Val Gly Arg Gly Arg

900 905 910

Gly Lys Lys Ile Glu Ile Lys Leu Thr Arg Glu Glu Leu Gln Ser Tyr

915 920 925

Trp Ser Arg Asn Met Thr Val Glu Asp Val Ala Lys Asp Ile Asp Val
 930 935 940

Ser Arg Ser Thr Phe Lys Arg Trp Leu Lys Ala Ser Gly Ile Lys Trp
 945 950 955 960

Gln Thr Lys Pro Asn
 965

<210> 10

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 10

mtttccttaa accctaaacc ctarttaata tgttcacatt tttctrctaa ttagatctga 60

ataacttatg ccttttatgtt tatttttggt gttgtttatt tatgatttca ggattttrt 120

ttggtgatga tatcagaaag taattctctt ttgattgat tgagaattta aktttataga 180

atttgaagat ggcgtatagg c 201

<210> 11

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 11

mtttccttaa accctaaacc ctarttaata tgttcacatt tttctrctaa ttagatctga 60

ataacttatg ccttttatgt ttttttggt gttgtttatt gatgatttca ggattttrt 120

ttggtgatga ttcagaaag taattctctt ttgtattgat tgagaattta aktttataga 180

atttgaagat ggcgtatagg c 201

<210> 12

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 12

gtggcctgcc ttagtcggc tatctccctt ttctgggttc taatctccat catagcttca 60

aagaattggc cagtttatat ggtccaatct tcaaactccg kcttggaact aaagattgta 120

ttgtgatcac ctcacatca ctgtcaagg aggtggttag ggaccaagat gttgtgttcg 180

ctaaccgagg acacattatt g 201

<210> 13

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 13

gtggcctgcc tttagtcggc tatctccctt ttctgggttc taatctccat catagcttca 60

aagaattggc cagtttatat ggtccaatct tcaaactccg gcttggaact aaagattgta 120

tttgatcac ctacacatca ctgtcaagg aggtggttag ggaccaagat gttgtgttcg 180

ctaaccgagg acacattatt g 201

<210> 14

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 14

ctcaagctcc tgctcccatc gattatcggg attgttgctc tatttgtttt tgcttcatta 60

tgctgtaatt tgactgtttt tagggttttc tcttctcaat cgatcttgaa aattcaattt 120

ctataggaaa tgtkttgtaa ttgattycrg atttcragtg waattcggaa cttctgattt 180

aaagtttaat tttgtacaac t 201

<210> 15

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 15

ctcaagctcc tgctcccatc gattatcggg attgttgctc tatttgtttt tgcttcatta 60

tgctgtaatt tgactgtttt tagggttttc tcttctcaat tgatcttgaa aattcaattt 120

ctataggaaa tgtkttgtaa ttgattycrg atttcragtg waattcggaa cttctgattt 180

aaagtttaat tttgtacaac t 201

<210> 16

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (193)..(195)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 16

ttctcttttt ctctcttttg tcttttttcc agt gatwgtt tatattgcta gtggatatyt 60

acatcaaaca agtcacaagt ttctatactt agtgaagttt gtttttttgt tggattggtg 120

tttcttctcc tgtcttaatc tgggattgac aaatttagta acattttcat araacttctt 180

attaaacatc ctinntacaa g 201

<210> 17

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (193)..(195)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 17

ttctcttttt ctctcttttg tcttttttcc agtgatwggt tatattgcta gtggatatyt	60
acatcaaaca agtcacaagt ttctatactt agtgaagttt ttttttttgt tggattggtg	120
tttcttctcc tgtcttaatc tgggattgac aaatttagta acattttcat araacttctt	180
attaaacatc cttnntacaa g	201

<210> 18
 <211> 201
 <212> ДНК
 <213> Буряк звичайний

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (140)..(142)
 <223> n – це a, c, g, або t

<400> 18	
gagaaactag gaaacagtag caaggaaaac agcaayaatg agaatgattc aggtgctttg	60
aattacwtaa acaaccaaga gaaaaccaac attattgctg aaaatcatca agttaacaac	120
tgtaaggaac aaaacaatgn nnctgcttct acttcctcat tcatttccat tccatcaggt	180

aataatacta caatggctaa t 201

<210> 19

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (140)..(142)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 19

gagaaactag gaaacagtag caaggaaaac agcaayaatg agaatgattc aggtgctttg 60

aattacwtaa acaaccaaga gaaaaccaac attattgctg gaaatcatca agttaacaac 120

tgtaaggaac aaaacaatgn nnctgcttct acttcctcat tcatttccat tccatcaggt 180

aataatacta caatggctaa t 201

<210> 20

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (172)..(201)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 20

atgtagtatc ttctattgcc agagtcgaga tgctcagcga gaaactgcaa gtcaaacaat 60

tgatttgata aaggatcag tkgttgctga aacttcacga cagtttgta actttggact 120

aatttgatt tgttkgtaaa ctttacagta tctgatggag tttaacagca cnnnnnnnn 180

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn n 201

<210> 21

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (172)..(201)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 21

atgtagtatc ttctattgcc agagtgcaga tgctcagcga gaaactgcaa gtcaaacaat 60

tgatttgata aaggtatcag tkgttgctga aacttcatca tagtttgtk aactttggact 120

aatttgtatt tgttkgtaaa ctttacagta tctgatggag tttaacagca cnnnnnnnnn 180

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn n 201

<210> 22

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 22

ttagakcrag tacagtagat taaatgaaak macaaamaac atkcyaggc ctctttctct 60

gacmaaaatt cattagcacm ttgttcttgg aggaacatta aatagamacc amactgtcaa 120

taagcaamcc tcaamcagga agacatgtta ttgacagacc atwaaaagrt acactragcc 180

ttttggtgtc ctccrtttca t 201

<210> 23

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 23

ttagakcrag tacagtagat taaatgaaak macaaamaac atkcyaaggc ctctttctct 60

gacmaaaatt cattagcacm ttgttcttgg aggaacatta tatagamacc amactgtcaa 120

taagcaamcc tcaamcagga agacatgtta ttgacagacc atwaaaagrt acactragcc 180

ttttggtgtc ctccrttca t 201

<210> 24

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(36)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 24

```

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnacct cgaggtcgac ggtatccaag      60

agacccatca gataccgata ataccgttaa aatagttgtc actaataaca ctacaggcag      120

taattcagct ggaagcgggtt ccgctagcag gaatagcagt gggacgggtg agtcccatgt      180

cattgaagct ggaaatttgg t                                              201

```

<210> 25
 <211> 201
 <212> ДНК
 <213> Буряк звичайний

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(36)
 <223> n – це a, c, g, або t

```

<400> 25

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnacct cgaggtcgac ggtatccaag      60

agacccatca gataccgata ataccgttaa aatagttgtc gctaataaca ctacaggcag      120

taattcagct ggaagcgggtt ccgctagcag gaatagcagt gggacgggtg agtcccatgt      180

```

cattgaagct ggaaatttgg t 201

<210> 26

<211> 98

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 26

ccccctgcac tcattcatcc aacttgaagc tagcaggaaa agaacacgaa tccccctctag 60

atcggatttc ttaccaact tcttactcca gaaacttc 98

<210> 27

<211> 98

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 27

ccccctgcac tcattcatcc aacttgaagc tagcaggaaa agaacatgaa tccccctctag 60

atcggatttc ttaccaact tcttactcca gaaacttc 98

<210> 28

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 28

ttttaattga tgtgatagat ggttggtgct gcgttggtat gaatggagat gtggttgctc	60
aaggctccca attttcattg aaagaygtgg aggttggtatt cgctcaagtg gaccttgatg	120
ctgtaagttc grttatttgg tttttagatt cttacctagt tacctgcttt ttttgctatt	180
attttggggg tccttccttt g	201

<210> 29

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 29

ttttaattga tgtgatagat ggttggtgct gcgttggtat gaatggagat gtggttgctc	60
aaggctccca attttcattg aaagaygtgg aggttggtatt tgctcaagtg gaccttgatg	120
ctgtaagttc grttatttgg tttttagatt cttacctagt tacctgcttt ttttgctatt	180
attttggggg tccttccttt g	201

<210> 30

<211> 116

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 30

gtaacaagat ccsaaatgat aatttcgttt ttcaaatcaa cgtaaaarta ttatcgacta 60

gactatacca tattatacct taacaaaatc aactyatgaa caaaccccta cccaac 116

<210> 31

<211> 116

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 31

gtaacaagat ccsaaatgat aatttcgttt ttcaaatcaa cgtaaaarta ttatcggcta 60

gactatacca tattatacct taacaaaatc aactyatgaa caaaccccta cccaac 116

<210> 32

<211> 144

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 32

sstcaaaatt tcgatttcaa ataktcatatc rgagrgagga gaggttgaaa acattaatga 60

ggataagtta caaatgtcta ttatacttat gattgtgaat cacatcgga tggccttgga 120

aataaaattg agatactaca gaga 144

<210> 33

<211> 144

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 33

sstcaaaatt tcgatttcaa ataktcatatc rgagrgagga gaggttgaaa acattaatga 60

ggataagtta caaatgtcta ttatacttat gattgtgaat gacatcgga tggccttgga 120

aataaaattg agatactaca gaga 144

<210> 34

<211> 120

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 34

ttatatattgc acatgatttt cattcttgct ttscatcttt taggccaaca ttcacgga 60

tatgcaagaa gaagacgggtg gaacaatayt cgccagtgcc atacttagcc acatttgtga 120

<210> 35

<211> 120

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 35

ttatatattgc acatgatttt cattcttgct ttscatcttt taggccaaca tttacgga 60

tatgcaagaa gaagacgggtg gaacaatayt cgccagtgcc atacttagcc acatttgtga 120

<210> 36

<211> 120

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 36

caccctaata gcatttttagt ggtgacaatc aatggagctg ggttttttat tgaactgctt 60

tacttgatac tcttytgct ttactctgas aaaaagaata ggctcaaat tgtgttgatt 120

<210> 37

<211> 120

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 37

caccctaata gcatttttagt ggtgacaatc aatggagctg ggttttttat tgaattgctt 60

tacttgatac tcttytgct ttactctgas aaaaagaata ggctcaaat tgtgttgatt 120

<210> 38

<211> 95

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 38

atatcaagtt cgaaaacaca ccaccaaccc agagcaacgc ccggacccaa atattaatag 60

aacaaaaaga tgcgaaaat aattagaatt tgctg 95

<210> 39

<211> 95

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 39

atatcaagtt cgaaaacaca ccaccaaccc agagcaacgc ccgggcccaa atattaatag 60

aacaaaaaga tgcgaaaat aattagaatt tgctg 95

<210> 40

<211> 135

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 40

agcagaaaga gtatggcagc aacagcaaaa tagtatcttc cwrtttaggt tcaatcttgg 60

gtaaaagggtg tattcattta tgtcaacact atgatttagt attattwgtw tgaattgcc 120

tgtgattgtt agctt 135

<210> 41

<211> 135

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 41

agcagaaaga gtatggcagc aacagcaaaa tagtatcttc cwrtttaggt tcaatcttgg 60

gtaaaagttg tattcattta tgtcaacact atgatttagt attattwgtw tgaattgcca 120

tgtgattggt agctt 135

<210> 42

<211> 148

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 42

tggcagaaaa tctggatgtc ataccagcag cactcatagc gaatctagga gatgggtttg 60

gacaaggctg gtttaccag ctatgttctg gtatgacttc atccacattg gcctcagcaa 120

ctgagacaca aagatttcgt aaatcttt 148

<210> 43

<211> 148

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 43

tggcagaaaa tctggatgtc ataccagcag cactcatagc gaatctagga gatgggtttg 60

gacaaggctg gtttatccag ctatgttctg gtatgacttc atccacattg gcctcagcaa 120

ctgagacaca aagatttcgt aaatcttt 148

<210> 44

<211> 170

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 44

ttgatgtccc ggcacttact tcccgggacc cactaggcgc tttagayaca aaccgtttt 60

kctctggaat cttttcttca tgacttgatg ccgccctgcc actggtctgc ccattaactc 120

taggactaaa ctgtggcaty tcacttcttt catcyggaag gtcacaggt 170

<210> 45

<211> 170

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 45

ttgatgtccc ggcacttact tcccgggacc cactaggcgc tttagayaca aaccgtttt 60

kctctggaat cttttcttca tgacttgatg ccgccctgcc actggtctgc ccattaactc 120

taggactaaa ctgtggcaty tcatttcttt catcyggaag gtcatcaggt 170

<210> 46

<211> 139

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (76)..(76)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 46

cattacktat tggattgtga tgaaaagtta twaaggaaaa ctcatgtttt atgatgaaat 60

ttcattacaa aggganwtga tactagaact tctctacaaa tttaactaa actatattcc 120

cattaccatt aatgaccac 139

<210> 47

<211> 139

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (76)..(76)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 47

cattacktat tggattgtga tgaaaagtta twaaggaaaa ctcatgtttt atgatgaaat 60

ttcattacga aggganwtga tactagaact tctctacaaa ttacactaa actatattcc 120

cattaccatt aatgaccac 139

<210> 48

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 48

tcacaatcca atmcgtaatg gaattaggaa gaaaatggat atctgagaag gagatagcat 60

taccatgagt aatgacaggt ttgtttaac aaatttatac cacaatgtat taccattacc 120

accatttatg accactaacc aaacgagtag ttaagggcaa tacctcaatg cctctccat 180

cacaatgayg tctccagttr c 201

<210> 49

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 49

tcacaatcca atmcgtaatg gaattaggaa gaaaatggat atctgagaag gagatagcat 60

taccatgagt aatgacaggt ttgtttaac aaatttatac tacaatgtat taccattacc 120

accatttatg accactaacc aaacgagtag ttaagggcaa tacctcaatg cctctccat 180

cacaatgayg tctccagttr c 201

<210> 50

<211> 125

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 50

gacacataat gtatgccaat tcatgtatgg tctttcattg gatttagyca cgggaatcgt 60

tgtttttcat ctgcaatatc tgtagakmar aatgagkaat gwgagttaag agggattgtc 120

agaag 125

<210> 51

<211> 125

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 51

gacacataat gtatgccaat tcatgtatgg tctttcattg gatttagyca ctggaatcgt 60

tgtttttcat ctgcaatata ttagakmar aatgagkaat gwagagtaag agggattgtc 120

agaag 125

<210> 52

<211> 178

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 52

gaagaagatt tcgagtcagg gtttaggatt tacwctcta gataactttg atgtatcatt 60

tataatcaaa gagaggatga cacaggcact tcggtatttc aaaraatcaa ctgaacaaaa 120

tcagatttta gctcagattt gggcacctgt aaagagtggg gatcattatg tgttaaca 178

<210> 53

<211> 178

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 53

gaagaagatt tcgagtcggg gtttaggatt tacwcctcta gataactttg atgtatcatt 60

tataatcaaa gagaggatga cacaggcgct tcggtatttc aaaraatcaa ctgaacaaaa 120

tcagatttta gctcagattt gggcacctgt aaagagtggg gatcattatg tgttaaca 178

<210> 54

<211> 149

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 54

agctacttta aacatcttaa gcatacttta acttgataat ccatctggat tagttagtga 60

tcgtgaattc gtgattcttt taccacccc caccmcaaat ctaactcaaa gtaatctgaa 120

agattttaga tagatggta taattcaag 149

<210> 55

<211> 141

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 55

agctacttta aacatcttaa gcatacttta acttgataat ccatctggat tagttagtga 60

tcgtgattct tttaaccac cccaccmcaa atctaactca aagtaatctg aaagatttta 120

gatagatggt tataattcaa g 141

<210> 56

<211> 89

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 56

tgtagatta tcaggagtct ttctttacaa aatgatataa atcattgtca tgactaaggt 60

tgagacttga gcaaaatagt cagtgattc 89

<210> 57

<211> 89

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 57

tgtagcatta tcaggagtct tttcttaca aatgatatta atcattgtca tgactaaggt 60

tgagacttga gcaaaatagt cagtgattc 89

<210> 58

<211> 167

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 58

tgattccact tgcctacagc atmaaaaaga agaacaagc aggagaaacc aacacttact 60

tggatggcat ctatctctc ttcacctatt tcactaaacc cgaatccatt tcaartctkg 120

agaccatact ccaarccgac gacgatgtca taaggatcagc aagcttc 167

<210> 59

<211> 167

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 59

tgattccact tgcctacagc atmaaaaaga agaacaaagc aggagaaacc aacacttact 60

tgatggcat ctatctcctc ttcacctatt tactaaaacc tgaatccatt tcaartctkg 120

agaccatact ccaarccgac gacgatgtca taaggtcatc aagcttc 167

<210> 60

<211> 143

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 60

gatacttaca ccatrattha gaaggacaaa ttagcagatt tstmagggtt aggtctaact 60

gaaccaccay wwactagctg gtgttaaaac ggtacactat cgttatttgt tacctatata 120

aggtgggtgtg gacttggtga tat 143

<210> 61

<211> 143

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 61

gatacttaca ccatrattta gaaggacaaa ttagcagatt tstmagaggtt aggtctaact 60

gaaccaccay wwactagctg gtgttaaaat ggtacactat cgttatttgt tacctatata 120

aggtggtgtg gacttggtga tat 143

<210> 62

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 62

cttccaacgt cgtgcmittt ttggatgtcc atcatctttt atccagcccg aawtgcctga 60

acttagcccc aattatgtag taaagaagcc cattgggtca atrgagaytc ttgawttggc 120

ccatcgtgtt gctgcgtgta rctatgagaa ccayaatgsa tggggcataa aggtaagcac 180

ataraaagtt gtmittcatta t 201

<210> 63

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 63

cttccaacgt cgtgcmittt ttggatgtcc atcatctttt atccagcccg aawtgcctga 60

acttagcccc aattatgtag taaagaagcc cattgggtca gtrgagaytc ttgawttggc 120

ccatcgtgtt gctgcgtgta rctatgagaa ccayaatgsa tggggcataa aggtaagcac 180

ataraaagtt gtmmtcatta t 201

<210> 64

<211> 199

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(11)

<223> n – це a, c, g, або t

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(25)

<223> n – це a, c, g, або t

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)..(30)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 64

tttagtgann naagcgtctt tttnnnnnnn cccttrggaa tggatgggct tttgggccca 60

aattatgtgg gyactggatg cttcttccaa cgtcgtgcat tctttggatg tccatcatct 120

tttatccagc ccgaawtgcc tgaacttagc cccaattatg tagtaaagaa gcccatggg 180

tcartrgaga ytcttgawt 199

<210> 65

<211> 199

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(11)

<223> n – це a, c, g, або t

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(25)

<223> n – це a, c, g, або t

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)..(30)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 65

tttagtgann naagcgtctt tttnnnnnnn cccttrggaa tggatgggct tttgggccca 60

aattatgtgg gyactggatg cttcttccaa cgtcgtgcct tctttggatg tccatcatct 120

tttatccagc ccgaawtgcc tgaacttagc cccaattatg tagtaaagaa gcccatggg 180

tcartrgaga ytcttgawt 199

<210> 66

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 66

gtcgacggta tcccccaat aattcacctc atgctgctcg ttctgctttt gatttcttca 60

aatgggtttc ctctaaatcc ccycwtttc agctcactga cgaggtagtg tcttttttcg	120
ttgattatit ttgtcgtagg aaggatttta agataattca tgatgtactt gttggaggta	180
atgggtgaat tggtttcama a	201

<210> 67
 <211> 201
 <212> ДНК
 <213> Буряк звичайний

<400> 67	
gtcgacggta tcccccaat aattcacctc atgtgctcg ttctgctttt gatttcttca	60
aatgggtttc ctctaaatcc ccycwtttc agctcactga tgaggtagtg tcttttttcg	120
ttgattatit ttgtcgtagg aaggatttta agataattca tgatgtactt gttggaggta	180
atgggtgaat tggtttcama a	201

<210> 68
 <211> 201
 <212> ДНК
 <213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(12)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 68

tgggannnnn nncatgagat gtcattgcat adgagtmaag tggcttgga caaatatatg 60

gatgcattta ygttcatttt atggcaattt tggatataac aagaaataaa caaatgcrgt 120

gttcaaaggc tttttgaggc aaggtaaattg gtgccaagta ccygckctac gttacaagtt 180

acgtcgcttt tcctaagaay g 201

<210> 69

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(12)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 69

tgggannnnn nncatgagat gtcattgcat adgagtmaag tggcttggaa caaatatatg 60

gatgcattta ygttcatttt atggcaattt tggatataac gagaaataaa caaatgcrgt 120

gttcaaaggc tttttgaggc aaggtaaatt gtgccaagta ccygckctac gttacaagtt 180

acgtcgcttt tcctaagaay g 201

<210> 70

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> n – це a, c, g, або t

<220>

<221> misc_feature

<222> (42)..(45)

<223> n – це a, c, g, або t

<220>

<221> misc_feature

<222> (173)..(178)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 70

gtaatagagg tgatccnnga ygtgtataca ttttcacaca ynnnngcctt taatatattt 60

gtatakattc tagttgtttt atgaggctaa aacaaaacta aattagccag caaayacact 120

aattagtcac atagcacctg aatccaataa atgraccact acactaacat atnnnnnnac 180

tatcatcctt tgctaatagca c 201

<210> 71

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> n – це a, c, g, або t

<220>

<221> misc_feature

<222> (42)..(45)

<223> n – це a, c, g, або t

<220>

<221> misc_feature

<222> (173)..(178)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 71

gtaatagagg tgatccnnga ygtgtatata ttttcacaca ynnnngcctt taatatattt 60

gtatakattc tagttgtttt atgaggctaa aacaaaacta gattagccag caaayacact 120

aattagtcac atagcacctg aatccaataa atgraccact acactaacat atnnnnnnac 180

tatcatcctt tgctaatagca c 201

<210> 72

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(28)

<223> n – це a, c, g, або t

<220>

<221> misc_feature

<222> (163)..(163)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 72

atgraccact acactaacat atnnnnnnac tatcatcctt tgctaatgca ctgcccctaa 60

aatggccttaa aacaagcacg cagtcttaac attgcctata cattaatatg tastatactc 120

gtgtctsgag gataaacaca aaatttttagc cayaagctag ctncattgga attttagcaa 180

cttaagrarc taattttgcc a 201

<210> 73

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(28)

<223> n – це a, c, g, або t

<220>

<221> misc_feature

<222> (163)..(163)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 73

atgraccact acactaacat atnnnnnnac tatcatcctt tgctaatagca ctgcccctaa 60

aatggccttaa aacaagcacg cagtcttaac attgcctata tattaatatg tastatactc 120

gtgtctsgag gataaacaca aaattttagc cayaagctag ctncattgga attttagcaa 180

cttaagrarc taattttgcc a 201

<210> 74

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n – це a, c, g, або t

<220>

<221> misc_feature

<222> (58)..(61)

<223> n – це a, c, g, або t

<220>

<221> misc_feature

<222> (63)..(66)

<223> n – це a, c, g, або t

<220>

<221> misc_feature

<222> (118)..(118)

<223> n – це a, c, g, або t

<220>

<221> misc_feature

<222> (140)..(143)

<223> n – це a, c, g, або t

<220>

<221> misc_feature

<222> (145)..(164)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 74

gctagctnca ttggaatttt agcaacttaa grarctaatt ttgccaaata attagggnnn

60

```

ncnnnnaatg agttragaca gttcgcgagc tattcraact cgactcgrtc aaagctcnaa      120

wcgaatagtc gagckhgmwn nnnwnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnctcgac aggttaacga      180

gtcgagtcga gcaactcaat a                                                  201

```

<210> 75
 <211> 201
 <212> ДНК
 <213> Буряк звичайний

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n – це a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (58)..(61)
 <223> n – це a, c, g, або t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (63)..(66)

<223> n – ce a, c, g, a6o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (118)..(118)

<223> n – ce a, c, g, a6o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (140)..(143)

<223> n – ce a, c, g, a6o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (145)..(164)

<223> n – ce a, c, g, a6o t

<400> 75

gctagctnca ttggaatttt agcaacttaa grarctaatt ttgccaaata attagggnnn 60

ncnnnnaatg agttragaca gttcgcgagc tattcraact tgactcgrtc aaagctcnaa 120

wcgaatagtc gagckhgmwn nnnwnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnctcgac aggttaacga 180

gtcgagtcga gcaactcaat a 201

<210> 76
 <211> 201
 <212> ДНК
 <213> Буряк звичайний

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (157)..(157)
 <223> n – це a, c, g, або t

<400> 76
 ttatttaawt ttgccattt tratgktcc ttaatttctg ggtttgtgtt ttcgtttgt 60
 ttttattcat acccattttg taatttgtga ttttaggcaa caccagttg ttcmttttcc 120
 ctgattgttt ttggattaca aytggggacc attttangtt ttccttgatt acttcttaat 180
 tatattgttt tattatggta t 201

<210> 77
 <211> 201
 <212> ДНК
 <213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (157)..(157)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 77

ttatttaawt ttgccatth ttatgktcc ttaatttctg ggtttggtt ttcgtttgt 60

ttttattcat acccatttg taatttgta ttttaggcaa gaccagttg ttcmtttcc 120

ctgattgttt ttggattaca aytgggacc attttangtt ttccttgatt acttctaat 180

tatattgttt tattatggta t 201

<210> 78

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 78

accagcttaa ttctgccagt cgcctcctgg ctatgtgtag agtggatagc cttcgtccat 60

tctaaacctt atttacatta agtacataat acttggacct ccgtcgctgg cttgtaatgt 120

tgtagtctc caagtttggc aaatttgatg aaacatggga agtctatgag ggtttatctg 180

gtttagtggg ggaattgaag t 201

<210> 79

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 79

accagcttaa ttctgccagt cgcctcctgg ctatgtgtag agtggatagc cttcgtccat 60

tctaaacctt atttacatta agtacataat acttggacct tcgtcgcggg cttgtaatgt 120

tgttagtctc caagtttggc aaatttgatg aaacatggga agtctatgag ggtttatctg 180

gtttagtggg ggaattgaag t 201

<210> 80

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 80

gtattagtta tgttttgatg tathtagttt tttaaactcat tcagcgatgg gcggcactgc 60

caggtgaact acctcctatt gatgattgtg atgtcgatga ctgggttcca cgatttacag 120

tcctgcaagg atcctgtatt ttcttctacc tgtcatctac aggtaatacc ctggtgcatt 180

tacttcaaaa aaaaaaatta t 201

<210> 81

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 81

gtattagtta tgttttgatg tatttagttt tttaaactcat tcagcgatgg gcggcactgc 60

caggtgaact acctcctatt gatgattgtg atgtcgatga ttgggttcca cgatttacag 120

tcctgcaagg atcctgtatt ttcttctacc tgtcatctac aggtaatacc ctggtgcatt 180

tacttcaaaa aaaaaaatta t 201

<210> 82

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (90)..(90)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 82

aaagttccat gttcarttcc atcccygccs cratgagtaa cgtattyaaa tmtgtygcyg 60

caccctcttc ataccacact catcaccn atcaaytath caaacttgca agagtgcata 120

tyttccacct taaacacatt mtgccacaay ataataat awaaaaaktg taatattaat 180

aagtytagag actkstttaa y 201

<210> 83

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<220>

<221> misc_feature

<222> (90)..(90)

<223> n – це a, c, g, або t

<400> 83

aaagttccat gttcarttcc atcccygccs cratgagtaa cgtattyaaa tmtgtygcyg 60

cacccacttc ataccacacct catcaccccn atcaaytath taaacttgca agagtgc aaa 120

tyttccacct taaacacatt mtgccacaay ataataat awaaaaaktg taatattaat 180

aagtytagag actkstttaa y 201

<210> 84

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 84

tattagtact ctccagcagc tctatgatga gccaggaca actaggacag ccaggaggac 60

caggcattcc atgtagtcag gtggctaacg agytgttgcc atgtttatct taccttgacg 120

aacaaaccac atcacctcg agctcttgct gccaggagac taagtatgtc tggaagcatt 180

atgggagagg aaagagcгаа a 201

<210> 85

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 85

tattagtact ctccagcagc tctatgatga gccaaaggaca actaggacag ccaggaggac	60
caggcattcc atgtagtcag gtggctaacg agytgttgcc gtgtttatct taccttgacg	120
aacaaaccac atcacccctcg agctcttgct gccaaaggac taagtatgtc tggaagcatt	180
atgggagagg aaagagcgaa a	201

<210> 86

<211> 201

<212> ДНК

<213> Буряк звичайний

<400> 86

agctywtcta ttagtactct ccagcagctc tatgatgagc caaggacaac taggacagcc	60
aggaggacca ggcattccat gtagtcaggc ggctaacgag ctgttgccrt gtttatctta	120
ccttgacgaa caaaccacat caccctcgag ctcttgctgc caagggacta agtatgtctg	180
gaagcattat gggagaggaa a	201

<210> 87

<211> 201

<212> ДНК

<213> Бурак звичайний

<400> 87

agctywtcta ttagtactct ccagcagctc tatgatgagc caaggacaac taggacagcc 60

aggaggacca ggcattccat gtagtcaggt ggctaacgag ttgttgccrt gtttatctta 120

ccttgacgaa caaaccacat caccctcgag ctcttgctgc caagggacta agtatgtctg 180

gaagcattat gggagaggaa a 201

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Нуклеотидна послідовність для підвищення стійкості до нематоди роду *Heterodera* у рослини *Beta vulgaris*, в якій експресується нуклеотидна послідовність, при цьому нуклеотидна послідовність вибрана з групи, що складається з:
 - (a) нуклеотидної послідовності, яка містить послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 1 і 4;
 - 10 (b) нуклеотидної послідовності, яка містить кодуючу послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 2 і 5;
 - (c) нуклеотидної послідовності, що містить послідовність, яка щонайменше на 90 % ідентична нуклеотидній послідовності за будь-яким з (a), (b), (d) або (e);
 - (d) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид з амінокислотною послідовністю, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 3 і 6;
 - 15 (e) нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид з амінокислотною послідовністю, яка щонайменше на 94 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 3 і 6;
- де суворі умови визначені як гібридизація в 4xSSC при 65 °C та подальше багаторазове промивання в 0,1xSSC при 65 °C протягом приблизно 1 години загалом.
- 20 2. Вектор або експресійна касета, що містить нуклеотидну послідовність за п. 1.
3. Клітина рослини *Beta vulgaris*, яка містить нуклеотидну послідовність за п. 1 або вектор, або експресійну касету за п. 2.
4. Насіння рослини *Beta vulgaris*, що містить нуклеотидну послідовність за п. 1, вектор або експресійну касету за п. 2, або клітину за п. 3, де рослина не належить *Beta vulgaris* subsp. *maritima*.
- 25 5. Насіння за п. 4, при цьому насіння, яке було піддано обробці, вибране з групи, що складається з:
 - (a) шліфування;
 - 30 (b) інкрустації;
 - (c) забарвлення.
6. Спосіб підвищення стійкості до нематоди роду *Heterodera* у рослини *Beta vulgaris*, що включає наступні етапи:
 - (i) інтеграція нуклеотидної послідовності за п. 1 за допомогою репарації, що спрямовується гомологією, або гомологічної рекомбінації, в геном щонайменше однієї клітини рослини *Beta vulgaris* і регенерація рослини з рослинної клітини; або
 - 35 (ii) збільшення експресії поліпептиду, що кодується нуклеотидною послідовністю за п. 1, в рослині, шляхом модифікації нативного промотору або шляхом злиття нуклеотидної послідовності з гетерологічним промотором, який виявляє більш високу активність порівняно з нативним промотором; або
 - 40

(iii) трансформація рослинної клітини *Beta vulgaris* за допомогою нуклеотидної послідовності за п. 1 або вектора, або експресійної касети за п. 2, і регенерація трансгенної рослини з трансформованої рослинної клітини.

7. Спосіб отримання рослини *Beta vulgaris*, що має стійкість до нематоди роду *Heterodera*, що включає наступні етапи:

(a) трансформація рослинної клітини *Beta vulgaris* за допомогою нуклеотидної послідовності за п. 1 або вектора, або експресійної касети за п. 2; і

(b) регенерація трансгенної рослини з трансформованої рослинної клітини; або

(i) введення сайт-спрямованої нуклеази і матриці репарації в клітину рослини *Beta vulgaris*, при цьому сайт-спрямована нуклеаза здатна генерувати щонайменше один одноланцюговий розрив або щонайменше один дволанцюговий розрив ДНК в геномі клітини, проти перебігу і/або по перебігу транскрипції від цільової ділянки, і матриця репарації містить нуклеотидну послідовність за п. 1;

(ii) культивування клітини *Beta vulgaris* за (i) в умовах, які забезпечують репарацію, що спрямовується гомологією, або гомологічну рекомбінацію, при цьому нуклеотидна послідовність інтегрується з матриці репарації в геном рослини; і

(iii) регенерація рослини з клітини, модифікованої за (ii); або

(I) введення сайт-спрямованої нуклеази або редактора основ у клітину рослини *Beta vulgaris*, в якій сайт-спрямована нуклеаза генерує щонайменше один одноланцюговий розрив або щонайменше один дволанцюговий розрив ДНК в геномі клітини, проти перебігу транскрипції, протягом перебігу транскрипції або в межах цільової ділянки, яка гомологічна нуклеотидній послідовності за п. 1,

(II) культивування клітини з п. (I) в умовах, які допускають модифікацію цільової ділянки, що вибирається з:

(1) заміни щонайменше одного нуклеотиду;

(2) делеції щонайменше одного нуклеотиду;

(3) вставки щонайменше одного нуклеотиду; або

(4) будь-якої комбінації (1)-(3); і

(III) регенерація рослини з клітини, модифікованої в (II).

8. Спосіб за п. 7, який **відрізняється** тим, що цільова ділянка:

а) знаходиться між маркером s5e3001s02, відповідно до SEQ ID NO: 10 або SEQ ID NO: 11, і маркером s5e4668xxx, відповідно до SEQ ID NO: 12 або SEQ ID NO: 13, або

б) фланкована маркером s5e3001s02, відповідно до SEQ ID NO: 10 або SEQ ID NO: 11, і маркером s5e4668xxx, відповідно до SEQ ID NO: 12 або SEQ ID NO: 13, або

В) містить хромосомний інтервал між маркером s5e3001s02, відповідно до SEQ ID NO: 10 або SEQ ID NO: 11, і маркером s5e4668xxx, відповідно до SEQ ID NO: 12 або SEQ ID NO: 13.

9. Спосіб за п. 7 або 8, який **відрізняється** тим, що щонайменше один одноланцюговий розрив або щонайменше один дволанцюговий розрив відбувається в позиції, яка знаходиться максимум на 10000 пар основ проти перебігу транскрипції і/або по перебігу транскрипції щодо цільової ділянки.

10. Спосіб ідентифікації і селекції рослини *Beta vulgaris*, стійкої до нематоди роду *Heterodera*, який **відрізняється** тим, що включає щонайменше етап (i) або (ii):

(i) виявлення присутності і/або експресії нуклеотидної послідовності за п. 1 у рослині *Beta vulgaris* або частині рослини; і/або

(ii) виявлення щонайменше однієї ділянки, косягрованої в межах нуклеотидної послідовності за п. 1; і

(iii) селекція рослини, що має стійкість до нематоди роду *Heterodera*.

11. Рослина, отримана з дражованого і/або праймерованого насіннєвого матеріалу за одним з пп. 4-5.

12. Спосіб культивування рослин *Beta vulgaris*, стійких до нематоди роду *Heterodera*, що включає:

(i) отримання рослини *Beta vulgaris* за п. 11 або насіння за одним з пп. 4-5, отримання рослини способом за одним з пп. 7-9 або ідентифікацію і селекцію рослин способом за п. 10, та

(ii) вирощування рослин з п. (i) або їхніх нащадків,

при цьому цей спосіб протидіє зараженню культурних рослин *Beta vulgaris* нематодою роду *Heterodera*.

13. Олігонуклеотид довжиною щонайменше 15, 16, 17, 18, 19 або 20 нуклеотидів, при цьому специфічно гібридується з нуклеотидною послідовністю, визначеною за п. 1, і в якій олігонуклеотид прямо або опосередковано пов'язаний з флуорохромом.

14. Олігонуклеотид за п. 13, в якому флуорохром являє собою карбоксифлуоресцеїн (FAM) або гексахлорфлуоресцеїн (HEX).

15. Суміш олігонуклеотидів, в якій олігонуклеотиди придатні для гібридизації як прямий праймер та зворотний праймер до ділянки в геномі *Beta vulgaris*, яка косягредується в *Beta vulgaris* зі стійкістю до нематоди роду *Heterodera*, що надається нуклеотидною послідовністю за п. 1 або вектором, або експресійною касетою за п. 2.

16. Молекулярний маркер, олігонуклеотид або праймер, що містять послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 10-87.

17. Молекулярний маркер, олігонуклеотид або праймер, отримані з молекулярного маркера, олігонуклеотиду або праймера за п. 16, причому молекулярний маркер, олігонуклеотид або праймер придатні для селекції рослини, що містить нуклеотидну послідовність за п. 1.

18. Молекулярний маркер, олігонуклеотид або праймер за п. 16 або 17, що містять одну або кілька хімічних модифікацій або приєднань, вибраних з групи, що складається з: нуклеотидів з видаленою азотистою основою; нуклеотидів 8'охо dA і/або 8'охо dG; зворотної основи на їхньому 3'-кінці; 2'О-метильних нуклеотидів; 5'-кінцевого кепа; модифікації остова, вибраної з групи, що складається з модифікації фосфотіоату, модифікації метилфосфонату, модифікації закритої нуклеїнової кислоти (LNA), модифікації O-(2-метоксіетил) (MOE), модифікації ді PS та модифікації пептидної нуклеїнової кислоти (PNA); внутрішньотяжових містків; флуоресцентних барвників, кон'югованих із ними; флуоресцентних барвників, кон'югованих з ними на 5'- або 3'-кінці GRON; та однієї або кількох основ, які збільшують енергію гібридизації; 2'О-метильних нуклеотидів на їхньому 5'-кінці; 2'О-метильних нуклеотидів на їхньому 3'-кінці, флуоресцентного барвника, кон'югованого з їхнім 5'-кінцем, флуоресцентного барвника, кон'югованого з їхнім 3'-кінцем, залишків фосфотіоату на їхньому 5'-кінці, залишків фосфотіоату на їхньому 3'-кінці, 3'-блокуючих замісників, 5'-блокуючих замісників, як 3'-, так і 5'-блокуючих замісників.

