

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **022877**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2016.03.31

(21) Номер заявки
200901525

(22) Дата подачи заявки
2008.05.23

(51) Int. Cl. **C12N 15/82 (2006.01)**

(54) ПОЛИНУКЛЕОТИД ГЕНА СТРЕЛКОВАНИЯ В САХАРНОЙ СВЕКЛЫ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **07108777.9**

(32) **2007.05.23**

(33) **EP**

(43) **2010.10.29**

(86) **PCT/EP2008/056390**

(87) **WO 2008/142167 2008.11.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЗИНГЕНТА ПАРТИСИПЕЙШНС АГ
(CH)**

(72) Изобретатель:
**Гилен Йоханнес Якобус Лудгерус (FR),
Крафт Томас, Пин Пьерр (SE)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Пивницкая Н.Н.,
Кузенкова Н.В., Веселицкий М.Б.,
Каксис Р.А., Комарова О.М., Белоусов
Ю.В. (RU)**

(56) GAAFAR R.M. ET AL.: "Bacterial artificial chromosome-derived molecular markers for early bolting in sugar beet". THEORETICAL AND APPLIED GENETICS; INTERNATIONAL JOURNAL OF PLANT BREEDING RESEARCH, SPRINGER-VERLAG, BE, vol. 110, no. 6, 1 April 2005 (2005-04-01), p. 1027-1037, XP019321879, ISSN: 1432-2242, cited in the application the whole document

HOHMANN U. ET AL.: "A bacterial artificial chromosome (BAC) library of sugar beet and a physical map of the region encompassing the bolting gene B". MGG MOLECULAR GENETICS AND GENOMICS, vol. 269, no. 1, April 2GG3 (2003-04), p. 126-136, XP002487656, ISSN: 1617-4615, the whole document

EL-MEZAWY A. ET AL.: "High-resolution mapping of the bolting gene B of sugar beet". THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, vol. 105, no. 1, July 2002 (2002-07), p. 100-105, XP002487538, ISSN: 0040-5752, the whole document

ABE JUN ET AL.: "A marker-assisted analysis of bolting tendency in sugar beet (Beta vulgaris L.)". EUPHYTICA, vol. 94, no. 2, 1997, p. 137-144, XP002487539, ISSN: 0014-2336, cited in the application the whole document

WO-A-2007122086

WO-A-2007005305

(57) В заявке описаны полинуклеотиды, которые близко сцеплены с обуславливающим стрелкование геном или геном В в геноме сахарной свеклы и которые можно применять для создания молекулярных маркеров. В заявке описаны также молекулярные маркеры и наборы, содержащие указанные маркеры, которые можно применять для картирования, идентификации и выделения обуславливающего стрелкование гена или гена В в геноме сахарной свеклы, и для того, что различать характерный для однолетнего и характерный для двулетнего типа развития генотип или различные гаплотипы в группах растений сахарной свеклы, имеющих характерный для двулетнего типа развития генотип. В заявке описаны также анализы и способы селекции растений сахарной свеклы с использованием указанных маркеров.

B1**022877****022877****B1**

Настоящее изобретение относится к селекции с помощью маркеров и контролю качества семян сахарной свеклы. В частности, изобретение относится к полинуклеотидам, которые близко сцеплены или находятся в гене *bolting* (ген, обуславливающий стрелкование, ген, определяющий одно-двулетний тип развития) или гене В в геноме сахарной свеклы и которые можно применять для создания молекулярных маркеров. Изобретение относится также к молекулярным маркерам и наборам, содержащим указанные маркеры, которые можно применять для картирования, идентификации и выделения обуславливающего стрелкование гена или гена В в геноме сахарной свеклы и для того, что различать характерный для однолетнего и характерный для двулетнего типа развития генотип и различные гаплоидные генотипы (гаплотипы) в группах растений сахарной свеклы, которые имеют характерный для двулетнего типа развития генотип. Изобретение относится также к трансгенным подходам, с помощью которых получают трансгенные растения, у которых ген В либо сверхэкспрессируется, либо регулируется по типу отрицательной связи.

Окультуренная сахарная свекла (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* L.) представляет собой двулетнее растение, которое в первый год образует запасающий корень и листовую розетку. Удлинение побега (стрелкование) и образование цветка начинается после периода низкой температуры. В противоположность этому, для многих диких свекловых рода *B. vulgaris* ssp. *maritima* характерен однолетний тип развития в результате присутствия обуславливающего стрелкование гена В в В-локусе, который картирован в центральной области хромосомы II. Доминантный аллель В-локуса часто встречается у различных диких видов свекловых, и он вызывает стрелкование в течение периодов с длинным световым днем и у таких растений отсутствует необходимость в низких температурах, которые, как правило, требуются для двулетних культиваров (Abe и др., 1997), несущих рецессивный аллель.

Стрелкование (удлинение побега) является первой хорошо заметной стадией перехода от вегетативного к репродуктивному росту.

У окультуренной сахарной свеклы стрелкование является нежелательным явлением, поскольку оно приводит к снижению урожая и к проблемам в процессе сбора урожая и при экстракции сахара. Из-за неполной пенетрантности В-аллеля и его зависимости от окружающей среды при селекции линий растений существует потребность в близко сцепленных с ним молекулярных маркерах для осуществления скрининга по признаку его присутствия. Производство семян сахарной свеклы для продажи часто осуществляют в регионах, в которых произрастают однолетние сорные виды свекловых, что может вызывать загрязнение образующихся семян пылью этих растений, приводя к присутствию генотипа, характерного для однолетнего типа развития, в предназначенных для продажи семенах. Это является неприемлемым для покупателей. Для выявления загрязнения характерным для однолетнего типа развития генотипом партии предназначенных для продажи семян выращивают в регионах, в которых однолетние виды свекловых не вырастают непосредственно после сбора семян. Растения являются неярковизированными и загрязняющие растения выявляют по наличию стрелок. Является очень желательной замена такого метода оценки основанным на применении маркеров скрининговым анализом, с помощью которого можно получать результаты за более короткий период времени, что должно приводить к снижению стоимости переработки семян.

Подход, основанный на применении маркеров, может оказаться также целесообразным для селекции сахарной свеклы, например, для ускорения процесса селекции, или для интродукции нового признака изменчивости, выбранного из множества диких видов свекловых. В этих случаях важно иметь маркер, близко сцепленный с геном В, для того, чтобы точно различать однолетний и двулетний типы развития.

В настоящем изобретении предложены пути создания указанных маркеров.

В частности, настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, прежде всего выделенному полинуклеотиду, идентифицированному в геноме сахарной свеклы, включая его варианты и производные, где полинуклеотид генетически близко сцеплен или предпочтительно локализован в обуславливающем стрелкование гене или гене В. Изобретение относится также к применению указанного полинуклеотида для создания маркеров, которые можно применять для картирования, идентификации и выделения обуславливающего стрелкование гена или гена В в геноме сахарной свеклы.

Один из объектов изобретения относится к полинуклеотиду, предлагаемому в изобретении, для которого характерна истинная косегрегация с фенотипом, ассоциированным с геном, обуславливающим стрелкование (геном В), у сахарной свеклы.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативные фрагменты, предлагаемый в изобретении и описанный выше, где полинуклеотид можно получать из области геномной ДНК, которая картирована на расстоянии 1 см против хода транскрипции относительно маркеров MP0176 и GJ01 и для которой характерна косегрегация с маркером GJ131, характеризующийся истинной косегрегацией с фенотипом, который ассоциирован с геном, обуславливающим стрелкование (геном В), у сахарной свеклы.

Другим вариантом осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативные фрагменты, прежде всего выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении и описанный выше, который можно получать из геномной ДНК, локализованной в области, которая ограничена мар-

керами GJ131 и GJ01.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, прежде всего выделенный полинуклеотид, который можно получать из геномной ДНК сахарной свеклы, связанный с обуславливающим стрелкование геном или геном В в геноме сахарной свеклы, и который содержит один или несколько из следующих элементов:

а) интронную область, которая позволяет получать продукт амплификации размером примерно 0,5 т.п.н. с помощью ПЦР-реакции с использованием "прямого" праймера PRR7-F и "обратного" праймера PRR7-R, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 соответственно, или пары праймеров, последовательности которых по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 98% и вплоть до 99% идентичны последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 соответственно, при применении геномной ДНК сахарной свеклы в качестве матрицы, прежде всего получать полинуклеотидный фрагмент, который имеет нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 3 или 4, или последовательность, которая по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 85%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 90% и по меньшей мере вплоть до 95-99% идентична указанной последовательности;

б) полинуклеотидный фрагмент, содержащий нуклеотидную последовательность, которая на 70%, предпочтительно на 75%, более предпочтительно на 80%, еще более предпочтительно на 85%, но наиболее предпочтительно на 90% и вплоть до 95-99% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 52;

в) полинуклеотидный фрагмент, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, или последовательность, которая на 70%, предпочтительна на 75%, более предпочтительно на 80%, еще более предпочтительно на 85%, но наиболее предпочтительно на 90% и вплоть до 95-99% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 51;

г) полинуклеотидный фрагмент, который после сплайсинга кодирует полипептид, последовательность которого по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 98% и вплоть до 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6, и необязательно также

д) высококонсервативный участок, кодирующий мотив домена-приемника регулятора псевдоответа (Pseudo Response Regulator Receiver Domain) (PRR), который расположен вблизи NH₂-конца, и мотив CCT на COOH-конце.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, прежде всего выделенный полинуклеотид, содержащий интронную область, которая позволяет получать продукт амплификации размером примерно 0,5 т.п.н. с помощью ПЦР-реакции с использованием "прямого" праймера PRR7-F и "обратного" праймера PRR7-R, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 соответственно, или пары праймеров, последовательности которых по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 98% и вплоть до 99% идентичны последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 соответственно, при применении геномной ДНК сахарной свеклы в качестве матрицы.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, прежде всего выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидный фрагмент, который имеет нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или последовательность, которая по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 85%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 90% и по меньшей мере вплоть до 95-99% идентична указанной последовательности.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, прежде всего выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидный фрагмент, который имеет нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 3 или 4, или последовательность, которая по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 85%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 90% и по меньшей мере вплоть до 95-99% идентична указанным последовательностям.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, прежде всего выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидный фрагмент, который после сплайсинга кодирует полипептид, последовательность которого по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 98% и вплоть до 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, прежде всего выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидный фрагмент, который имеет нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, или последовательность, которая по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 85%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 90% и по меньшей мере вплоть до 95-99% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, прежде всего выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидный фрагмент, который имеет нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51, или последовательность, которая по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 85%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 90% и по меньшей мере вплоть до 95-99% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 51.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, прежде всего выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидный фрагмент, который имеет нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52, или последовательность, которая по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 85%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 90% и по меньшей мере вплоть до 95-99% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 52.

Все индивидуальные численные значения, которые попадают под диапазон от 70-99%, указанный выше в настоящем описании, т.е. 71, 72, 73, 74, 75, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, должны также рассматриваться как подпадающие под объем настоящего изобретения.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, прежде всего выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидный фрагмент, причем комплементарная цепь указанного полинуклеотидного фрагмента обладает способностью гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, прежде всего в умеренных условиях гибридизации, более предпочтительно в строгих условиях гибридизации. Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, прежде всего выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидный фрагмент, причем комплементарная цепь указанного полинуклеотидного фрагмента обладает способностью гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, 3 или 4, прежде всего в умеренных условиях гибридизации, более предпочтительно в строгих условиях гибридизации.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, прежде всего выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидный фрагмент, причем комплементарная цепь указанного полинуклеотидного фрагмента обладает способностью гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5, прежде всего в умеренных условиях гибридизации, более предпочтительно в строгих условиях гибридизации.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, прежде всего выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидный фрагмент, причем комплементарная цепь указанного полинуклеотидного фрагмента обладает способностью гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 51, прежде всего в умеренных условиях гибридизации, более предпочтительно в строгих условиях гибридизации.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, прежде всего выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидный фрагмент, причем комплементарная цепь указанного полинуклеотидного фрагмента обладает способностью гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, прежде всего в умеренных условиях гибридизации, более предпочтительно в строгих условиях гибридизации.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, прежде всего выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидный фрагмент, причем комплементарная цепь указанного полинуклеотидного фрагмента обладает способностью гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 52, прежде всего в умеренных условиях гибридизации, более предпочтительно в строгих условиях гибридизации.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, прежде всего выделенный полинуклеотид, где полинуклеотид можно получать из геномной ДНК сахарной свеклы, сцепленной с обуславливающим стрелкование геном или геном В в геноме сахарной свеклы, для чего

а) осуществляют скрининг ВАС-библиотеки (бактериальная искусственная хромосома), созданной из двулетнего коммерческого культивара Н20, с помощью "прямого" праймера PRR7-F и "обратного" праймера PRR7-R, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 соответ-

ственно, или пары праймеров, последовательности которых по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 98% и вплоть до 99% идентичны последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 соответственно, с помощью ПЦР-реакции в следующих условиях:

начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин; затем

35 циклов амплификации по 30 с при 95°C,

30 с при 60°C;

30 с при 72°C; и затем

5 мин при 72°C;

б) отбирают клон ВАС SBA079-L24, содержащий два неперекрывающихся набора последовательных фрагментов, которые оба имеют последовательность, гомологичную EST (экспрессируемый ярлык) CV301305, представленную в SEQ ID NO: 1, и объединяют их в одну последовательность;

в) получают генную структуру гена BvPRR7 свеклы, содержащую интроны и экзоны, на основе сравнительного анализа набора последовательных фрагментов последовательности ВАС и EST CV301305, представленной в SEQ ID NO: 1, и гомологии последовательности с геном PRR7 из *Arabidopsis*.

В конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, которая включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

В конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, которая включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

В конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, которая включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3.

В конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, которая включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

В конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, которая включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

В конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, которая включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51.

В конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, которая включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52.

В конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, которая включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, причем эта последовательность несет G в положении 3695, C в положении 3827, T в положении 3954, T в положении 5284, G в положении 5714, G в положении 10954, T в положении 11043, C в положении 11143, C в положении 11150, A в положении 11220, C в положении 11238, A в положении 11299, A в положении 11391, G в положении 12053, G в положении 12086, T в положении 12127, A в положении 12193, G в положении 12337 и G в положении 12837 и представляет собой аллель 1, ассоциированный с однолетним типом развития.

В конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, которая включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, причем эта последовательность несет T в положении 3695, C в положении 3827, T в положении 3954, T в положении 5284, G в положении 5714, G в положении 10954, T в положении 11043, C в положении 11143, C в положении 11150, A в положении 11220, A в положении 11238, T в положении 11299, A в положении 11391, G в положении 12053, G в положении 12086, T в положении 12127, G в положении 12193, G в положении 12337 и G в положении 12837 и представляет собой аллель 2, ассоциированный с однолетним типом развития.

В конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, которая включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, причем эта последовательность несет G в положении 3695, C в положении 3827, T в положении 3954, T в положении 5284, G в положении 5714, G в положении 10954, G в положении 11043, T в положении 11143, C в положении 11150, A в положении 11220, C в положении 11238, T в положении 11299, A в положении 11391, G в положении 12053, G в положении 12086, T в положении 12127, G в положении 12193, G в положении 12337 и G в положении 12837 и представляет собой аллель 3, ассоциированный с однолетним типом развития.

В конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в изобретении,

содержит нуклеотидную последовательность, которая включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, причем эта последовательность несет G в положении 3695, C в положении 3827, T в положении 3954, T в положении 5284, G в положении 5714, G в положении 10954, T в положении 11043, C в положении 11143, T в положении 11150, A в положении 11220, C в положении 11238, T в положении 11299, A в положении 11391, G в положении 12053, G в положении 12086, T в положении 12127, A в положении 12193, G в положении 12337 и G в положении 12837 и представляет собой аллель 4, ассоциированный с однолетним типом развития.

В конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, которая включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, причем эта последовательность несет G в положении 3695, C в положении 3827, T в положении 3954, T в положении 5284, G в положении 5714, G в положении 10954, T в положении 11043, C в положении 11143, C в положении 11150, A в положении 11220, C в положении 11238, T в положении 11299, A в положении 11391, G в положении 12053, A в положении 12086, T в положении 12127, A в положении 12193, A в положении 12337 и G в положении 12837 и представляет собой аллель 5, ассоциированный с однолетним типом развития.

В конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, которая включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, причем эта последовательность несет G в положении 3695, C в положении 3827, T в положении 3954, T в положении 5284, G в положении 5714, G в положении 10954, T в положении 11043, C в положении 11143, C в положении 11150, A в положении 11220, C в положении 11238, T в положении 11299, A в положении 11391, G в положении 12053, G в положении 12086, T в положении 12127, A в положении 12193, A в положении 12337 и G в положении 12837 и представляет собой аллель 6, ассоциированный с однолетним типом развития.

В конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, которая включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, причем эта последовательность несет G в положении 3695, A в положении 3827, A в положении 3954, C в положении 5284, T в положении 5714, A в положении 10954, G в положении 11043, C в положении 11143, C в положении 11150, C в положении 11220, C в положении 11238, T в положении 11299, G в положении 11391, A в положении 12053, G в положении 12086, C в положении 12127, G в положении 12193, G в положении 12337 и A в положении 12837 и представляет собой аллель 7, ассоциированный с двулетним типом развития.

В конкретном варианте осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, которая включает нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, аминокислотная последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 6.

Одним из вариантов осуществления изобретения является продукт амплификации размером примерно 0,5 т.п.н., включая его информативный фрагмент, который можно получать с использованием "прямого" праймера PRR7-F и "обратного" праймера PRR7-R, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 соответственно, при применении геномной ДНК сахарной свеклы в качестве матрицы.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является набор полинуклеотидных маркеров, который содержит множество индивидуальных маркеров, где эти маркеры создают на основе полинуклеотида, представленного в SEQ ID NO: 5, включая любой из его аллельных вариантов 1-7, которые описаны выше, и с его помощью можно выявлять различные SNP (однонуклеотидный полиморфизм, полиморфизм единичных нуклеотидов) в нуклеотидных положениях, представленных в табл. 5, где с помощью указанного набора маркеров можно идентифицировать различные аллели и таким образом осуществлять дифференциацию однолетних и двулетних линий сахарной свеклы.

Одним из вариантов осуществления изобретения является одна или несколько молекул-зондов и/или один или несколько праймеров, прежде всего одна или несколько пар праймеров, но прежде всего одна или несколько пар праймеров, которая(ые) состоит из "прямого" праймера и "обратного" праймера, где праймеры обладают способностью к ренатурации с нуклеотидной последовательностью в области генома сахарной свеклы, которая генетически близко сцеплена с геном В, но прежде всего с областью в гене В, и которая содержит полинуклеотид, предлагаемый в изобретении и описанный выше, включая его информативный фрагмент, где указанный фрагмент содержит полиморфизм, прежде всего полиморфизм, основанный на SNP, SSR (простые повторяющиеся последовательности), делеции или инсерции по меньшей мере одного нуклеотида, но прежде всего полиморфизм, основанный на SNP, этот полиморфизм является диагностическим для В-аллеля в В-локусе и позволяет различать характерный для однолетнего и характерный для двулетнего типа развития генотип или различные гаплотипы в группах растений сахарной свеклы, имеющих характерный для двулетнего или однолетнего типа развития генотип.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотидный маркер, который можно создавать из полинуклеотидной молекулы или ее информативного фрагмента, выбранного из группы полинуклеотидов, которые имеют последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, и полинуклеотида,

который кодирует полипептид, аминокислотная последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 6, где указанный полинуклеотид содержит один или несколько полиморфизмов, прежде всего полиморфизм, основанный на SNP, SSR, делеции или инсерции по меньшей мере одного нуклеотида, но прежде всего полиморфизм, основанный на SNP, этот полиморфизм является диагностическим для В-аллеля в В-локусе и позволяет различать характерный для однолетнего и характерный для двулетнего типа развития генотип или различные гаплотипы в группах растений сахарной свеклы, имеющих характерный для двулетнего или однолетнего типа развития генотип.

Одним из конкретных вариантов осуществления изобретения является полинуклеотидный маркер, который создан на основе полинуклеотида, представленного в SEQ ID NO: 2, указанный маркер можно применять для выявления по меньшей мере одного из следующих SNP в 3-м интроне гена BvPRR7:

- а) цитозин или тимин в положении 87,
- б) цитозин или тимин в положении 160,
- в) аденин или гуанин в положении 406,

и таким образом осуществлять дифференциацию характерных для однолетнего и двулетнего типа развития гаплотипов.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотидный маркер, представленный одной или несколькими молекулами-зондами и/или одним или несколькими праймерами, прежде всего одной или несколькими парами праймеров, но прежде всего парой праймеров, которая состоит из "прямого" праймера и "обратного" праймера, где праймеры обладают способностью к ренатурации с нуклеотидной последовательностью в области генома сахарной свеклы, которая генетически близко сцеплена с геном В и имеет нуклеотидные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 2, и способностью к амплификации информативного фрагмента, где указанный фрагмент содержит один или несколько полиморфизмов, прежде всего полиморфизм, основанный на SNP, SSR, делеции или инсерции по меньшей мере одного нуклеотида, но прежде всего полиморфизм, основанный на SNP, представленный, например, в табл. 1, где полиморфизм является диагностическим для В-аллеля в В-локусе и позволяет различать растения, которые имеют характерный для однолетнего или характерный для двулетнего типа развития генотип или различные гаплотипы в группах растений сахарной свеклы, имеющих характерный для двулетнего или однолетнего типа развития генотип.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является пара праймеров, предлагаемая в изобретении и описанная выше, которая обладает способностью к ренатурации с нуклеотидной последовательностью в 3-м интроне, представленной в SEQ ID NO: 2, и к амплификации информативного фрагмента из указанной области, который содержит полиморфизм, прежде всего полиморфизм, представляющий собой SNP C/T в положении № 87, и/или SNP C/T в положении № 160, и/или SNP A/G в положении № 406.

В частности, пара праймеров включает "прямой" праймер PRR7-F, представленный в SEQ ID NO: 7, и "обратный" праймер PRR7-R, представленный в SEQ ID NO: 8, предназначенные для амплификации фрагмента, который содержит SNP № 160, 87 и 406.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотидный маркер, представленный одной или несколькими молекулами-зондами и/или одним или несколькими праймерами, прежде всего одной или несколькими парами праймеров, но прежде всего парой праймеров, которая состоит из "прямого" праймера и "обратного" праймера, где праймеры обладают способностью к ренатурации с нуклеотидной последовательностью в области генома сахарной свеклы, которая генетически близко сцеплена с геном В, прежде всего с нуклеотидной последовательностью в гене В, в частности с нуклеотидной последовательностью, которая представлена в SEQ ID NO: 5, и способностью к амплификации информативного фрагмента, где указанный фрагмент содержит один или несколько полиморфизмов, прежде всего полиморфизм, основанный на SNP, SSR, делеции или инсерции по меньшей мере одного нуклеотида, но прежде всего полиморфизм, основанный на SNP, представленный, например, в табл. 5, где полиморфизм является диагностическим для В-аллеля в В-локусе и позволяет различать растения, имеющие характерный для однолетнего и характерный для двулетнего типа развития генотип или различные гаплотипы в группах растений сахарной свеклы, имеющих характерный для двулетнего или однолетнего типа развития генотип.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является пара праймеров, предлагаемая в изобретении и описанная выше, которая обладает способностью к ренатурации с нуклеотидной последовательностью в кодирующей области гена BvPRR7, которая представлена в SEQ ID NO: 5, к амплификации информативного фрагмента из указанной кодирующей последовательности, содержащего полиморфизм, прежде всего полиморфизм, представляющий собой SNP A/C в положении № 3827 и/или SNP A/T в положении 3954, и/или SNP T/G в положении 5714, и/или SNP C/A в положении 11220, и/или SNP G/A в положении 11391, и/или SNP A/G в положении 12053, и/или SNP C/T в положении 12127.

В частности, первая пара праймеров содержит "прямой" праймер F3806, представленный в SEQ ID NO: 27, и "обратный" праймер R3807, представленный в SEQ ID NO: 28, для амплификации фрагмента, который содержит SNP № 3827 и SNP № 3954.

Вторая пара праймеров содержит "прямой" праймер F3768, представленный в SEQ ID NO: 21, и

"обратный" праймер R3769, представленный в SEQ ID NO: 22, для амплификации фрагмента, который содержит SNP № 5714.

Третья пара праймеров содержит "прямой" праймер F3857, представленный в SEQ ID NO: 37, и "обратный" праймер R3858, представленный в SEQ ID NO: 38, для амплификации фрагмента, который содержит SNP № 11220.

Четвертая пара праймеров содержит "прямой" праймер F3859, представленный в SEQ ID NO: 39, и "обратный" праймер R3860, представленный в SEQ ID NO: 40, для амплификации фрагмента, который содержит SNP № 11391.

Пятая пара праймеров содержит "прямой" праймер F3861, представленный в SEQ ID NO: 41, и "обратный" праймер R3862, представленный в SEQ ID NO: 42, для амплификации фрагмента, который содержит SNP № 12053 и 12127.

Одним из вариантов осуществления изобретения является предлагаемый в изобретении полинуклеотидный маркер, представленный одной или несколькими молекулами-зондами и/или одним или несколькими праймерами, прежде всего одной или несколькими парами праймеров, но прежде всего парой праймеров, которая состоит из "прямого" праймера и "обратного" праймера, где праймеры обладают способностью к ренатурации с нуклеотидной последовательностью в области генома сахарной свеклы, которая генетически близко сцеплена с геном В, прежде всего с нуклеотидной последовательностью в промоторной области гена PRR7, прежде всего с нуклеотидной последовательностью в промоторной области гена PRR7, которая представлена в SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 51 соответственно, и к амплификации информативного фрагмента, который является диагностическим для В-аллеля в В-локусе и позволяет различать растения, которые имеют характерный для однолетнего и характерный для двулетнего типа развития генотип или различные гаплотипы в группах растений сахарной свеклы, имеющих характерный для двулетнего или однолетнего типа развития генотип.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является полинуклеотидный маркер, который представлен парой праймеров, выбранной из группы, включающей пару праймеров F3808 (SEQ ID NO: 29) и R3809 (SEQ ID NO: 30), которая обеспечивает получение продукта амплификации размером 0,6 т.п.н.; пару праймеров F3855 (SEQ ID NO: 35) и R3809 (SEQ ID NO: 30), которая обеспечивает получение продукта амплификации размером 1,0 т.п.н.; и пару праймеров F3855 (SEQ ID NO: 35) и R3856 (SEQ ID NO: 36) (табл. 4), которая обеспечивает получение продукта амплификации размером 0,8 т.п.н.; когда в качестве матрицы применяют геномную ДНК из двулетних линий, но не обеспечивает амплификацию в случае однолетних линий.

Указанный информативный фрагмент может содержать также один или несколько полиморфизмов, прежде всего полиморфизм, основанный на SNP, SSR, делеции или инсерции по меньшей мере одного нуклеотида, но прежде всего полиморфизм, основанный на SNP, представленный, например, в табл. 5, который является диагностическим для В-аллеля в В-локусе и позволяет различать характерный для однолетнего и характерный для двулетнего типа развития генотип или различные гаплотипы в группах растений сахарной свеклы, имеющих характерный для двулетнего или однолетнего типа развития генотип.

Изобретение относится также к одной или нескольким молекулам-зондам и/или одному или нескольким праймерам, прежде всего одной или нескольким парам праймеров, но прежде всего паре праймеров, которая состоит из "прямого" праймера и "обратного" праймера, где праймеры обладают способностью к ренатурации с нуклеотидной последовательностью в области генома сахарной свеклы, которая генетически близко сцеплена с геном В, прежде всего с нуклеотидной последовательностью в промоторной области гена PRR7, в частности с нуклеотидной последовательностью в промоторной области гена PRR7, которая представлена в SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 51 соответственно, и к амплификации информативного фрагмента, который является диагностическим для В-аллеля в В-локусе и позволяет различать растения, которые имеют характерный однолетнего и характерный для двулетнего типа развития генотип или различные гаплотипы в группах растений сахарной свеклы, имеющих характерный для двулетнего или однолетнего типа развития генотип.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является пара праймеров, выбранная из группы, включающей пару праймеров F3808 (SEQ ID NO: 29) и R3809 (SEQ ID NO: 30), которая обеспечивает получение продукта амплификации размером 0,6 т.п.н.; пару праймеров F3855 (SEQ ID NO: 35) и R3809 (SEQ ID NO: 30), которая обеспечивает получение продукта амплификации размером 1,0 т.п.н.; и пару праймеров F3855 (SEQ ID NO: 35) и R3856 (SEQ ID NO: 36) (табл. 4), которая обеспечивает получение продукта амплификации размером 0,8 т.п.н., когда в качестве матрицы применяют геномную ДНК из двулетних линий, но не обеспечивает амплификацию в случае однолетних линий.

Описанные выше молекулы-зонды и/или праймеры можно применять в способе идентификации загрязнений характерным для однолетнего типа развития геномом поступающих в продажу семян сахарной свеклы.

Одним из вариантов осуществления изобретения является набор полинуклеотидных зондов, содержащий по меньшей мере две различные молекулы-зонды, которые комплементарны подобласти в информативном полинуклеотидном фрагменте, предлагаемом в изобретении и описанном выше, который содержит полиморфный сайт, с помощью которого амплифицируют частично перекрывающиеся фраг-

менты, различающиеся только одним или двумя ошибочными спариваниями оснований в области перекрытия, при этом первый зонд, прежде всего зонд, меченный первым флуоресцентным красителем, более предпочтительно первым флуоресцентным красителем и гасителем, представляет собой один аллель, а второй зонд, прежде всего зонд, меченный вторым флуоресцентным красителем, который не идентичен первому красителю, более предпочтительно вторым флуоресцентным красителем и гасителем, представляет собой другой аллель.

В конкретном варианте осуществления изобретения указанный информативный полинуклеотидный фрагмент содержит полиморфизм, где указанный полиморфизм основан на SNP № 3827 в домене-приемнике псевдоответа гена PRR7, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 5, а первая молекула-зонд, меченная первым флуоресцентным красителем, имеет нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47, а вторая молекула-зонд, меченная вторым флуоресцентным красителем, имеет нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48.

Одним из вариантов осуществления изобретения является применение полинуклеотида, предлагаемого в изобретении и представленного выше, или любого его информативного фрагмента для создания маркера, который можно применять для анализа аллельной дискриминации с целью выявления полиморфизма в геноме сахарной свеклы, где полиморфизм является диагностическим для В-аллеля в В-локусе и позволяет различать характерный для однолетнего и характерный для двулетнего типа развития генотип или различные гаплотипы в группах растений сахарной свеклы, имеющих характерный для двулетнего типа развития генотип, или применять для картирования гена В в геноме сахарной свеклы.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является применение одного или нескольких праймеров, прежде всего одной или нескольких пар праймеров, предлагаемых в изобретении и описанных выше, в анализе аллельной дискриминации с целью выявления полиморфизма в геноме сахарной свеклы, прежде всего полиморфизма, основанного на SNP, SSR, делеции или инсерции по меньшей мере одного нуклеотида, но прежде всего полиморфизма, основанного на SNP, где полиморфизм является диагностическим для В-аллеля в В-локусе и позволяет различать характерный для однолетнего и характерный для двулетнего типа развития генотип или различные гаплотипы в группах растений сахарной свеклы, имеющих характерный для двулетнего типа развития генотип.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения набор молекул-зондов, предлагаемых в изобретении и описанных выше, можно применять также в указанном анализе аллельной дискриминации.

Одним из вариантов осуществления изобретения является способ выявления отсутствия или присутствия аллеля, ассоциированного с признаком однолетности у растения сахарной свеклы, заключающийся в том, что

- а) отбирают образец генома растения сахарной свеклы, подлежащий анализу,
- б) анализируют нуклеотидную последовательность геномной области сахарной свеклы, генетически близко сцепленную с геном В и комплементарную или содержащую последовательность полинуклеотида, предлагаемого в изобретении и описанного выше, и
- в) сравнивают указанную последовательность с аллельной последовательностью, для которой известно, что она ассоциирована с двулетним фенотипом и однолетним фенотипом соответственно.

Одним из вариантов осуществления изобретения является способ выявления отсутствия или присутствия аллеля, ассоциированного с признаком однолетности у растения сахарной свеклы, заключающийся в том, что

- а) отбирают образец генома растения сахарной свеклы, подлежащий анализу,
- б) амплифицируют фрагмент из указанного образца ДНК с помощью праймера, прежде всего пары праймеров, комплементарной и связывающейся с последовательностью, которая присутствует в промоторной области гена BvPRR7, в частности BvPRR7, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 51, и

в) сравнивают указанную последовательность с аллельной последовательностью, для которой известно, что она ассоциирована с двулетним фенотипом, но не ассоциирована с однолетним фенотипом.

Одним из вариантов осуществления изобретения является способ выявления отсутствия или присутствия аллеля, ассоциированного с признаком однолетности у растения сахарной свеклы, заключающийся в том, что

- а) отбирают образец генома растения сахарной свеклы, подлежащий анализу,
- б) зондируют указанный образец ДНК молекулой-зондом, содержащей специфическую для аллеля последовательность, прежде всего специфическую для аллеля последовательность из промоторной области гена BvPRR7, в частности BvPRR7, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 51, для которой известно, что она присутствует в аллеле, ассоциированном с двулетним типом развития, но не присутствует в аллеле, ассоциированном с однолетним типом развития.

В конкретном варианте осуществления изобретения в указанном способе применяют пару праймеров, выбранную из группы, включающей пару праймеров F3808 (SEQ ID NO: 29) и R3809 (SEQ ID NO: 30), которая обеспечивает получение продукта амплификации размером 0,6 т.п.н.; пару праймеров F3855 (SEQ ID NO: 35) и R3809 (SEQ ID NO: 30), которая обеспечивает получение продукта амплификации

размером 1,0 т.п.н.; и пару праймеров F3855 (SEQ ID NO: 35) и R3856 (SEQ ID NO: 36) (табл. 4), которая обеспечивает получение продукта амплификации размером 0,8 т.п.н., когда в качестве матрицы применяют геномную ДНК из двулетних линий, но не обеспечивает амплификацию в случае однолетних линий.

Одним из вариантов осуществления изобретения является способ выявления специфического гаплотипа в группе растений сахарной свеклы, которые имеют характерный для двулетнего типа развития генотип, заключающийся в том, что

- а) отбирают образец генома растения сахарной свеклы, подлежащий анализу,
- б) анализируют нуклеотидную последовательность геномной области сахарной свеклы, генетически близко сцепленную с геном В и комплементарную или содержащую последовательность полинуклеотида, предлагаемого в изобретении и описанного выше, и
- в) сравнивают указанную последовательность с аллельной последовательностью, для которой известно, что она ассоциирована с конкретным гаплотипом.

В конкретном варианте осуществления изобретения осуществляют анализ последовательности с использованием молекулярного маркера, основой которого является полинуклеотид или его информационный фрагмент или один или несколько праймеров, прежде всего одна или несколько пар праймеров, но предпочтительно одна или несколько пар праймеров, включающая(ие) "прямой" праймер и "обратный" праймер, предлагаемые в изобретении и описанные выше.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является способ выявления отсутствия или присутствия аллеля, ассоциированного с признаком однолетности у растения сахарной свеклы, заключающийся в том, что

- а) отбирают образец генома растения сахарной свеклы, подлежащий анализу,
- б) анализируют нуклеотидную последовательность интронной области, которую можно получать из генома сахарной свеклы с помощью ПЦР-амплификации, с использованием "прямого" праймера PRR7-F, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 7, и "обратного" праймера, PRR7-R, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 8, и
- в) сравнивают указанную последовательность с аллельной последовательностью, для которой известно, что она ассоциирована с двулетним фенотипом или однолетним фенотипом соответственно.

В одном из вариантов осуществления изобретения последовательность интронной области по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 85%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 90% и вплоть до 95-99% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

Еще в одном конкретном варианте осуществления изобретения интронная область имеет нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является способ выявления отсутствия или присутствия аллеля, ассоциированного с признаком однолетности растения сахарной свеклы, заключающийся в том, что

- а) отбирают образец генома растения сахарной свеклы, подлежащий анализу,
- б) анализируют нуклеотидную последовательность геномной области, содержащей нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и
- в) сравнивают указанную последовательность с аллельной последовательностью, для которой известно, что она ассоциирована с двулетним фенотипом или однолетним фенотипом соответственно, и
- г) определяют, получен ли указанный геномный образец из генома, определяющего однолетний или двулетний фенотип.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является способ, заключающийся в том, что в геномном образце из растения сахарной свеклы анализируют интронную область полинуклеотида, предлагаемого в изобретении и описанного выше, с помощью "прямого" и "обратного" праймеров, фланкируя подобласть в интронной области, для которой известно, что она содержит полиморфный сайт, амплифицируя указанную подобласть и сравнивая амплифицированный фрагмент с аллельной последовательностью, для которой известно, что она ассоциирована с двулетним фенотипом или однолетним фенотипом соответственно.

Еще одним конкретным вариантом осуществления изобретения является описанный выше способ, заключающийся в том, что создают набор полинуклеотидных зондов на основе SNP, содержащий две отдельных молекулы-зонда, которые отличаются по меньшей мере одним ошибочным спариванием, предпочтительно двумя или большим количеством ошибочных спариваний, которые локализованы в соседних сайтах, но прежде всего одним ошибочным спариванием, в котором первая молекула-зонд, прежде всего меченая молекула-зонд, более предпочтительно молекула-зонд, меченная первым флуоресцентным красителем и гасителем, представляет собой один аллель, а вторая молекула-зонд, прежде всего меченая молекула-зонд, более предпочтительно молекула-зонд, меченная вторым флуоресцентным красителем, который не идентичен первому красителю, и гасителем, представляет собой другой аллель, и в котором указанный набор полинуклеотидных зондов применяют для дискриминации двух аллельных

вариантов.

В частности, маркеры, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять в анализе аллельной дискриминации, прежде всего в анализе дискриминации различных гаплотипов в группах растений, которые имеют характерный для двулетнего типа развития генотип. Для указанного анализа используют набор полинуклеотидных зондов, содержащий две отдельные молекулы-зонды, которые комплементарны, например, подобласти гена BvPRR7, которую можно получать ПЦР-амплификацией с использованием "прямого" праймера PRR7-F и "обратного" праймера PRR7-R, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 соответственно, при этом молекулы-зонды различаются только одним ошибочным спариванием оснований, прежде всего в положении № 631.

Первая молекула-зонд, прежде всего молекула-зонд, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и помечена первым флуоресцентным красителем, таким, например, как FAM, более предпочтительно первым флуоресцентным красителем и гасителем, представляет собой один аллель, а вторая молекула-зонд, прежде всего молекула-зонд, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и помечена вторым флуоресцентным красителем, который не идентичен первому красителю, таким как VIC, более предпочтительно вторым флуоресцентным красителем и гасителем, представляет собой второй аллель.

Следующим вариантом осуществления изобретения является анализ аллельной дискриминации, предназначенный для выявления полиморфизма в геномной области генома сахарной свеклы, который обладает способностью к косегрегации с фенотипом однолетности, прежде всего полиморфизма, основанного на SNP, делеции или инсерции по меньшей мере одного нуклеотида, но прежде всего полиморфизма, основанного на SNP, где этот полиморфизм является диагностическим для В-аллеля в В-локусе и позволяет различать характерный для однолетнего и характерный для двулетнего типа развития генотип или различные гаплотипы в группах растений сахарной свеклы, имеющих характерный для однолетнего и характерный для двулетнего типа развития генотип, для которого применяют молекулярный маркер, созданный на основе полинуклеотида, предлагаемого в изобретении и описанного выше, или любой его информативный фрагмент.

В конкретном варианте осуществления изобретения молекулярный маркер содержит пару праймеров, предлагаемых в изобретении и описанных выше.

Другим конкретным вариантом осуществления изобретения является анализ аллельной дискриминации, предназначенный для выявления однонуклеотидного полиморфизма в интронной области, которую можно получать из генома сахарной свеклы с помощью ПЦР-амплификации с использованием "прямого" праймера PRR7-F, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 7, и "обратного" праймера PRR7-R, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 8, для которого применяют набор праймеров и/или полинуклеотидных зондов, предлагаемых в изобретении и описанных выше.

В одном из вариантов осуществления изобретения последовательность интронной области по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 85%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 90% и вплоть до 95-99% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

Еще в одном конкретном варианте осуществления изобретения интронная область имеет нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

Одним из вариантов осуществления изобретения является применение полинуклеотида, предлагаемого в изобретении и описанного выше, для создания молекулярного маркера, который можно использовать для выявления отсутствия или присутствия аллеля, ассоциированного с признаком однолетности в геноме сахарной свеклы, которое предусматривает

- а) идентификацию указанных полиморфных сайтов,
- б) оценку связи указанных полиморфизмов с отсутствием или присутствием аллеля, ассоциированного с признаком однолетности у сахарной свеклы, путем
- в) создания молекулы-зонда или нескольких молекул-зондов, прежде всего праймера или нескольких праймеров, предпочтительно пары праймеров или нескольких пар праймеров, но наиболее предпочтительно "прямого" и "обратного" праймера, которые распознают нуклеотидную последовательность, фланкирующую указанный полиморфный сайт, для амплификации полинуклеотида, содержащего указанный полиморфный сайт, который можно применять для анализа аллельной дискриминации.

Одним из вариантов осуществления изобретения является способ идентификации загрязнений характерным для однолетнего типа развития генотипом предназначенных для продажи семян, заключающийся в том, что применяют полинуклеотид, предлагаемый в изобретении и описанный выше, или его информативный фрагмент в качестве маркера для выявления присутствия или отсутствия определяющего однолетность аллеля в полученном из растения образце.

В частности, изобретение относится к способу идентификации загрязнений характерным для однолетнего типа развития генотипом предназначенных для продажи семян, заключающемуся в том, что применяют полинуклеотид, предлагаемый в изобретении и описанный выше, или его информативный фрагмент в качестве маркера для идентификации загрязнений характерным для однолетнего типа разви-

тия генотипом предназначенных для продажи семян.

Одним из вариантов осуществления изобретения является способ идентификации загрязнений характерным для однолетнего типа развития генотипом предназначенных для продажи семян, заключающийся в том, что применяют основанный на использовании маркера анализ аллельной дискриминации, предлагаемый в изобретении и описанный выше.

Изобретение относится также к применению гена В, прежде всего гена *BvPRR7*, в основанном на применении трансгенов подходе к получению растений, имеющих однолетний или характеризующийся отсутствием стрелкования фенотип.

В частности, изобретение относится к химерным конструкциям, содержащим каскету экспрессии, которая несет кодирующую последовательность гена В, предпочтительно кодирующую последовательность *BvPRR7*, представленную в SEQ ID NO: 1, но наиболее предпочтительно в SEQ ID NO: 52, или последовательность, которая идентична ей по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 85%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 90% и вплоть до 95-99%, под контролем регуляторных элементов, в частности под контролем регуляторных элементов, обладающих функциональной активностью в растениях.

Одним из вариантов осуществления изобретения являются химерные конструкции, содержащие каскету экспрессии, которая несет кодирующую последовательность гена В, предпочтительно кодирующую последовательность *BvPRR7*, представленную в SEQ ID NO: 1, но наиболее предпочтительно в SEQ ID NO: 52, или последовательность, которая идентична ей по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 85%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 90% и вплоть до 95-99%, под контролем регуляторных элементов, в частности под контролем связанных с признаком однолетности промотором и терминирующих последовательностей, таких как характерные для гена *PRR7*, прежде всего гена *PRR7 Beta vulgaris*.

В одном из вариантов осуществления изобретения химерная конструкция, описанная выше, может содержать также ген маркера для селекции, который позволяет различать трансформированный и не-трансформированный растительный материал при осуществлении процесса отбора.

В одном из вариантов осуществления изобретения химерная конструкция, предлагаемая в изобретении, содержит маркер отрицательной селекции, прежде всего маркер для селекции, который кодирует фактор, определяющий устойчивость к токсичным для растения соединениям, таким как антибиотики или гербициды.

В одном из вариантов осуществления изобретения химерная конструкция, предлагаемая в изобретении, содержит маркер положительной селекции, прежде всего маркер для селекции, который кодирует фермент, придающий трансформированному растению селективное преимущество по сравнению с не-трансформированными растениями, прежде всего преимущество с позиций питания, такой, например, как ген фосфоманноизомеры, ген ксилоизомеразы.

Одним из вариантов осуществления изобретения является трансформирующий вектор и/или экспрессионный вектор, прежде всего растительный трансформирующий вектор и/или экспрессионный вектор, который содержит химерную конструкцию, предлагаемую в изобретении и описанную выше.

Одним из вариантов осуществления изобретения является растительная клетка, прежде всего растительная клетка растения сахарной свеклы, которая содержит химерную полинуклеотидную конструкцию или векторную молекулу, предлагаемую в изобретении и описанную выше.

Одним из вариантов осуществления изобретения является растение, прежде всего растение сахарной свеклы, которое содержит растительную клетку, предлагаемую в изобретении, и экспрессирует белок, кодируемый геном В, прежде всего белок, кодируемый геном *BvPRR7*, например растение, имеющее однолетний фенотип.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотидная конструкция, предназначенная для трансгенной супрессии экспрессии гена *BvPRR7* прежде всего с помощью антисмыслового или РНКi-подхода (подхода, основанного на РНК-интерференции).

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотидная конструкция, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую dsPHK, которая обладает способностью направленно воздействовать на мРНК, продуцируемые в результате транскрипции последовательности ДНК, которая кодирует белок гена В, прежде всего белок гена *BvPRR7*, приводя к их расщеплению.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотидная конструкция, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую dsPHK, которая практически идентична по меньшей мере области кодирующей последовательности гена В, в частности кодирующей области гена *BvPRR7*, представленной в SEQ ID NO: 1, но прежде всего в SEQ ID NO: 52, или последовательности, которая идентична ей по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 85%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 90% и вплоть до 95-99%.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотидная конструкция, которая

содержит фрагмент кодирующей области гена B, в частности фрагмент кодирующей области гена BvPRR7, представленной в SEQ ID NO: 1, но прежде всего в SEQ ID NO: 52, или последовательности, которая идентична ей по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 85%, но наиболее предпочтительно по меньшей мере на 90% и вплоть до 95-99%, которая находится в кассете для РНКi под контролем конститутивного промотора, такого, например, как промотор Ubi3 из *Arabidopsis*.

Одним из вариантов осуществления изобретения является трансформирующий вектор и/или применяемый для РНКi экспрессионный вектор, прежде всего растительный трансформирующий вектор и/или экспрессионный вектор, который содержит полинуклеотидную конструкцию, предлагаемую в изобретении и описанную выше.

Одним из вариантов осуществления изобретения является растительная клетка, которая содержит полинуклеотидную конструкцию или векторную молекулу, предлагаемую в изобретении и описанную выше.

Одним из вариантов осуществления изобретения является растение, прежде всего растение сахарной свеклы, которое содержит растительную клетку, предлагаемую в изобретении, и экспрессирует dsРНК, в результате чего подавляется стрелкование, и растение приобретает фенотип, характеризующийся отсутствием стрелкования.

Краткое описание чертежей и последовательностей

На чертежах показано:

фиг. 1 - сравнение аминокислотных последовательностей REC-доменов различных видов и предполагаемого REC-домена EST CV301305 сахарной свеклы. Идентичные аминокислоты обозначены черным цветом; консервативные - серым цветом; аминокислоты с низким уровнем подобия - светло-серым цветом и неподобные - белым цветом. Bb, *Bordetella bronchiseptica*; Bs, *Bacillus subtilis*; Bv, *Beta vulgaris*; Ec, *Escherichia coli*; Kp, *Klebsiella pneumoniae*; Pa, *Pseudomonas aeruginosa*; Rc, *Rhodobacter capsulatus*; Sc, *Streptomyces coelicolor*; Sf, *Shigella flexneri*; St, *Salmonella typhimurium*;

фиг. 2 - сравнение аминокислотных последовательностей белка PRR7 *Arabidopsis* и предсказанного фрагмента белка EST V301305 сахарной свеклы. Идентичные аминокислоты обозначены черным цветом; подобные - серым цветом; и неподобные - белым цветом;

фиг. 3 - сравнительный анализ первичной структуры последовательностей геномной и мРНК гена PRR7 *Arabidopsis* и EST CV301305 сахарной свеклы. Консервативные нуклеотиды *Arabidopsis* и *Beta vulgaris* L. обозначены серым цветом. Интроны обозначены заштрихованными полосами;

фиг. 4 - генетическая карта хромосомы II сахарной свеклы. Название маркеров приведены справа от хромосомы, а слева показаны генетические дистанции в порядке их возрастания;

фиг. 5 - схематическое изображение генной структуры гена BvPRR7, включая предполагаемые экзоны и интроны. Область, консервативная EST CV301305, обозначена широкой стрелкой;

фиг. 6 - сравнение аминокислотных последовательностей представителей семейства продуктов гена PRR *Arabidopsis* и белка BvPRR7. Идентичные аминокислоты обозначены черным цветом; консервативные - серым цветом; аминокислоты с низким уровнем подобия - светло-серым цветом и неподобные - белым цветом. Мотивы REC и CCT обозначены прямоугольниками;

на фиг. 7 - филогенетическая взаимосвязь между BvPRR7 и родственными белками из других видов цветковых растений. Предсказанную аминокислотную последовательность BvPRR7 выравнивали с указанными ниже белками с помощью программы ClustalW и конструировали неукорененное филогенетическое дерево. Для вывода эволюционной истории использовали метод "объединения соседей" (Neighbor-Joining Method) (Saitou и Nei, 1987). Для вывода эволюционной истории анализируемых таксонов применяли консенсусное дерево, построенное методом "бутстрэпа" ("bootstrap") на основе 1000 реплик (Felsenstein, 1985). Ветви, соответствующие разделению, воспроизводимому менее чем в 50% "bootstrap"-реплик, удаляли (осуществляли их коллапс). Рядом с ветвями указан процент реплик деревьев, для которых ассоциированные таксоны кластеризовали, при осуществлении "bootstrap"-анализа (1000 реплик). Дерево изображено в таком масштабе, когда длины ветвей представлены в тех же единицах, представляющих собой эволюционные расстояния, которые применяли для вывода филогенетического дерева. Эволюционные расстояния рассчитывали с помощью метода коррекции Пуассона (Zuckerkandl и Pauling, 1965) и выражали в единицах, представляющих собой количество аминокислотных замен на один сайт. Все позиции, содержащие "бреши" и недостающие данные, исключали из базы данных ("опция полной делеции"). В конечной базе данных содержалось в целом 352 позиции. Филогенетический анализ осуществляли с помощью программного обеспечения MEGA4 (Tamura и др., 2007). Использовали следующие сокращения: At PRR3, *Arabidopsis thaliana* PRR3 (NP568919); At PRR5, *Arabidopsis thaliana* PRR5 (NP_568446); At PRR7, *Arabidopsis thaliana* PRR7 (NP_568107); At PRR9, *Arabidopsis thaliana* PRR9 (NP_566085); At TOC1, *Arabidopsis thaliana* TOC1/PRR1 (NP_200946); Hv PPD-H1, *Hordeum vulgare* PPD-H1 (AAY17586); Os PRR37, *Oryza sativa* PRR37 (Q0D3B6); Ta PPD-D1, *Triticum aestivum* PPD-D1 (ABL09477);

фиг. 8 - профиль генной экспрессии BvPRR7 в двулетнем растении сахарной свеклы, выращенной в условиях длинного светового дня (16 ч света, 8 ч темноты) и при постоянной температуре 18°C. Значения

выражали в виде относительных уровней экспрессии, стандартизованных относительно референс-генов BvBTU и BvICDH с помощью анализа на основе геометрического усреднения (Vandesompele и др., 2002);

фиг. 9 - плазмидная карта бинарного вектора, предназначенного для трансформации кДНК BvPRR7 под контролем фрагмента промотора BvPRR7, ассоциированного с однолетним типом развития растений. Селектируемый маркер представляет собой ген PMI под контролем промотора HSP80 (Brunke и Wilson, 1993);

фиг. 10 - плазмидная карта бинарного вектора, предназначенного для трансгенной супрессии BvPRR7 с помощью РНКi. Инвертированный повтор для BvPRR7 состоит из кДНК-фрагмента размером 0,6 т.п.н., который клонировали между промотором Ubi3 (Norris и др., 1993) и терминатором Nos как в смысловой, так и в антисмысловой ориентации, разделенный вторым интроном гена StLS1 картофеля (Eckes и др., 1986; Vancanneyt и др., 1990). Селектируемый маркер представляет собой ген PMI под контролем промотора HSP80 (Brunke и Wilson, 1993);

Последовательности

SEQ ID NO: 1 - нуклеотидная последовательность EST CV301305,

SEQ ID NO: 2 - нуклеотидная последовательность интрона 3 BvPRR7 и ее аллельная изменчивость, предназначенная для картирования,

SEQ ID NO: 3 - нуклеотидная последовательность интрона 3 аллельного варианта 1 BvPRR7 (гаплотип № 1),

SEQ ID NO: 4 - нуклеотидная последовательность интрона 3 аллельного варианта 2 BvPRR7 (гаплотип № 2),

SEQ ID NO: 5 - геномная нуклеотидная последовательность BvPRR7,

SEQ ID NO: 6 - предполагаемая аминокислотная последовательность BvPRR7,

SEQ ID NO: 7 - нуклеотидная последовательность праймера PRR7-F,

SEQ ID NO: 8 - нуклеотидная последовательность праймера PRR7-R,

SEQ ID NO: 9 - нуклеотидная последовательность зонда PRR7(T1)-FAM,

SEQ ID NO: 10 - нуклеотидная последовательность зонда PRR7(T1)-VIC,

SEQ ID NO: 11 - нуклеотидная последовательность "прямого" праймера BvPRR7,

SEQ ID NO: 12 - нуклеотидная последовательность "обратного" праймера BvPRR7,

SEQ ID NO: 13 - нуклеотидная последовательность "прямого" праймера BvBTU,

SEQ ID NO: 14 - нуклеотидная последовательность "обратного" праймера BvBTU,

SEQ ID NO: 15 - нуклеотидная последовательность "прямого" праймера BvICDH,

SEQ ID NO: 16 - нуклеотидная последовательность "обратного" праймера BvICDH,

SEQ ID NO: 17 - нуклеотидная последовательность праймера F3766,

SEQ ID NO: 18 - нуклеотидная последовательность праймера R3767,

SEQ ID NO: 19 - нуклеотидная последовательность праймера F3354,

SEQ ID NO: 20 - нуклеотидная последовательность праймера R3355,

SEQ ID NO: 21 - нуклеотидная последовательность праймера F3768,

SEQ ID NO: 22 - нуклеотидная последовательность праймера R3769,

SEQ ID NO: 23 - нуклеотидная последовательность праймера F3782,

SEQ ID NO: 24 - нуклеотидная последовательность праймера R3783,

SEQ ID NO: 25 - нуклеотидная последовательность праймера F3784,

SEQ ID NO: 26 - нуклеотидная последовательность праймера R3785,

SEQ ID NO: 27 - нуклеотидная последовательность праймера F3806,

SEQ ID NO: 28 - нуклеотидная последовательность праймера R3807,

SEQ ID NO: 29 - нуклеотидная последовательность праймера F3808,

SEQ ID NO: 30 - нуклеотидная последовательность праймера R3809,

SEQ ID NO: 31 - нуклеотидная последовательность праймера F3810,

SEQ ID NO: 32 - нуклеотидная последовательность праймера R3811,

SEQ ID NO: 33 - нуклеотидная последовательность праймера F3853,

SEQ ID NO: 34 - нуклеотидная последовательность праймера F3854,

SEQ ID NO: 35 - нуклеотидная последовательность праймера F3855,

SEQ ID NO: 36 - нуклеотидная последовательность праймера R3856,

SEQ ID NO: 37 - нуклеотидная последовательность праймера F3857,

SEQ ID NO: 38 - нуклеотидная последовательность праймера R3858,

SEQ ID NO: 39 - нуклеотидная последовательность праймера F3859,

SEQ ID NO: 40 - нуклеотидная последовательность праймера R3860,

SEQ ID NO: 41 - нуклеотидная последовательность праймера F3861,

SEQ ID NO: 42 - нуклеотидная последовательность праймера R3862,

SEQ ID NO: 43 - нуклеотидная последовательность праймера F3863,

SEQ ID NO: 44 - нуклеотидная последовательность праймера R3864,

SEQ ID NO: 45 - нуклеотидная последовательность праймера F3865,

SEQ ID NO: 46 - нуклеотидная последовательность праймера R3866,

SEQ ID NO: 47 - нуклеотидная последовательность зонда PRR7(№ 3827)-FAM,
 SEQ ID NO: 48 - нуклеотидная последовательность зонда PRR7(№ 3827)-VIC,
 SEQ ID NO: 49 - нуклеотидная последовательность "прямого" праймера BvPRR7, применяемого для анализа экспрессии генов,

SEQ ID NO: 50 - нуклеотидная последовательность "обратного" праймера BvPRR7, применяемого для анализа экспрессии генов,

SEQ ID NO: 51 - нуклеотидная последовательность геномной нуклеотидной последовательности BvPRR7, включающая промоторную область размером примерно 13 т.п.н.,

SEQ ID NO: 52 - нуклеотидная последовательность кодирующей области BvPRR7.

Определения

Технические понятия и выражения, применяемые в настоящем описании, как правило, если специально не указано иное, имеют значения, которые обычно используют в области молекулярной биологии растений.

В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения подразумевается, если из контекста ясно не следует иное, что употребляемое в единственном числе существительное включает также множественное число. Так, например, ссылка на "растение" включает одно или несколько растений, а ссылка на "клетку" включает смеси клеток, тканей и т.п.

Понятие "сахарная свекла" относится ко всем видам и подвидам рода *Beta*, а также ко всем сортам культурной свеклы *Beta vulgaris*. Культурные сорта свеклы подразделяют на четыре группы: листовая свекла, огородная свекла, кормовая свекла и сахарная свекла. Понятие "сахарная свекла" относится также ко всем культурным сортам свеклы, включая сорта, выращиваемые для целей, отличных от получения сахара, например, для получения этанола, пластиков или промышленных продуктов. В частности, понятие "сахарная свекла" относится к кормовой свекле и сахарной свекле, но наиболее предпочтительно к сахарной свекле.

Понятие "однолетняя линия сахарной свеклы" относится к растению сахарной свеклы, содержащему доминантный аллель *b* в локусе *B* в гетерозиготном или гомозиготном состоянии.

Понятие "двулетняя линия сахарной свеклы" относится к растению сахарной свеклы, содержащему рецессивный аллель *b* в локусе *B* в гетерозиготном состоянии.

Понятие "стрелкование" относится к переходу от вегетативной розеточной стадии к стадии цветения или репродуктивного роста.

Понятие "ген *B*" в контексте настоящего описания относится к гену, который ответствен за раннее стрелкование сахарной свеклы. У растений, несущих доминантный аллель, происходит удлинение побега и последующее цветение без предварительного нахождения при низких температурах.

Понятие "яровизация" относится к процессу, при котором у некоторых растений ускоряется индукция цветения при охлаждении растений в течение определенного периода времени.

Понятие "аллель" в контексте настоящего изобретения относится к альтернативным формам различных генетических единиц, ассоциированных с различными формами гена или любыми видами идентифицируемого генетического элемента, которые альтернативно наследуются, поскольку расположены в одном и том же локусе в гомологичных хромосомах. В диплоидной клетке или организме два аллеля данного гена (или маркера), как правило, расположены в соответствующих локусах на паре гомологичных хромосом.

В контексте настоящего описания понятие "размножение (селекция)" и его грамматические варианты относятся к любому процессу, который позволяет получать индивидуальное потомство. Размножение может быть половым или неполовым или представлять собой любую их комбинацию. Примерами размножения являются, но не ограничиваясь только ими, скрещивание, самоопыление, получение производного с удвоенным гаплоидным набором и их комбинации.

Понятие "локус" в контексте настоящего изобретения относится к области на хромосоме, которая содержит ген или любой другой генетический элемент или фактор, определяющий признак.

В контексте настоящего описания понятие "генетический маркер" относится к особенности индивидуального генома (например, нуклеотидной или полинуклеотидной последовательности, которая присутствует в индивидуальном геноме), ассоциированной с одним или несколькими представляющими интерес локусами. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в зависимости от контекста, генетический маркер является полиморфным в представляющей интерес популяции или представляет собой локус, в котором присутствует полиморфизм. Генетические маркеры представляют собой, например, такие маркеры, но не ограничиваясь только ими, как однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), инделы (т.е. инсерции/делеции), простые повторяющиеся последовательности (SSR), полиморфизмы длины рестрикционных фрагментов (RFLP), произвольно амплифицированные полиморфные ДНК (RAPD), маркеры, представляющие собой расщепленную амплифицированную полиморфную последовательность (CAPS), маркеры, полученные с помощью технологии разнообразия массивов (Diversity Arrays Technology (DArT), полиморфизмы длины амплифицированных фрагментов (AFLP). Генетические маркеры можно применять, например, для локализации на хромосоме генетических локусов, содержащих аллели, с которыми связана вариабельность экспрессии фенотипических признаков. Под поднятием "генетиче-

ский маркер" может подразумеваться также полинуклеотидная последовательность, комплементарная геномной последовательности, такая как последовательность нуклеиновой кислоты, применяемая в качестве зондов.

Генетический маркер физически может быть локализован в положении на хромосоме внутри или вне генетического локуса, с которым он ассоциирован (т.е. он может являться интрагенным или экстрагенным соответственно). Другими словами, хотя генетические маркеры, как правило, применяют, когда локализация на хромосоме гена, соответствующего представляющему интерес локусу, не идентифицирована и имеет место не нулевая степень рекомбинации между генетическим маркером и представляющим интерес локусом, согласно одному из объектов настоящего изобретения можно применять также генетические маркеры, которые физически являются пограничными генетическому локусу (например, находятся внутри геномной последовательности, которая соответствует гену, такому как, но не ограничиваясь только им, полиморфизм в интроне или экзоне). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения один или несколько генетических маркеров включают от 1 до 10 маркеров, а в некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько генетических маркеров включает более 10 генетических маркеров.

В контексте настоящего описания понятие "информативный фрагмент" относится к полинуклеотидному фрагменту с информационным содержанием, которое является восстанавливаемым и может способствовать определению и/или характеристике представляющего интерес генетического локуса. Это информационное содержание может представлять собой полиморфизм, ассоциированный с указанным представляющим интерес локусом, такой, например, как, но не ограничиваясь только ими, однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), инделы (т.е. инсерции/делеции), простые повторяющиеся последовательности (SSR), полиморфизмы длины рестрикционных фрагментов (RFLP), маркеры, представляющие собой произвольно амплифицированные полиморфные ДНК (RAPD), расщепленную амплифицированную полиморфную последовательность (CAPS), маркеры, полученные с помощью технологии разнообразия массивов (DArT), полиморфизмы длины амплифицированных фрагментов (AFLP), и их можно применять для создания генетического маркера. Информационное содержание "информативного фрагмента" может представлять собой также специфическую последовательность, которую можно выявлять с помощью соответствующей молекулы-зонда.

В контексте настоящего описания понятие "фенотипический признак" относится к появляющейся или иным образом проявляющейся характеристике индивидуума, являющейся результатом взаимодействия генома с его окружением.

Понятие "основанная на применении маркера селекция" в контексте настоящего изобретения относится к применению генетических маркеров для выявления одной или нескольких нуклеиновых кислот растения, где нуклеиновая кислота ассоциирована с требуемым признаком, для идентификации растений, которые несут гены требуемых (или нежелательных) признаков, в результате чего эти растения можно использовать (или избегать их использования) в программе селективного размножения.

Понятие "микросателлитный или SSR (простые повторяющиеся последовательности) (маркер)" в контексте настоящего изобретения относится к типу генетического маркера, который состоит из многочисленных повторов коротких последовательностей оснований ДНК, которые находятся в локусах, повсеместных в растительной ДНК, и могут быть высокополиморфными.

Понятие "ПЦР (полимеразная цепная реакция)" в контексте изобретения относится к методу получения относительно больших количеств специфических областей ДНК, что позволяет осуществлять различные анализы, основанные на использовании этих областей.

Понятие "ПЦР-праймер" в контексте изобретения относится к относительно коротким фрагментам одноцепочечной ДНК, которые применяют в ПЦР-амплификации специфических областей ДНК.

Понятие "фенотип" в контексте изобретения относится к различимой(ым) характеристике(ам) генетически контролируемого признака.

Понятие "полиморфизм" в контексте изобретения относится к присутствию в популяции двух или большего количества различных форм гена, генетического маркера или наследуемого признака.

Понятие "селективное размножение" в контексте изобретения относится к программе размножения, в которой используют растения, которые несут или проявляют требуемые признаки, характерные для родителей.

Понятие "полинуклеотид" в контексте настоящего описания относится к полимерной высокомолекулярной молекуле, которая может быть одноцепочечной или двухцепочечной, состоящей из мономеров (нуклеотидов), которые содержат сахар, фосфат и основание, относящееся либо к пуринам, либо к пиримидинам. "Фрагмент полинуклеотида (полинуклеотидный фрагмент)" представляет собой часть данной полинуклеотидной молекулы. В высших растениях дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) представляет собой генетический материал, а рибонуклеиновая кислота (РНК) участвует в переносе информации, входящей в ДНК, на белки. "Геном" представляет собой полную совокупность генетического материала, входящего в каждую клетку организма. Таким образом, понятие "полинуклеотид" относится к полимеру ДНК или РНК, который может быть одно- или двухцепочечным, необязательно содержащему синтетические, не встречающиеся в естественных условиях или измененные нуклеотидные основания, которые

могут включаться в полимеры ДНК или РНК. Если не указано иное, то подразумевается, что конкретная нуклеотидная последовательность, предлагаемая в настоящем изобретении, включает также ее полученные в результате консервативной модификации варианты (например, замены кодонов из-за вырожденности генетического кода) и комплементарные последовательности, а также определенные указанные последовательности. В частности, для замены кодонов из-за вырожденности генетического кода можно создавать последовательности, в которых в третьем положении в одном или в нескольких выбранных (или во всех) кодонах произведена замена смешанными основаниями и/или остатками дезоксиинозина (Batzner и др., 1991; Ohtsuka и др., 1985; Rossolini и др., 1994). Понятия полинуклеотид используют взаимозаменяемо с понятиями нуклеиновая кислота, нуклеотидная последовательность, кДНК и мРНК, кодируемая геном, и т.д.

Подразумевается, что полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, должен находиться в выделенной форме. Понятие "выделенный" означает, что описанный и предлагаемый в изобретении полинуклеотид не является полинуклеотидом, который встречается в естественных условиях, если реально существует его встречающийся в естественных условиях дубликат. Таким образом, предполагается, что и другие соединения, описанные ниже, должны быть выделенными. В контексте растительного генома полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, отличается от его встречающихся в естественных условиях дубликатов инсерционным участком и последовательностями, фланкирующими указанный инсерционный участок.

В контексте настоящего описания понятие "нуклеиновая кислота" относится к любой физической цепи мономерных единиц, которая может соответствовать цепи нуклеотидов, включая полимер нуклеотидов (например, типичный полимер ДНК или РНК), модифицированных олигонуклеотидов (например, олигонуклеотиды, содержащие основания, не являющиеся типичными для биологической РНК или ДНК, например 2'-О-метирированные олигонуклеотиды), и т.п. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной, двухцепочечной, многоцепочечной или представлять собой их комбинации. Если не указано иное, то конкретная нуклеотидная последовательность, предлагаемая в настоящем изобретении, необязательно содержит или кодирует комплементарные последовательности помимо любых конкретно указанных последовательностей.

Понятие "ген" в широком смысле относится к любому сегменту нуклеиновой кислоты, связанному с биологической функцией. Так, гены включают кодирующие последовательности и/или регуляторные последовательности, необходимые для их экспрессии. Например, понятие "ген" относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который экспрессирует мРНК или функциональную РНК или кодирует конкретный белок и который включает регуляторные последовательности. Гены включают также неэкспрессируемые сегменты ДНК, которые, например, образуют последовательности, распознаваемые другими белками. Гены можно получать из различных источников, включая клонирование из представляющего интерес источника или синтез из известного или предсказанного на основе информации о последовательности источника, или они могут включать последовательности, сконструированные так, что они имеют требуемые параметры.

"Маркерный ген" кодирует селективируемый или выявляемый путем скрининга признак.

Понятие "химерный ген" относится к любому гену, который содержит 1) последовательности ДНК, включая регуляторные и кодирующие последовательности, которые не встречаются вместе в естественных условиях, или 2) последовательности, кодирующие участки белков, которые не объединены в естественных условиях, или 3) участки промоторов, которые не объединены в естественных условиях. Таким образом, химерный ген может содержать регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, выведенные из различных источников, или содержать регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, выведенные из одного и того же источника, но собранные иным образом по сравнению с их укладкой в естественных условиях.

Понятие "трансген" относится к интродуцированному путем трансформации в геном и стабильно поддерживаемому гену. К трансгенам относятся, например, гены, которые гетерологичны или гомологичны генам конкретного подлежащего трансформации растения. Кроме того, трансгены могут представлять собой нативные гены, встроенные в ненативный организм, или химерные гены.

Понятие "белок", "пептид" и "полипептид" в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо.

Понятие "кодирующая последовательность" относится к последовательности ДНК или РНК, которая кодирует конкретную аминокислотную последовательность, и не включает некодирующие последовательности. Она может представлять собой "непрерывную кодирующую последовательность", т.е. последовательность, в которой отсутствуют интроны, такую как кДНК, или может включать один или несколько интронов, ограниченных соответствующими сплайсинговыми стыками. "Инtron" представляет собой последовательность РНК, которая входит в первичный транскрипт, но которая удаляется в результате расщепления и повторного лигирования РНК в клетке с образованием зрелой мРНК, которая может транслироваться в белок.

Понятие "промотор" относится к нуклеотидной последовательности, как правило, расположенной против хода транскрипции (5') относительно кодирующей последовательности, которая контролирует

экспрессию кодирующей последовательности, обеспечивая распознавание РНК-полимеразой и другими факторами, необходимыми для правильной транскрипции. "Промотор" включает минимальный промотор, который представляет собой короткую последовательность ДНК, содержащую ТАТА-бокс и другие последовательности, которые обеспечивают специфичность сайта инициации транскрипции, к которому добавляют регуляторные элементы для контроля экспрессии. Понятие "промотор" относится также к нуклеотидной последовательности, которая содержит минимальный промотор плюс регуляторные элементы, которые обладают способностью контролировать экспрессию кодирующей последовательности или функциональной РНК. Этот тип промотора состоит из проксимальных и более дистально расположенных против хода транскрипции элементов, последние элементы часто относят к энхансерам. Таким образом, "энхансер" обозначает последовательность ДНК, которая может стимулировать активность промотора и может представлять собой присущий промотору элемент или гетерологичный элемент, встроенный для повышения уровня активности или тканеспецифичности промотора. Он может проявлять активность в обоих направлениях (прямом или обратном) и может функционировать даже при его смещении либо в против хода, либо по ходу транскрипции относительно промотора. И энхансеры, и другие находящиеся против хода транскрипции промоторные элементы связывают специфические для последовательности ДНК-связывающие белки, которые опосредуют их действия. Промоторы могут быть полностью выведены из нативного гена или состоять из различных элементов, выведенных из различных промоторов, присутствующих в природе, или даже состоять из различных синтетических ДНК-сегментов. Промотор может включать также последовательности ДНК, которые участвуют в связывании белковых факторов, контролирующих эффективность инициации транскрипции в ответ на физиологические или связанные с фазой развития условия.

"Сайт инициации" представляет собой положение, окружающее первый нуклеотид, который является частью транскрибируемой последовательности, который обозначают также как положение +1. Относительно этого сайта нумеруют все другие последовательности гена и его контролируемые области. Расположенные по ходу транскрипции последовательности (т.е. дополнительные кодирующие белок последовательности, расположенные в 3'-направлении) нумеруют положительными числами, а расположенные против хода транскрипции последовательности (главным образом контролируемые области, расположенные в 5'-направлении) нумеруют отрицательными числами.

Промоторные элементы, в частности ТАТА-элемент, которые являются неактивными или обладают значительно пониженной промоторной активностью в отсутствие активации против хода транскрипции, обозначают как "минимальные или внутренние промоторы". В присутствии приемлемого фактора транскрипции минимальный промотор функционирует, обеспечивая транскрипцию. Таким образом, "минимальный или внутренний промотор" состоит только из всех основных элементов, необходимых для инициации транскрипции, например ТАТА-бокса и/или инициатора.

Понятие "конститутивная экспрессия" относится к экспрессии с использованием конститутивного или регулируемого промотора. Понятие "обусловленная" или "регулируемая экспрессия" относится к экспрессии, контролируемой регулируемым промотором.

Понятие "конститутивный промотор" относится к промотору, который может обеспечивать экспрессию открытой рамки считывания (ОРС), который обеспечивает контроль во всех или практически во всех растительных тканях в течение всех или практически всех стадий развития растения. Любой из активирующих транскрипцию элементов не характеризуется абсолютной тканеспецифичностью, но опосредует активацию транскрипции в большинстве частей растения на уровне $\geq 1\%$ от уровня, достигаемого в растении, в котором транскрипция является наиболее активной.

Понятие "регулируемый промотор" относится к промоторам, которые контролируют генную экспрессию не конститутивно, а регулируемым временем и/или пространственным положением образом, к ним относятся как тканеспецифические, так и индуцибельные промоторы. Они включают встречающиеся в естественных условиях и синтетические последовательности, а также последовательности, которые могут представлять собой комбинацию синтетических и встречающихся в естественных условиях последовательностей. Различные промоторы могут контролировать экспрессию гена в различных типах тканей или клеток или на различных стадиях развития или в ответ на различные факторы окружающей среды. В настоящее время открыты новые промоторы различных типов, которые можно применять в растительных клетках, их многочисленные примеры описаны у Okamoto и др., 1989. Типичные регулируемые промоторы, которые можно применять в растениях, включают, но не ограничиваясь только ими, индуцируемые антидотами промоторы, промоторы, выведенные из индуцируемой тетрациклином системы, промоторы, выведенные из индуцируемых салицилатами систем, промоторы, выведенные из индуцируемых спиртами систем, промоторы, выведенные из индуцируемых глюкокортикоидами систем, промоторы, выведенные из индуцируемых патогенами систем, и промоторы, выведенные из индуцируемых экдизонами систем.

Понятие "тканеспецифический промотор" относится к регулируемым промоторам, которые экспрессируются не во всех растительных клетках, а только в одном или нескольких типах клеток в конкретных органах (таких как листья или семена), конкретных тканях (таких как зародыш или семядоля), или в конкретных типах клеток (таких как паренхима листа или запасающие клетки семян). К ним отно-

сятся также промоторы, регуляция которых обусловлена периодом времени, таким как ранняя или поздняя стадия эмбриогенеза, стадия созревания в развитии семян и плодов, стадия полностью дифференцированной ткани листа или начало старения.

Понятие "индуцибельный промотор" относится к таким регулируемым промоторам, которые могут превращаться в специфические для одного или нескольких типов клеток под воздействием внешнего стимула, такого как химические агенты, свет, гормон, стресс или патоген.

Понятие "функционально связаны" относится к ассоциации нуклеотидных последовательностей на одном фрагменте нуклеиновой кислоты так, что функция одной оказывает воздействие на функцию другой. Например, регуляторная последовательность ДНК "функционально связана с" или "ассоциирована с" последовательностью ДНК, которая кодирует РНК или полипептид, если две последовательности расположены так, что регуляторная последовательность ДНК обладает способностью воздействовать на экспрессию кодирующей последовательности ДНК (т.е. транскрипция кодирующей последовательности или функциональной РНК находится под транскрипционным контролем промотора). Кодирующие последовательности могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями в смысловой или антисмысловой ориентации.

Понятие "экспрессия" относится к транскрипции и/или трансляции эндогенного гена, ОРС или ее части или трансгена в растениях. Например, в случае антисмысловых конструкций понятие экспрессия может относиться к транскрипции только антисмысловой ДНК. Кроме того, экспрессия относится к транскрипции и стабильной аккумуляции смысловой (мРНК) или функциональной РНК. Экспрессия может относиться также к производству белка.

Понятие "сверхэкспрессия" относится к уровню экспрессии в трансгенных клетках или организмах, превышающим уровни экспрессии в нормальных или нетрансформированных (нетрансгенных) клетках или организмах.

Понятие "антисмысловое ингибирование" относится к производству антисмысловых РНК-транскриптов, которые обладают способностью подавлять экспрессию белка с эндогенного гена или трансгена.

Понятие "молчание гена" относится к зависящему от гомологии подавлению вирусных генов, трансгенов или эндогенных ядерных генов. Молчание гена может быть транскрипционным, когда подавление обусловлено пониженной транскрипцией пораженных генов, или пост-транскрипционным, когда подавление обусловлено повышенным круговоротом (расщепление) видов РНК, гомологичных пораженным генам (English и др., 1996). Молчание гена включает индуцированное вирусом молчание гена (Ruiz и др., 1998).

Понятие "гибридируется" в контексте настоящего описания относится к общепринятым условиям гибридизации, предпочтительно к таким условиям гибридизации, в которых используют 5×SSPE, 1% ДСН, 1× раствор Денхардта в качестве раствора и/или температуры гибридизации от 35 до 70°C, предпочтительно 65°C. После гибридизации отмывку предпочтительно осуществляют сначала с использованием 2×SSC, 1% ДСН, а затем 0,2×SSC при температуре от 35 до 75°C, в частности от 45 до 65°C, но наиболее предпочтительно при 59°C (описание обозначений SSPE, SSC и раствор Денхардта см. у Sambrook и др. loc. cit (в указанном месте)). Строгие условия гибридизации, например, описанные у Sambrook и др., выше, являются наиболее предпочтительными. Наиболее предпочтительные строгие условия гибридизации представляют собой вышеописанные условия, при которых гибридизацию и отмывку осуществляют при 65°C. Нестрогие условия гибридизации, при которых, например, гибридизацию и отмывку осуществляют при 45°C, являются менее предпочтительными, а при 35°C еще менее предпочтительными.

Понятия "гомология последовательностей или идентичность последовательностей" в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо. Понятия "идентичный" или процент "идентичности" в отношении двух или большего количества нуклеотидных или белковых последовательностей обозначает, что две или большее количество последовательностей или подпоследовательностей являются одинаковыми или имеют определенный процент одинаковых аминокислотных остатков или нуклеотидов при сопоставлении и сравнительном анализе максимального соответствия, что оценивают с помощью одного из приведенных ниже алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуальной оценки. Если две подлежащие сравнению друг с другом последовательности имеют различную длину, то понятие идентичность последовательностей предпочтительно относится к проценту нуклеотидных остатков более короткой последовательности, которые идентичны нуклеотидным остаткам более длинной последовательности. Идентичность последовательностей традиционно можно определять с помощью компьютерных программ, таких как программа Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, версия 8 для Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Программа Bestfit основана на алгоритме локальной гомологии Смита и Ватермана (Smith и Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2, 1981, с. 482-489) для поиска сегмента, имеющего самую высокую степень идентичности между двумя последовательностями. При применении Bestfit или другой программы сравнительного анализа первичной структуры последовательностей для решения вопроса о том, идентична ли конкрет-

ная последовательность на 95% референс-последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, параметры предпочтительно регулируют так, чтобы процент идентичности рассчитывать по всей длине референс-последовательности и чтобы допускать гомологию брешей вплоть до 5% от общего количества нуклеотидов в референс-последовательности. При использовании Bestfit так называемые необязательные параметры предпочтительно имеют свои предварительно установленные ("принимаемые по умолчанию") значения. Отклонения, обнаруженные при сравнении данной последовательности и описанных выше последовательностей, предлагаемых в изобретении, могут быть обусловлены, например, добавлением, делецией, заменой, инсерцией или рекомбинацией. Такое сравнение последовательностей предпочтительно можно осуществлять также с помощью программы "fasta20u66" (версия 2.0u66, сентябрь 1998 г., William R. Pearson и the University of Virginia; см. также у Pearson, 1990 прилагаемые примеры, а также <http://workbench.sdsc.edu/>). Для этой цели можно использовать установку "принимаемых по умолчанию" параметров.

Другим доказательством того, что две нуклеотидные последовательности практически идентичны, является то, что две молекулы гибридизуются друг с другом в строгих условиях. Фраза "специфично гибридизуется с" относится к связыванию, образованию дуплекса или гибридизации молекулы только с определенной нуклеотидной последовательностью в строгих условиях, когда последовательность присутствует в комплексной смеси (например, общей клеточной) ДНК или РНК. Понятие "практически связан(ы)" относится к комплементарной гибридизации между нуклеиновой кислотой-зондом и нуклеиновой кислотой-мишенью и подразумевает наличие небольшого количества ошибочных спариваний, которые можно допускать при снижении строгости сред для гибридизации для достижения требуемого обнаружения последовательности нуклеиновой кислоты-мишени.

Понятия "строгие условия гибридизации" и "условия отмывки, соответствующие строгой гибридизации" в контексте экспериментов по гибридизации нуклеиновых кислот, таких как Саузерн- и Нозерн-гибридизации, зависят от последовательности и являются разными при применении различных параметров окружающей среды. Для специфичной гибридизации более длинных последовательностей используют более высокие температуры. Подробным руководством по гибридизации нуклеиновых кислот является работа Tijssen "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes", часть I, глава 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", изд-во Elsevier, New York, 1993. Как правило, выбирают очень строгие условия гибридизации и отмывки, при которых температура примерно на 5°C ниже, чем температура плавления (T_m) для конкретной последовательности при определенной ионной силе и значении pH. Как правило, при использовании "строгих условий" зонд должен гибридизоваться с подпоследовательностью-мишенью, но не гибридизоваться с другими последовательностями.

T_m обозначает температуру (при определенной ионной силе и значении pH), при которой 50% последовательностей-мишеней гибридизуется с точно подобранным зондом. При выборе очень строгих условий гибридизации температура равна T_m конкретного зонда. Примером строгих условий гибридизации на фильтре методом Саузерн- или Нозерн-блоттинга для гибридизации комплементарных нуклеиновых кислот, которые имеют более 100 комплементарных остатков, является применение 50%-ного формамида с 1 мг гепарина при 42°C при осуществлении гибридизации в течение ночи. Примером очень строгих условий отмывки является применение 0,15M NaCl при 72°C в течение примерно 15 мин. Примером строгих условий отмывки является отмывка 0,2×SSC при 65°C в течение 15 мин (описание SSC-буфера см. у Sambrook, ниже). Часто отмывке в очень строгих условиях предшествует отмывка в ослабленных условиях для удаления фонового сигнала зонда. Примером отмывки в условиях умеренной строгости для дуплексов, состоящих, например, более чем из 100 нуклеотидов, является применение 1×SSC при 45°C в течение 15 мин. Примером ослабленных условий отмывки для дуплексов, состоящих, например, более чем из 100 нуклеотидов, является применение 4-6×SSC при 40°C в течение 15 мин. Для коротких зондов (например, состоящих примерно из 10-50 нуклеотидов) строгие условия, как правило, включают концентрации солей, соответствующие менее чем 1,0M концентрации ионов Na, как правило, примерно от 0,01 до 1,0M концентрации ионов Na (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3, при этом температура, как правило, составляет по меньшей мере примерно 30°C. Строгие условия также можно получать при добавлении дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Как правило, величина отношения сигнала к шуму, равная 2 (или выше) по сравнению с обнаруженной при применении неродственного зонда в конкретном опыте по гибридизации, свидетельствует о наличии специфической гибридизации. Нуклеиновые кислоты, которые не гибридизуются друг с другом в строгих условиях, все еще являются практически идентичными, если белки, которые они кодируют, являются практически идентичными. Это имеет место, например, в случае, когда копию нуклеиновой кислоты создают с использованием максимальной вырожденности кодонов, допускаемой генетическим кодом.

"Растение" обозначает любое растение на любой стадии развития, в частности семенное растение.

Понятие "растительная клетка" относится к структурной и физиологической единице растения, включающей протопласт и клеточную оболочку. Растительная клетка может находиться в форме выделенной отдельной клетки или культивируемой клетки или представлять собой часть высокоорганизован-

ной единицы, такой, например, как ткань растения, орган растения или целое растение.

"Культура растительных клеток" обозначает культуры структурных единиц растения, таких, например, как протопласты, клетки в культуре клеток, клетки в тканях растения, пыльца, пыльцевые трубки, семязачатки, зародышевые мешки, зиготы и зародыши на различных стадиях развития.

Понятие "растительный материал" относится к листьям, стеблям, корням, цветкам или частям цветков, плодам, пыльце, яйцеклеткам, зиготам, семенам, отводкам, культурам клеток или тканей или любой другой части или продукту растения.

"Орган растения" обозначает отдельную и четко структурно оформленную дифференцированную часть растения, такую как корень, стебель, лист, листовая почка или зародыш.

В контексте настоящего описания понятие "растительная ткань" относится к группе растительных клеток, организованных в виде структурной и функциональной единицы. Под это понятие подпадает любая ткань растения, присутствующая в самом растении или находящаяся в культуре. Это понятие включает, но не ограничиваясь только ими, целые растения, органы растения, семена растения, культуру ткани и любые группы растительных клеток, организованных в виде структурных и/или функциональных единиц. Использование этого понятия в сочетании с указанием какого-либо конкретного типа растительной ткани (или безотносительно к нему), как это имеет место выше или в ином месте в настоящем описании, не следует истолковывать в том смысле, что оно не может относиться к любому другому типу растительной ткани.

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, идентифицированным в геноме сахарной свеклы, включая их варианты и производные, где для полинуклеотидов продемонстрирована истинная косегрегация с фенотипом сахарной свеклы, ассоциированным с геном, который обуславливает стрелкование (т.е. с геном В), и применение указанных полинуклеотидов для создания маркеров, которые можно использовать для картирования и идентификации гена, обуславливающего стрелкование, или гена В. Полинуклеотидные маркеры, предлагаемые в изобретении, можно применять также для контроля качества партий поступающих в продажу семян путем скрининга поступающих в продажу семян двулетней сахарной свеклы в отношении загрязнителей, имеющих характерный для однолетнего типа развития генотип, и для идентификации однолетних/двулетних растений в программах размножения, в которых используют признак однолетнего типа развития для ускорения процесса селекции, или когда признак однолетнего типа развития интродуцируют вместе с новыми источниками генетической вариации.

Полинуклеотиды, предлагаемые в изобретении и описанные выше, можно применять также в основном на использовании трансгенов подходе для получения трансгенных растений сахарной свеклы, которые содержат указанные полинуклеотиды, стабильно интегрированные в геном сахарной свеклы. В частности, после экспрессии из генома продукт экспрессии можно использовать для модуляции характерного для процесса яровизации ответа (яровизационного ответа) растения сахарной свеклы.

В одном из объектов изобретения яровизационный ответ можно замедлять путем подавления или регуляции по типу отрицательной связи экспрессии гена В.

В другом объекте изобретения раннее стрелкование без воздействия холода можно индуцировать путем сверхэкспрессии гена В.

Настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, который картирован в локусе В или находится в непосредственной близости к нему, в частности, на расстоянии 1 сМ против хода транскрипции относительно маркеров MP0176 и GJ01 и который обладает способностью к косегрегации с маркером GJ131 (Möhrling S. и др., 2004; Gaafar R.M. и др., 2005) (фиг. 5).

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, предлагаемый в изобретении, который можно получать из области геномной ДНК, картированной на расстоянии менее 1 сМ, предпочтительно менее 0,75 сМ, более предпочтительно менее 0,5 сМ, еще более предпочтительно менее 0,3 сМ, но наиболее предпочтительно менее 0,25 сМ относительно гена В.

Полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, можно применять также для полной характеристики области, окружающей В-локус, включающий ген В, с целью идентификации других предполагаемых контролирующих время цветения перспективных генов (генов-кандидатов).

ВАС-библиотеку создавали, используя ДНК из двулетнего поступающего в продажу культивара сахарной свеклы H20. Осуществляли двукратный отбор частично расщепленных (HindIII) высокомолекулярных (НМВ) ДНК-фрагментов размером 100-400 т.п.п. ДНК-фрагменты встраивали путем лигирования в вектор pBeloBAC-Kan. Библиотека содержала 57600 клонов со средним размером вставки примерно 120 т.п.п., что соответствует примерно 8-кратному перекрытию генома. Избыточность оценивали путем скрининга с использованием однокопийных зондов, было установлено, что частота клонов из митохондриальной или плазмидной ДНК составляла менее 1%.

Эту библиотеку ВАС применяли для выделения полноразмерной геномной последовательности гена PRR7 сахарной свеклы.

В частности, для скрининга ВАС-библиотеки сахарной свеклы применяли праймеры PRR7-F и PRR7-R с помощью стандартных методов ПЦР, хорошо известных специалистам в данной области. Для скрининга пулов ДНК использовали следующие условия ПЦР: денатурацию праймеров осуществляли

при температуре от 90 до 98°C, предпочтительно примерно при 95°C, в течение 2-10 мин, предпочтительно примерно в течение 5 мин, после чего осуществляли 30-40 циклов амплификации в течение 25-35 с, предпочтительно примерно 35 циклов амплификации в течение 30 с при температуре от 90 до 98°C, предпочтительно примерно при 95°C в течение 25-35 с, предпочтительно в течение 30 с при температуре от 55 до 65°C, предпочтительно примерно при 60°C, и в течение 25-35 с, предпочтительно 30 с при температуре от 68 до 75°C, предпочтительно примерно 72°C, а затем в течение 2-8 мин, предпочтительно примерно 5 мин, при температуре от 68 до 75°C, предпочтительно примерно 72°C. ПЦР-эксперименты осуществляли с помощью соответствующей реакционной смеси, включающей приемлемую полимеразу, предпочтительно полимеразу Taq. Последующий скрининг пулов ДНК в отношении BvPRR7-фрагментов позволил идентифицировать положительный ВАС-клон, несущий соответствующий фрагмент.

Для получения полноразмерной последовательности гена BvPRR7 ранее идентифицированный ВАС-клон секвенировали с использованием стандартного метода секвенирования, такого, например, как метод пиросеквенирования, разработанный фирмой "454 Life Sciences". Два неперекрывающихся набора последовательных фрагментов, последовательность которых обладала гомологией с последовательностью EST CV301305, затем можно объединять в одной последовательности (SEQ ID NO: 5). На основе сравнительного анализа первичной структуры последовательностей набора последовательных фрагментов ВАС и EST CV301305 и на основе гомологии с последовательностью гена PRR7 из *Arabidopsis* удалось предсказать предполагаемую структуру гена BvPRR7 сахарной свеклы, включающую интроны и экзоны, которая представлена на фиг. 5. На основе указанной предсказанной геномной последовательности удалось продемонстрировать, что участок полного гена BvPRR7 размером 3,6 т.п.н. простирается на последовательности против хода транскрипции от стоп-кодона ATG и участок размером 2,2 т.п.н. простирается по ходу транскрипции относительно кодирующей области. Соответствующая аминокислотная последовательность BvPRR7 представлена в SEQ ID NO: 6. Сравнительный анализ первичной структуры аминокислотной последовательности BvPRR7 и всех представителей семейства PRR-гена из *Arabidopsis*, включая TOC1 (PRR1), PRR3, PRR5, PRR7 и PRR9, позволил проиллюстрировать выраженную консервативность мотива домна-приемника регулятора псевдоответа (PRR) (pfam00072) вблизи NH₂-конца и ССТ-мотива (pfam06203) на COOH-конце (фиг. 6). Помимо семейства PRR-гена из *Arabidopsis* BvPRR7 характеризуется также выраженной гомологией с PRR7 зерновых культур, что проиллюстрировано с помощью филогенетического дерева, представленного на фиг. 7. Установлено, что гомолог PRR7 в зерновых культурах, более известный как Ppd, представляет собой основной определяющий фактор фотопериодической реакции (Turner и др., 2005; Beales и др., 2007). Его роль в яровизационном ответе, как это обнаружено для сахарной свеклы, пока не установлена.

С учетом их гомологии с известными контролирующими время цветения генами или их возможной регуляторной функции, которую можно предположить, исходя из присутствия консервативных доменов, характерных для регуляторных белков, удалось идентифицировать несколько генов в качестве потенциальных кандидатов на роль гена В. Эти гены нуждаются в дополнительной валидации с помощью опытов, оценивающих аллельную вариабельность и/или генную экспрессию, генотипов, характерных для однолетнего и двулетнего типа развития, или на основе экспериментов по оценке комплементарности или "выключения" с использованием трансгенных подходов.

Ген В можно применять в трансгенном подходе для получения трансгенных растений сахарной свеклы, которые содержат указанные полинуклеотиды, стабильно интегрированные в геном сахарной свеклы. В частности, после экспрессии из генома продукт экспрессии можно применять для модуляции яровизационного ответа растения сахарной свеклы.

Согласно одному из объектов изобретения яровизационный ответ можно замедлять путем подавления или регуляции по типу отрицательной связи экспрессии гена В.

В другом объекте изобретения раннее стрелкование без воздействия холода можно индуцировать путем сверхэкспрессии гена В.

Ранее были разработаны методы применения молекулярных маркеров, которые можно использовать для генетического картирования, клонирования генов, размножения растений с участием маркеров и фингерпринтинга генома и исследования генетических взаимосвязей. Основой генетических маркеров являются полиморфизмы ДНК в нуклеотидных последовательностях геномных областей и их можно выявлять либо с помощью рестриктаз, или с помощью двух примированных сайтов.

Известно несколько типов молекулярных маркеров, которые можно применять для основанного на использовании маркеров отбора, в том числе полиморфизмы длины рестрикционных фрагментов (RFLP), произвольно амплифицированные полиморфные ДНК (RAPD), полиморфизмы длины амплифицированных фрагментов (AFLP), простые повторяющиеся последовательности (SSR) и однонуклеотидные полиморфизмы (SNP).

Информационное содержание различных типов маркеров может различаться в зависимости от метода, применяемого для получения данных о маркерах и популяции, в которой оценивали маркеры. Например, не всегда возможно различать геномные фрагменты, которые находятся в гомозиготном состоянии, и гетерозиготные фрагменты. В гетерологичной популяции типа F2, кодоминантные маркеры, такие как полиморфизмы длины рестрикционных фрагментов (RFLP, Botstein и др., 1980) и характеризующие-

ся кодоминантностью полиморфизмы длины амплифицированных фрагментов (AFLP, Vos и др., 1995), являются более информативными, чем доминантные маркеры, такие как произвольно амплифицированные полиморфные ДНК (RAPD, Welsh и McClelland, 1990) и характеризующиеся доминантностью AFLP. RFLP являются кодоминантными и их можно применять для идентификации уникального локуса. RFLP предусматривает применение рестриктаз для расщепления хромосомной ДНК в специфических коротких сайтах рестрикции, полиморфизмы являются результатом дупликаций сайтов или их делеций, или мутаций в сайтах рестрикции.

При использовании AFLP требуется расщепление клеточной ДНК с помощью рестриктазы перед осуществлением ПЦР и селективных нуклеотидов в праймерах для амплификации специфических фрагментов. При использовании этого метода можно оценивать вплоть до 100 полиморфных локусов, и для каждого анализа требуется лишь относительно небольшой образец ДНК.

Наиболее предпочтительным методом для амплификации нуклеотидных фрагментов, покрывающих полиморфную область растительного генома, является полимеразная цепная реакция (ПЦР) (Mullis и др., 1986), для осуществления которой используют пару праймеров, включающую "обратный" праймер и "прямой" праймер, которые обладают способностью гибридизоваться с проксимальными последовательностями, определяющими полиморфизм, в их двухцепочечном формате.

В отличие от RFLP для осуществления методов, основанных на ПЦР, требуется лишь небольшой процент (примерно 10%) ДНК, применяемой в качестве матрицы, для получения больших количеств последовательности-мишени с помощью ПЦР-амплификации.

Одним из таких основанных на ПЦР методов является RAPD, в котором применяют осуществляемую в расслабленных условиях амплификацию с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием только праймеров произвольной последовательности для создания специфических для штамма массивов неизвестных ДНК-фрагментов. Для этого метода требуются лишь очень небольшие образцы ДНК, и он позволяет анализировать большое число полиморфных локусов. Однако непредсказуемое поведение коротких праймеров, на которые влияют различные условия реакции, их доминантный путь наследования и популяционная специфичность являются основными недостатками RAPD.

Микросателлиты или простые повторяющиеся последовательности (SSR), полиморфизмы длины простых последовательностей (SSLP), короткие tandemные повторы (STR), мотивы простых последовательностей (SSM) и микросателлиты последовательностей-мишеней (STM) представляют собой класс повторяющихся последовательностей, которые широко распространены в геноме эукариот. Вариация количества и длины повторов является источником полиморфизма даже среди близкородственных особей. SSR-анализ основан на этих (несущих короткий повтор) последовательностях, которые селективно амплифицируют для выявления вариаций в простых повторяющихся последовательностях. Такие микросателлитные последовательности легко можно амплифицировать с помощью ПЦР с использованием пары фланкирующих локус-специфических олигонуклеотидов в качестве праймеров для выявления полиморфизмов длин ДНК (Litt и Luty, 1989; Weber и May, 1989).

Мутации, затрагивающие одно положение в нуклеотидной последовательности, приводящие к заменам, делециям или инсерциям, приводят к однонуклеотидным полиморфизмам или SNP, которые встречаются примерно через каждые 1,3 т.п.н. в геноме человека (Cooper и др., 1985; Kwok и др., 1996). Большинство полиморфизмов этого типа имеет только два аллеля и их называют также биаллельными локусами. Позиционное клонирование на основе SNP может облегчать идентификацию признаков болезней и ряда биологически информативных мутаций (Wang и др., 1998).

Анализы, основанные на ПЦР-удлинении, которые позволяют эффективно выявлять точечные мутации, можно применять для обнаружения SNP. Для процедуры требуются небольшое количество ДНК на образец. Три широко распространенными типами анализов выявления SNP с использованием метода ПЦР, являются методы, основанные на применении расщепленных амплифицированных полиморфных последовательностей (CAPS) (Konieczny и Ausubel, 1993; Thiel и др., 2004), производных CAPS (dCAPS) (Michaels и Amasino, 1998; Neff и др., 1998) и конформационного полиморфизма одной цепи (SSCP) (Orita и др., 1989).

CAPS-полиморфизмы представляют собой различия в длинах рестрикционных фрагментов, вызываемые SNP или инделами, которые создают или упраздняют распознаваемые обладающими эндонуклеазной активностью рестриктазами сайты рестрикции в ПЦР-ампликонах, продуцируемых специфическими для локуса олигонуклеотидными праймерами. Анализ CAPS осуществляют путем расщепления специфических для локуса ПЦР-ампликонов одной или несколькими рестриктазами и последующего разделения расщепленной ДНК на агарозных или полиакриламидных гелях.

dCAPS является модификацией метода CAPS, который позволяет выявлять большинство однонуклеотидных изменений путем использования ошибочно спаренных ПЦР-праймеров. С помощью этого метода распознаваемый рестриктазой сайт, который включает SNP, интродуцируют в ПЦР-продукт с помощью праймера, который содержит одно или несколько ошибочных спариваний с ДНК-матрицей. Затем ПЦР-продукт, модифицированный таким образом, подвергают расщеплению рестриктазой и определяют присутствие или отсутствие SNP на основе полученной рестрикционной схемы.

Метод SSCP позволяет разделять денатурированную двухцепочечную ДНК на неденатурирующем

геле и в результате позволяет определять на основе подвижности в геле вторичную структуру, а также молекулярную массу одноцепочечной ДНК.

Процедура ARMS (амплификация рефракторной мутационной системы)-ПЦР (Ye и др., 2001) предусматривает применение одной ПЦР для генотипирования SNP (Fan и др., 2003; Chiapparino и др., 2004). Состоящий из двух пар праймеров тетрапраймер используют для амплификации двух различных аллелей SNP в одной реакции ПЦР.

Для амплификации таких фрагментов можно применять альтернативные методы, такие как "лигазная цепная реакция" (ЛЦР) (Barany F., 1991)), для осуществления которой применяют две пары олигонуклеотидных зондов для экспоненциальной амплификации специфической мишени. Последовательности каждой пары олигонуклеотидов выбирают для того, чтобы позволять паре гибридизоваться с примыкающими последовательностями этой же цепи мишени. С помощью указанной гибридизации формируют субстрат для зависящей от матрицы лигазы. Также как в случае ПЦР, образовавшиеся продукты служат в качестве матрицы в последующих циклах и таким образом осуществляют экспоненциальную амплификацию требуемой последовательности.

ЛЦР можно осуществлять с олигонуклеотидами, имеющими проксимальные и дистальные последовательности одной и той же цепи полиморфного сайта. В одном из вариантов осуществления изобретения следует создавать олигонуклеотиды, включающие фактический полиморфный сайт полиморфизма. В таком варианте осуществления изобретения условия реакции выбирают так, чтобы олигонуклеотиды могли лигироваться вместе только в том случае, когда молекула-мишень либо содержит, либо лишена специфического олигонуклеотида, который является комплементарным полиморфному сайту, присутствующему в олигонуклеотиде. В другом варианте олигонуклеотиды можно выбирать так, что они не включают полиморфный сайт (см. Segev, заявка PCT WO 90/01069).

Еще один альтернативный метод, который можно применять, представляет собой "метод лигирования олигонуклеотидов" (OLA) (Landegren и др., 1988). В OLA-протоколе используют два олигонуклеотида, которые создают так, чтобы они могли гибридизоваться с примыкающими последовательностями одной цепи мишени. OLA, подобно ЛЦР, наиболее пригоден для выявления точечные мутаций. В отличие от ЛЦР в результате OLA получают "линейную", а не экспоненциальную амплификацию последовательности мишени.

Nickerson с соавторами в 1990 г. описали анализ выявления нуклеиновой кислоты, который объединяет особенности и ПЦР, и OLA (Nickerson и др., 1990). В этом методе ПЦР используют для достижения экспоненциальной амплификации ДНК-мишени, которую затем выявляют с помощью OLA. Помимо необходимости в осуществлении нескольких и разнообразных стадий процессинга, одна из проблем, возникающих при применении таких комбинированных методов, состоит в том, что они включают все проблемы, связанные как с ПЦР, так и с OLA.

Известны также схемы, основанные на лигировании двух (или большего числа) олигонуклеотидов в присутствии нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность образовавшегося "диолигонуклеотида", что приводит к амплификации диолигонуклеотида (Wu и Wallace, 1989), и их можно легко адаптировать для целей настоящего изобретения.

Таким образом, различные анализы, основанные на применении генной последовательности, предлагаемой в изобретении и описанной выше, можно создавать и применять для скрининга растительного материала в отношении присутствия или отсутствия аллеля, ассоциированного с признаком однолетности.

На основе SNP можно разрабатывать молекулярные маркеры, предпочтительно такие, как End point TaqMan®, отличающиеся от секвенированных ПЦР-продуктов тем, что их амплифицируют из однолетних и двулетних растений. При этом требуется осуществлять несколько циклов ПЦР-амплификации для того, чтобы охватить всю последовательность гена.

Затем новые молекулярные маркеры следует тестировать с использованием различных генетических фонов однолетних и двулетних растений для оценки робастности молекулярного теста.

В одном из вариантов осуществления изобретения молекулярный маркер представляет собой ДНК-фрагмент, амплифицированный с помощью ПЦР, например SSR-маркер или RAPD-маркер. В одном из вариантов осуществления изобретения присутствие или отсутствие амплифицированного ДНК-фрагмента является показателем присутствия или отсутствия самого признака или конкретного ассоциированного с признаком аллеля. В одном из вариантов осуществления изобретения различие в длине амплифицированного ДНК-фрагмента является показателем присутствия или отсутствия конкретного ассоциированного с признаком аллеля и в результате позволяет дифференцировать различные ассоциированные с признаком аллели.

В конкретном варианте осуществления изобретения микросателлитные (простые повторяющиеся последовательности) (SSR) маркеры используют для идентификации подпадающих под объем изобретения аллелей в родительских растениях и/или их предках, а также в потомстве растений, полученном в результате скрещивания указанных родительских растений.

В другом варианте осуществления изобретения маркер, основанный на однонуклеотидном полиморфизме, используют для идентификации подпадающих под объем изобретения аллелей в родитель-

ских растениях и/или их предках, а также в потомстве растений, полученном в результате скрещивания указанных родительских растений.

Еще в одном варианте осуществления изобретения маркер, основанный на делеции или инсерции ("инделе") по меньшей мере одного нуклеотида, используют для идентификации подпадающих под объем изобретения аллелей в родительских растениях и/или их предках, а также в потомстве растений, полученном в результате скрещивания указанных родительских растений.

Эти маркеры можно создавать на основе последовательности полинуклеотидов, предлагаемых в изобретении и описанных выше.

Согласно одному из объектов изобретения можно разрабатывать и применять маркеры, которые не полностью соответствуют представленным в настоящем описании, или еще не идентифицированные маркеры. На основе информации, представленной в настоящем описании, специалист в данной области может идентифицировать или создавать маркеры, которые не полностью соответствуют представленным в настоящем описании, но генетически близко сцеплены или предпочтительно локализованы в гене, обуславливающим стрелкование, или гене В, или сцеплены с маркерами, представленными в настоящем описании. Специалисту в данной области должно быть очевидно, что другие маркеры могут найти по меньшей мере такое же применение в скрининговых анализах и связанной с маркерами селекции.

Специалистам в данной области известны и доступны несколько методов или подходов, которые можно применять для идентификации и/или создания маркеров неравновесного сцепления и/или сцепленных с и/или локализованных в области гена В, а также маркеров, которые представляют собой фактически причинные мутации, ответственные характерный для двулетнего типа развития генотип. Известные специалистам в данной области подходы включают, но не ограничиваясь только ими.

Применение описанных последовательностей/маркеров в основанных на использовании гибридизации подходах для идентификации другой последовательности в представляющей интерес области: праймерные последовательности, представленные в настоящем описании, и/или последовательности маркеров/генов (или их фрагмент), которые можно определять с помощью праймерных последовательностей, представленных в настоящем описании, можно применять в качестве зондов (гибридирующихся) для выделения нуклеотидных последовательностей/генов, фланкирующих маркеры, и/или сцепленных с областью гена В и/или локализованных в ней, и/или специфических для нее, из образца геномной нуклеиновой кислоты и/или образца РНК или кДНК, или пула образцов (например, осуществляя скрининг геномных ресурсов типа ВАС-библиотек или скрининг библиотек гДНК или кДНК).

Применение описанных последовательностей/маркеров в основанных на использовании ПЦР подходах для идентификации другой последовательности в представляющей интерес области: праймерные последовательности, представленные в настоящем описании, и/или последовательности маркеров/генов(-кандидатов) (или их фрагмент), которые можно определять с помощью праймерных последовательностей, представленных в настоящем описании, можно применять в качестве праймеров для (ПЦР)-амплификации нуклеотидной последовательности/гена, фланкирующего QTL-область и/или сцепленного с ней, и/или ассоциированного с ней, и/или специфического в отношении нее из образца геномной нуклеиновой кислоты и/или образца РНК или кДНК, или пула образцов, либо выделенных из конкретной растительной ткани, либо не выделенных из нее, и/или после специфической обработки растения, и из растения сахарной свеклы и в принципе из любого другого организма, имеющего достаточную степень гомологии с сахарной свеклой.

Применение описанных последовательностей/маркеров в основанных на использовании ПЦР подходах для идентификации другой последовательности в представляющей интерес области: нуклеотидные последовательности/гены одного или нескольких маркеров можно определять после создания внутренних праймеров для указанных маркерных последовательностей и применять для определения дополнительных фланкирующих последовательностей/генов в области гена В и/или генетически сцепленных и/или ассоциированных с признаком.

Применение описанных последовательностей/маркеров в основанных на использовании картирования и/или сравнительного картирования для идентификации маркеров в одном(их) и том(тех) же области(ях) (определение местоположения (позиционирование) гена В на других картах): на основе информации о местоположении и/или информации о маркерах, представленной выше, маркеры любого типа можно идентифицировать на основе подходов с использованием генетического картирования, в конечном счете (если в этом есть необходимость) путем определения местоположения описанных маркеров (методом генетического картирования или экстраполяции на основе общих маркеров на картах) на генетической(их) карте(ах) (высокой плотности) и/или интегрированной(ых) генетической(их) или консенсусной(ых) карты(карт). Маркеры, которые уже являются известными и/или новые маркеры, генетически сцепленные и/или расположенные вблизи описанных маркеров и/или области гена В, можно идентифицировать и/или получать и в конечном счете применять для картирования (точного) гена В и/или клонирования гена В, и/или применения для MAS-селекции.

Применение описанных последовательностей/маркеров в in-silico-подходах (методы молекулярного моделирования на основе набора вычислительных методов) для идентификации дополнительных последовательностей/маркеров/генов-кандидатов в области(ях) гена В: праймерные последовательности,

представленные в настоящем описании, и/или последовательности маркеров/генов-кандидатов (или их фрагмент), которые можно определять с помощью праймерных последовательностей, представленных в настоящем описании, или на основе сцепленных маркеров, можно использовать в *in-silico*-методах для поиска в базах данных последовательностей или белков (например, с использованием программы BLAST) (дополнительных) фланкирующих и/или гомологичных последовательностей/генов, и/или аллельного разнообразия (как геномных последовательностей, так и/или последовательностей кДНК или даже белков, полученных как из представителей рода *Capsicum* (перец), так и/или из любого другого организма), которые генетически сцеплены и/или ассоциированы с признаками, указанными в настоящем описании, и/или локализованы в области гена В.

Применение описанных последовательностей/маркеров в основанных на физическом картировании подходах (определение местоположения гена В на физической карте или в геномной последовательности): праймерные последовательности, представленные в настоящем описании, и/или последовательности маркеров/генов (или их фрагменты), которые можно определять с помощью праймерных последовательностей, представленных в настоящем описании, или с помощью других маркеров, генетически сцепленных с маркерами, представленными в настоящем описании, и/или локализованных в области гена В, можно позиционировать на физической карте и/или в (полной) геномной последовательности в принципе любого организма, имеющей достаточную степень гомологии для идентификации (перспективных) последовательностей/маркеров/генов, которые можно применять для картирования (точного) гена В и/или клонирования гена В, и/или применения для MAS-селекции.

Применение описанных последовательностей/маркеров для определения местоположения гена В на других (физических) картах или геномах (других видов..., при этом для перца, естественно, первостепенный интерес имеют другие представители пасленовых (*Solanaceae*), такие как томаты и картофель, но можно применять также модельные виды типа *Arabidopsis*): праймерные последовательности, представленные в настоящем описании, и/или последовательности маркеров/генов (или их фрагменты), которые можно определять с помощью праймерных последовательностей, представленных в настоящем описании, можно применять для подходов, основанных на сравнительном картировании генома или синтении, для идентификации гомологичной области и последовательностей гомологов и/или ортологов/генов (кандидатов), генетически сцепленных с областью гена В и/или расположенных в ней, и которые можно применять для картирования (точного) гена В и/или клонирования гена В, и/или применения для MAS-селекции.

Применение описанных последовательностей/маркеров для отбора соответствующих особей, с помощью которых можно идентифицировать маркеры в представляющей интерес области с помощью генетических подходов: праймерные последовательности и/или маркеры, представленные в настоящем описании, можно использовать для отбора особей с различными/контрастирующими аллелями гена В. Генетические подходы и/или анализ объединенных сегрегантов (BSA, Michelmore и др., 1991) можно применять для идентификации маркеров/генов в конкретной представляющей интерес области (области гена В) и/или области, ассоциированной или генетически сцепленной с описанными признаками.

Применение представленной информации для поиска (позиционных) генов-кандидатов: представленную информацию можно применять для идентификации позиционных и/или функциональных генов-кандидатов, которые могут быть ассоциированы и/или генетически сцеплены с описанными признаками.

В частности, маркеры, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять в анализе аллельной дискриминации, прежде всего в анализе, который позволяет различать (дискриминировать) различные гаплотипы в группах растений сахарной свеклы, имеющих генотип, характерный для двулетнего типа развития. Указанный анализ базируется на применении набора полинуклеотидных зондов, содержащего две различные молекулы-зонды, которые комплементарны, например, подобласти гена *BvPRR7*, которую можно получать путем ПЦР-амплификации с использованием "прямого" праймера *PRR7-F* и "обратного" праймера *PRR7-R*, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 соответственно, где молекулы-зонды различаются только одним ошибочным спариванием оснований, прежде всего ошибочным спариванием оснований в положении № 631.

Другим объектом изобретения является анализ, включающий применение маркеров, с помощью которых можно осуществлять специфическую идентификацию однолетних растений и двулетних растений, и поэтому их можно применять, например, для контроля качества партий семян.

В частности, в изобретении предложен анализ, базирующийся на применении набора олигонуклеотидных зондов, содержащих две различные молекулы-зонды, которые комплементарны, например, подобласти гена *BvPRR7*, которую можно получать путем ПЦР-амплификации с использованием "прямого" праймера *PRR7-F* и "обратного" праймера *PRR7-R*, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 соответственно, где молекулы-зонды различаются только одним ошибочным спариванием оснований, прежде всего ошибочным спариванием оснований в положении № 631.

Большая часть производств предназначенных для продажи семян сахарной свеклы находится на юге Франции и севере Италии. В обоих регионах присутствуют однолетние сорные виды свеклы, это может приводить к загрязнению их пылью получаемых продуктов и как следствие, к появлению характерного для однолетнего типа развития генотипа у предназначенных для продажи семян. Это является

неприемлемым для покупателей, и поэтому все предназначенные для продажи партии семян выращивают в регионах, таких как Аргентина, в которых сорные виды свекольных не вырастают непосредственно после сбора семян. Растения являются неярковизированными и наличие стрелок используют для идентификации партий, загрязненных характерным для однолетнего типа развития генотипом.

Признак однолетнего типа развития растений проявляется в зависимости от состояния гена В как моногенный доминантный признак; таким образом, потребность в ярковизации у двулетних растений является рецессивной. Таким образом, можно предположить, что трансформация определяющего однолетний тип развития аллеля *BvPRR7* в характерный для двулетнего типа развития генотип приводит к включению признака ежегодного цветения, в характерный для двулетнего типа развития акцепторный генотип. Для подтверждения этой гипотезы кодирующей последовательностью определяющего однолетний тип развития аллеля гена *BvPRR7*, находящейся под контролем характерных для однолетнего типа развития промотора и фрагмента терминатора, трансформируют характерный для двулетнего типа развития генотип, такой, например, как G018. Трансформацию можно осуществлять методами, известными в данной области, такими как методы, описанные у Chang и др., 2002, используя меристему сахарной свеклы в качестве эксплантата и ген фосфоманноизомеразы (PMI) в качестве селективируемого маркера. Трансгенные побеги отбирают по признаку экспрессии маркера селекции, такого, например, как PMI-активность (Joersbo и др., 1998), и затем укореняют, высаживают в почву и переносят в теплицу. В качестве отрицательного контроля используют нетрансгенные побеги, которые подвергают такой же процедуре регенерации *in vitro*, но без заражения *Agrobacterium* и селекции. Растения выращивают в вегетационных камерах при постоянной температуре 18°C и фотопериоде 17 ч света и 7 ч темноты. В этих условиях ни у одного из нетрансгенных контролей не должно быть обнаружено каких-либо признаков стрелкования в течение периода наблюдения, в то время как однолетние контрольные растения в норме должны выбрасывать стрелку в пределах 8-недельного периода времени. В отличие от нетрансгенных двулетних контрольных растений у большинства трансгенов стрелкование должно начинаться через 4-10 недель, и они должны обладать основным признаком, характерным для однолетних растений, несмотря на их генетический фон, соответствующий двулетним растениям. Трансгенные растения, у которых обнаружено стрелкование и цветение, подвергают перекрестному опылению двулетней поддерживающей линией с получением потомства. У растений-потомков оценивают активность маркера селекции и затем оценивают в отношении стрелкования и цветения без ярковизации. Большая часть потомков должна характеризоваться коэффициентом сегрегации 1:1 и прямой корреляцией между PMI-активностью и признаком однолетности. Эти данные должны недвусмысленно подтверждать причинную связь между *BvPRR7* и независимым от ярковизации цветением у сахарной свеклы.

BvPRR7 играет основную роль в ярковизационном ответе сахарной свеклы и поэтому его можно применять для создания устойчивости к стрелкованию у растений сахарной свеклы путем подавления ярковизационного ответа. Для этой цели кДНК-фрагмент *BvPRR7*, такой, например, как фрагмент размером 0,6 т.п.н., представленный в SEQ ID NO: 1, помещают в кассету для РНКi под контроль конститутивного промотора. Приемлемыми конститутивными промоторами являются, например, промотор *Ubi3 Arabidopsis* (Norris и др., 1993), промотор 35S *CaMV* или другие промоторы, для которых известно, что они обеспечивают конститутивную экспрессию сахарной свеклы. Кассета экспрессии содержит также селективируемый маркерный ген под контролем приемлемого промотора. В частности, маркерный ген кодирует маркер положительной селекции, такой как фосфоманноизомераза или ксилоизомераза. Инвертированный повтор *BvPRR7*-фрагмента может быть отделен вторым интроном от гена *StLS1* картофеля (Eckes и др., 1986; Vancanneyt и др., 1990) для стабилизации РНКi-кассеты, но также для повышения эффективности процесса РНКi (Wang и Waterhouse, 2001; Smith и др., 2000).

Затем РНКi-кассетой можно трансформировать определяющий признак двулетнего развития генотип сахарной свеклы, такой, например, как G018, согласно описанному выше методу. Трансгенные побеги отбирают по признаку экспрессии маркера селекции, такого, например, как PMI-активность (Joersbo и др., 1998). Дающие положительную реакцию побеги и нетрансгенные контрольные побеги укореняют и переносят в теплицу для акклиматизации в течение минимум двух недель при 18°C до их обработки для ярковизации. Согласно принятым методам трансгенные растения подвергают обработке для ярковизации, которая предусматривает выдерживание в течение 14 дней при постоянной температуре 6°C и 12-часовой низкой искусственной освещенности.

Перед воздействием индуцирующих стрелкование условий ярковизированные растения медленно акклиматизируют в течение двух недель в климатических камерах путем ступенчатого повышения температуры с 10 до 18°C. Затем растения пересаживают в более крупные горшки (2 л) и осуществляют мониторинг стрелкования, выдерживая их при постоянной температуре 18°C и фотопериоде с длительным световым днем 17 ч света/7 ч темноты. У нетрансгенных контрольных растений, как правило, стрелкование начинается в период между 4-6 неделями после ярковизации. У трансгенных растений с подавленным геном *BvPRR7* часто наблюдается замедление стрелкования на период времени, составляющий от лишь двух недель и вплоть до более чем 2 месяцев. В некоторых случаях стрелкование вообще не происходило в условиях, существующих в теплице. Помимо замедления стрелкования и цветения трансгенные растения развиваются нормально и не имеют фенотипических аномалий. В целом, для растений с замедлен-

ным стрелкованием характерно большее количество листьев в момент стрелкования в результате пролонгированной вегетативной стадии.

Получение достаточных уровней трансгенной экспрессии в соответствующих растительных тканях является важным аспектом выращивания созданных с помощью генной инженерии культурных растений. Экспрессия гетерологичных последовательностей ДНК в растении-хозяине зависит от присутствия функционально связанного промотора, который функционирует в растении-хозяине. Выбор промоторной последовательности должен определять время, когда экспрессируется гетерологичная последовательность ДНК, и место в организме, где это происходит.

Например, если существует потребность в сверхэкспрессии, то можно применять растительный промоторный фрагмент, который обеспечивает экспрессию гена во всех тканях регенерированного растения. Указанные промоторы в контексте настоящего описания обозначены как «конститутивные» промоторы, и они обладают активностью при большинстве условий окружающей среды и стадиях развития или клеточной дифференцировки. Примерами конститутивных промоторов являются область инициации транскрипции вируса мозаики цветной капусты (CaMV) 35S, 1'- или 2'-промотор, выведенный из Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens*, и другие области инициации транскрипции из различных растительных генов, которые известны специалистам в данной области. Такие гены включают, например, ген AP2, ACT11 из *Arabidopsis* (Huang и др., *Plant Mol. Biol.* 33, 1996, с. 125-139), Cat3 из *Arabidopsis* (GenBank NO: U43147, Zhong и др., *Mol. Gen. Genet.* 251, 1996, с. 196-203), ген, кодирующий стеароил-АПБ (ацилпереносающий белок)-десатуразу из *Brassica napus* (Genbank NO: X74782, Solocombe и др., *Plant Physiol.* 104, 1994, с. 1167-1176), GPc1 из кукурузы (GenBank NO: X15596, Martinez и др., *J. Mol. Biol.* 208, 1989, с. 551-565) и Gpc2 из кукурузы (GenBank NO: U45855, Manjunath и др., *Plant Mol. Biol.* 33, 1997, с. 97-112).

В другом варианте промотор может обеспечивать экспрессию молекул нуклеиновых кислот в конкретной ткани или может более точно контролироваться условиями окружающей среды или стадией развития. Примерами условий окружающей среды, которые могут влиять на транскрипцию с помощью индуцибельных промоторов, являются анаэробные условия, повышенная температура или присутствие света. Такие промоторы в контексте настоящего описания обозначены как "индуцибельные" или "тканеспецифические" промоторы. Специалисту в данной области должно быть очевидно, что тканеспецифический промотор может обеспечивать экспрессию функционально связанных последовательностей в тканях, отличных от ткани-мишени. Таким образом, в контексте настоящего описания тканеспецифический промотор представляет собой промотор, который обеспечивает экспрессию прежде всего в ткани-мишени, но может контролировать также определенный уровень экспрессии в других тканях.

Примерами промоторов, действие которых зависит от стадии развития, являются промоторы, которые иницируют транскрипцию только (или практически только) в определенных тканях, таких как плод, семена или цветки. Промоторы, которые обеспечивают экспрессию нуклеиновых кислот в семяпочках, цветках или семенах, являются наиболее предпочтительными согласно настоящему изобретению. В контексте настоящего описания под специфическим или предпочтительным для семени промотором подразумевается промотор, который обеспечивает экспрессию специфически или предпочтительно в тканях семян, например, указанные промоторы могут быть специфическими для семяпочки, специфическими для зародыша, специфическими для эндосперма, специфическими для интегумента, специфическими для семенной оболочки или специфическими для определенных комбинаций этих органов. Их примерами являются промотор из специфического для семяпочки гена BEL1, который описан у Reiser и др., *Cell* 83, 1995, с. 735-742 (GenBank NO: U39944). Другие пригодные специфические для семян промоторы выводятся из следующих генов: MAC1 из кукурузы (Sheridan и др., *Genetics* 142, 1996, с. 1009-1020), Cat3 из кукурузы (GenBank NO: L05934, Abler и др., *Plant Mol. Biol.* 22, 1993, с. 10131-1038), кодирующий олеозин ген размером 18 т.п.н. из кукурузы (GenBank NO: J05212, Lee и др., *Plant Mol. Biol.* 26, 1994, с. 1981-1987), viviparous-1 из *Arabidopsis* (Genbank NO: U93215), кодирующий олеозин ген из *Arabidopsis* (Genbank NO: Z17657), Atmycl из *Arabidopsis* (Urao и др., *Plant Mol. Biol.* 32, 1996, с. 571-576), семейство генов 2s запасного белка семян *Arabidopsis* (Conceicao и др., *Plant* 5, 1994, с. 493-505), кодирующий олеозин ген размером 20 т.п.н. из *Brassica napus* (GenBank NO: M63985), napA из *Brassica napus* (GenBank NO: J02798, Josefsson и др., *JBL* 26, 1987, с. 12196-1301, семейство генов напина из *Brassica napus* (Sjodahl и др., *Planta* 197, 1995, с. 264-271), ген, кодирующий запасный белок 2S, из *Brassica napus* (Dasgupta и др., *Gene* 133, 1993, с. 301-302), гены, кодирующие олеозин А (GenBank NO: U09118) и олеозин В (GenBank NO: U09119) из сои, и ген, кодирующий низкомолекулярный богатый серой белок из сои (Choi и др., *Mol Gen. Genet.* 246, 1995, с. 266-268).

В другом варианте можно идентифицировать конкретные последовательности, представляющие собой промотор с требуемыми характеристиками экспрессии или промотор с повышенной экспрессионной активностью, или эти или подобные последовательности интродуцировать в последовательности посредством мутации. Кроме того, можно осуществлять мутагенез этих последовательностей для повышения экспрессии трансгенов в конкретных видах.

Кроме того, можно применять промоторы, в которых объединены элементы более одного промотора. Например, в US 5491288 описана комбинация промотора вируса мозаики цветной капусты и промотора гистона. Таким образом, элементы промоторов, представленных в настоящем описании, можно объ-

единять с элементами других промоторов.

Для применения в настоящем изобретении доступны различные регулирующие транскрипцию 5'- и 3'-последовательности. Терминаторы транскрипции ответственны за терминацию транскрипции и правильное полиадезилирование мРНК. 3'-нетранслируемая регуляторная последовательность ДНК предпочтительно включает от примерно 50 до примерно 1000, более предпочтительно от примерно 100 до примерно 1000 пар оснований (нуклеотидов) и содержит растительные терминирующие транскрипцию и трансляцию последовательности. Приемлемые терминаторы транскрипции и терминаторы, для которых известно, что они функционируют в растениях, представляют собой терминатор 35S CaMV, терминатор tml, терминатор нопалинсинтазы, терминатор E9 rbcS гороха, терминатор для транскрипта T7 из гена октопинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* и 3'-конец генов протеазных ингибиторов I или II из картофеля или томатов, хотя можно применять также другие 3'-концевые элементы, известные специалистам в данной области. В другом варианте можно применять также терминатор коиксина гамма, олеозина 3 или другие терминаторы из рода *Coix*.

Предпочтительными 3'-элементами являются элементы из гена нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan и др., 1983), терминатор для транскрипта T7 из гена октопинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* и 3'-концевые элементы генов протеазных ингибиторов I или II из картофеля или томатов.

Поскольку последовательность ДНК, расположенная между сайтом инициации транскрипции и стартовым кодоном кодирующей последовательности, т.е. нетранслируемая лидерная последовательность, может влиять на экспрессию гена, может оказаться желательным применять конкретную лидерную последовательность. Считается, что предпочтительными лидерными последовательностями являются последовательности, которые включают последовательности, для которых предсказана способность обеспечивать оптимальную экспрессию присоединенного гена, т.е. предпочтительные консенсусные лидерные последовательности, которые могут повышать или поддерживать стабильность мРНК и предупреждать несоответствующую инициацию трансляции. Выбор указанных последовательностей должен быть очевиден специалистам в данной области в свете настоящего описания. Наиболее предпочтительными являются последовательности, выведенные из генов, характеризующихся высоким уровнем экспрессии в растениях.

Другие последовательности, для которых обнаружена способность повышать генную экспрессию в трансгенных растениях, представляют собой интронные последовательности (например, из генов *Adhl*, *bronzel*, *actin 1*, *actin 2* (WO 00/760067), или интрон синтазы сазарозы) и вирусные лидерные последовательности (например, из вирусов TMV, MCMV и AMV). Например, известно несколько нетранслируемых лидерных последовательностей, полученных из вирусов, которые обладают способностью повышать экспрессию. В частности, установлено, что лидерные последовательности из вируса табачной мозаики (TMV), вируса хлорозной пятнистости кукурузы (MCMV) и вирус мозаики люцерны (AMV) обладают эффективностью в отношении повышения экспрессии (например, Gallie и др., 1987; Skuzeski и др., 1990). Другие известные в данной области лидерные последовательности представляют собой, но не ограничиваясь только ими: лидеры пикорнавирусов, например, лидер EMCV (5'-некодирующая область вируса энцефаломиокардита) (Elroy-Stein и др., 1989); лидеры потивирусов, например, лидер TEV (вирус табачной гравировки); лидер MDMV (вирус мозаичной карликовости кукурузы); лидер человеческого белка, связывающего тяжелую цепь иммуноглобулинов (BiP) (Masejak и др., 1991); нетранслируемый лидер из мРНК оболочечного белка вируса мозаики люцерны (AMV RNA 4), (Jobling и др., 1987), лидер вируса табачной мозаики (TMV) (Gallie и др., 1989; и лидер хлорозной пятнистости кукурузы (MCMV) (Lommel и др., 1991) (см. также Della-Cioppa и др., 1987).

При необходимости можно включать также регуляторные элементы, такие как интрон 1 *Adh* (Callis и др., 1987), интрон синтазы сахарозы (Vasil и др., 1989) или элемент TMV-омега (Gallie и др., 1989).

Примерами энхансеров являются элементы промотора 35S CaMV, генов октопинсинтазы (Ellis и др., 1987), гена актина I риса, гена алкогольдегидрогеназы кукурузы (Callis и др., 1987), гена I морщинистости кукурузы (Vasil и др., 1989), элемент TMV-омега (Gallie и др., 1989) и промоторы из эукариотических организмов кроме растений (например, дрожжей; Ma и др., 1988).

Известно два основных метода контроля экспрессии, такие как обеспечение сверхэкспрессии и пониженной экспрессии. Для достижения сверхэкспрессии можно использовать инсерцию одной или нескольких дополнительных копий выбранного гена. Однако к настоящему времени отсутствует информация о растениях или их потомстве, исходно трансформированных одной или несколькими дополнительными копиями нуклеотидной последовательности, для которых характерна пониженная экспрессия, а также сверхэкспрессия. Известны два основных метода для достижения пониженной экспрессии, которые обычно обозначают как "антисмысловая регуляция по типу отрицательной связи" и "смысловая регуляция по типу отрицательной связи" (смысловую регуляцию по типу отрицательной связи обозначают также как "косупрессия"). В целом, эти процессы обозначают как "молчание генов". Оба эти метода позволяют осуществлять ингибирование экспрессии гена-мишени.

Согласно настоящему изобретению для изменения экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, предлагаемой в настоящем изобретении, можно применять один из следующих путей.

"Смысловая" супрессия

Изменение экспрессии нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, предпочтительно снижение ее экспрессии, получают с помощью "смысловой" супрессии (описание см., например, у Jorgensen и др., *Plant Mol. Biol.* 31, 1996, с. 957-973). В этом случае полную нуклеотидную последовательность, предлагаемую в настоящем изобретении, или ее часть включают в молекулу ДНК. Молекулу ДНК предпочтительно функционально связывают с промотором, который обладает способностью функционировать в клетке, содержащей ген-мишень, предпочтительно растительной клетке, и интродуцируют в клетку, в которой может происходить экспрессия нуклеотидной последовательности. Нуклеотидную последовательность встраивают в молекулу ДНК в "смысловой ориентации", т.е. таким образом, что кодирующая цепь нуклеотидной последовательности может транскрибироваться. В предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность является полностью транслируемой, и вся генетическая информация, содержащаяся в нуклеотидной последовательности или ее части, транслируется в полипептид. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность является частично транслируемой и продуктом трансляции является короткий пептид. В предпочтительном варианте осуществления изобретения для этой цели используют инсерцию по меньшей мере одного преждевременного стоп-кодона в нуклеотидную последовательность, что снижает трансляцию наполовину. В другом более предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность транскрибируется, но при этом не образуется продукт трансляции. Для этой цели, как правило, используют удаление стартового кодона, например "ATG", полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения молекулу ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность или ее часть, стабильно интегрируют в геном растительной клетки. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения молекулу ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность или ее часть, включают во внехромосомно реплицирующуюся молекулу.

В трансгенных растениях, которые содержат одну из описанных непосредственно выше молекул ДНК, экспрессию нуклеотидной последовательности, соответствующей нуклеотидной последовательности, которая содержится в молекуле ДНК, предпочтительно понижают. Предпочтительно нуклеотидная последовательность, входящая в ДНК, идентична по меньшей мере на 70% нуклеотидной последовательности, экспрессию которой понижают, более предпочтительно идентична по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно идентична по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно идентична по меньшей мере на 95%, еще более предпочтительно идентична по меньшей мере на 99%.

"Антисмысловая" супрессия

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения изменение экспрессии нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, предпочтительно снижение ее экспрессии, осуществляют с помощью "антисмысловой" супрессии. Полную нуклеотидную последовательность, предлагаемую в настоящем изобретении, или ее часть включают в молекулу ДНК. Молекулу ДНК предпочтительно функционально связывают с промотором, который обладает способностью функционировать в клетке, содержащей ген-мишень, и интродуцируют в растительную клетку, в которой может происходить экспрессия нуклеотидной последовательности. Нуклеотидную последовательность встраивают в молекулу ДНК в "антисмысловой ориентации", т.е. таким образом, что может транскрибироваться обратный комплемент (называемый также иногда некодирующей цепью) нуклеотидной последовательности. В предпочтительном варианте осуществления изобретения молекулу ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность или ее часть, стабильно интегрируют в геном растительной клетки. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения молекулу ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность или ее часть, включают во внехромосомно реплицирующуюся молекулу. С целью дополнительной иллюстрации ниже процитирован ряд публикаций, в которых описан указанный подход (Green P.J. и др., *Ann. Rev. Biochem.* 55, 1986, с. 569-597; van der Krol A.R. и др., *Antisense Nuc. Acids & Proteins*, 1991, с. 125-141; Abel P.P. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 199, с. 6949-6952; Ecker J.R. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, август 1986 г., с. 5372-5376).

В трансгенных растениях, которые содержат одну из описанных непосредственно выше молекул ДНК, экспрессию нуклеотидной последовательности, соответствующей нуклеотидной последовательности, которая содержится в молекуле ДНК, предпочтительно понижают. Предпочтительно нуклеотидная последовательность, входящая в ДНК, идентична по меньшей мере на 70% нуклеотидной последовательности, экспрессию которой понижают, более предпочтительно идентична по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно идентична по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно идентична по меньшей мере на 95%, еще более предпочтительно идентична по меньшей мере на 99%.

Гомологичная рекомбинация

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одну геномную копию, соответствующую нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, модифицируют в геноме растения путем гомологичной рекомбинации, что дополнительно проиллюстрировано у Paszkowski и др., *EMBO Journal* 7, 1988, с. 4021-4026.

Этот метод основан на способности гомологичных последовательностей распознавать друг друга и обмениваться друг с другом нуклеотидными последовательностями с помощью процесса, известного как

гомологичная рекомбинация. Гомологичная рекомбинация может происходить между хромосомной копией нуклеотидной последовательности в клетке и внесенной копией нуклеотидной последовательности, интродуцированной в клетку путем трансформации. Таким образом точно интродуцируют специфические модификации в хромосомную копию нуклеотидной последовательности. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения можно модифицировать регуляторные элементы нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении. Указанные регуляторные элементы легко получать путем скрининга геномной библиотеки с использованием нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, или ее части в качестве зонда. Существующие регуляторные элементы заменяют различными регуляторными элементами, изменяя тем самым экспрессию нуклеотидной последовательности, или их подвергают мутации или изымают путем делеции, упраздняя тем самым экспрессию нуклеотидной последовательности. Согласно другому варианту осуществления изобретения нуклеотидную последовательность модифицируют путем делеции части нуклеотидной последовательности или полной нуклеотидной последовательности или с помощью мутации. Экспрессия мутантного полипептида в растительной клетке подпадает также под объем настоящего изобретения. Опубликовано более современное усовершенствование этого метода с целью нарушения эндогенных растительных генов (Kempin и др., *Nature* 389, 1997, с. 802-803 и Miao и Lam, *Plant J.*, 7, 1995, с. 359-365).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения мутацию в хромосомной копии нуклеотидной последовательности интродуцируют путем трансформации клетки химерным олигонуклотидом, состоящим из смежного участка остатков РНК и ДНК, имеющего конформационные особенности дуплексной структуры с двумя кэпами в виде шпилек на концах. Дополнительной особенностью олигонуклеотида является, например, 2'-О-метилирование остатков РНК. Последовательность РНК/ДНК создают так, чтобы она была выровнена с последовательностью хромосомной копии нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, и содержала требуемую нуклеотидную замену (например, этот метод дополнительно описан в US 5501967 и у Zhu и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1999, с. 8768-8773).

Рибозимы

В другом варианте осуществления изобретения РНК, кодирующую полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении, расщепляют с помощью каталитической РНК или рибозима, специфического для указанной РНК. Рибозим экспрессируется в трансгенных растениях, что приводит к снижению уровня РНК, кодирующей полипептид, в растительных клетках и в результате к снижению уровня полипептида, накапливаемого в клетках. Этот метод описан также в US 4987071.

Доминантно-негативные мутации

В другом варианте осуществления изобретения изменяют активность полипептида, кодируемого нуклеотидными последовательностями, предлагаемыми в настоящем изобретении. Для этой цели используют экспрессию доминантно-негативных мутантов белков в трансгенных растениях, что приводит к потере активности эндогенного белка.

Аптамеры

В другом варианте осуществления изобретения активность полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, ингибируют путем экспрессии в трансгенных растениях лигандов нуклеиновых кислот, так называемых аптамеров, которые специфически связываются с белком. Аптамеры предпочтительно получают с помощью метода SELEX (системная эволюция лигандов экспоненциальным обогащением). При применении метода SELEX перспективную смесь (смесь-кандидат) одноцепочечных нуклеиновых кислот, содержащих области рандомизированной последовательности, приводят в контакт с белком и нуклеиновые кислоты, обладающие повышенной аффинностью к мишени, отделяют от остальной части перспективной смеси. Отделенные нуклеиновые кислоты амплифицируют с получением обогащенной лигандами смеси. После нескольких итераций получают нуклеиновую кислоту, обладающую оптимальной аффинностью к полипептиду, и применяют для экспрессии в трансгенных растениях. Этот метод описан также в US 5270163.

Белки, содержащие домен "цинковых пальцев"

Белок, содержащий домен "цинковых пальцев", который связывается с нуклеотидной последовательностью, предлагаемой в настоящем изобретении, или с ее регуляторной областью, можно применять также для изменения экспрессии нуклеотидной последовательности. Предпочтительно транскрипцию нуклеотидной последовательности понижают или повышают. Белки, содержащие домен "цинковых пальцев", описаны (см., например, у Beerli и др., *PNAS* 95, 1998, с. 14628-14633 или в WO 95/19431, WO 98/54311 или WO 96/06166, все публикации полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки).

dsРНК

Для изменения экспрессии нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, можно использовать также интерференцию dsРНК, описанную, например, в WO 99/32619, WO 99/53050 или WO 99/61631, которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Инсерция молекулы ДНК (инсерционный мутагенез)

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения молекулу ДНК встраивают в

хромосомную копию нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, или ее регуляторную область. Предпочтительно такая молекула ДНК содержит транслоцируемый элемент, обладающий способностью к транспозиции в растительной клетке, такой, например, как, Ac/Ds, Em/Spm, мутатор. В другом варианте молекула ДНК содержит пограничную последовательность Т-ДНК из Т-ДНК *Agrobacterium*. Молекула ДНК может содержать также сайт, распознаваемый рекомбиназой или интегразой, которую можно применять для удаления части молекулы ДНК из хромосомы растительной клетки. Вариант этого метода описан в примере 2. Под объем изобретения подпадают также методы инсерционного мутагенеза, в которых используют Т-ДНК, транспозоны, олигонуклеотиды, или другие методы, известные специалистам в данной области. Методы, основанные на применении Т-ДНК и транспозона для инсерционного мутагенеза, описаны у Winkler и др., *Methods Mol. Biol.* 82, 1989, с. 129-136 и Martienssen, *PNAS* 95, 1998, с. 2021-2026, публикации полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Делеционный мутагенез

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения мутацию молекулы нуклеиновой кислоты, предлагаемой в настоящем изобретении, создают в геномной копии последовательности в клетке или растении путем делеции части нуклеотидной последовательности или регуляторной последовательности. Методы делеционного мутагенеза известными специалистам в данной области (см., например, Miao и др., *Plant J.* 7, 1995, с.359).

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения указанную делецию создают произвольно в большой популяции растений с помощью химического мутагенеза или облучения и растение, имеющее делецию в гене, предлагаемом в настоящем изобретении, выделяют путем стратегий "прямой генетики" и "обратной генетики". Известно, что облучение быстрыми нейтронами или гамма-лучами вызывает делеционные мутации у растений (Silverstone и др., *Plant Cell*, 10, 1998, с. 155-169; Bruggemann и др., *Plant J.*, 10, 1996, с. 755-760; Redei и Koncz в *Methods in Arabidopsis Research*, изд-во World Scientific Press, 1992, с. 16-82). Делеционные мутации в гене, предлагаемом в настоящем изобретении, можно восстанавливать на основе стратегии "обратной генетики" с помощью ПЦР с использованием объединенных групп геномных ДНК, как описано для *C. elegans* (Liu и др., *Genome Research*, 9, 1999, с. 859-867). Стратегия "прямой генетики" включает мутагенез линии, для которой характерно пост-транскрипционное молчание генов (PTGS), с последующим скринингом М2-потомства по признаку отсутствия PTGS. Следует ожидать, что среди этих мутантов у некоторых должен быть нарушен ген, предлагаемый в настоящем изобретении. Это можно оценивать с помощью Саузерн-блоттинга или ПЦР гена, предлагаемого в настоящем изобретении, с геномной ДНК этих мутантов.

Сверхэкспрессия в растительной клетке

Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления изобретения осуществляют сверхэкспрессию в растительной клетке нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, которая кодирует ген В, прежде всего ген BvPRR7. Примеры молекул нуклеиновых кислот и экспрессионных кассет для сверхэкспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, предлагаемой в настоящем изобретении, представлены выше. Под объем настоящего изобретения подпадают также методы сверхэкспрессии молекул нуклеиновых кислот, известные в данной области.

Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления изобретения экспрессию нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, изменяют в каждой клетке растения. Для этой цели можно применять, например, гомологичную рекомбинацию или инсерцию в хромосому. Для этой цели можно применять также, например, экспрессию смысловой или антисмысловой РНК, белка, содержащего домен "цинковых пальцев", или рибозима под контролем промотора, обладающего способностью экспрессировать смысловую или антисмысловую РНК, белок, содержащий домен "цинковых пальцев", или рибозим, в каждой клетке растения. Под объем настоящего изобретения подпадают также конститутивная экспрессия, индуцибельная, тканеспецифическая или регулируемая стадией развития экспрессия, и они приводят к конститутивному, индуцибельному, тканеспецифическому или регулируемому стадией развития изменению экспрессии нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, в растительной клетке. Создают конструкции, предназначенные для экспрессии смысловой или антисмысловой РНК, белка, содержащего домен "цинковых пальцев", или рибозима или для сверхэкспрессии нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, и трансформируют ими растительную клетку согласно способам, предлагаемым в настоящем изобретении, например, описанным выше.

Таким образом, изобретение относится также к смысловым и антисмысловым молекулам нуклеиновых кислот, соответствующих открытым рамкам считывания, которые представлены в SEQ ID NO: 1 в перечне последовательностей, а также их ортологам.

Гены и открытые рамки считывания, предлагаемые в настоящем изобретении, которые практически подобны нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, представленный в SEQ ID NO: 6, включая любые соответствующие антисмысловые конструкции, можно функционально связывать с любым промотором, который обладает функциональной активностью в растении-хозяине, включая промоторные последовательности, предлагаемые в изобретении, или их мутанты.

После создания полинуклеотидную конструкцию, предлагаемую в изобретении, которая содержит экспрессионную кассету или кассету для РНКi, можно мобилизовать в приемлемый вектор для трансформации растений, такой, например, как бинарный вектор, который затем можно мобилизовать в растение сахарной свеклы с помощью одного из широко известных методов трансформации, такого, например, как опосредуемая *Agrobacterium* трансформация.

Трансгенные растения (или клетки растений или эксплантаты растений или ткани растений), которые несут и экспрессируют полинуклеотид или dsРНК, предлагаемые в изобретении, можно получать различными хорошо известными методами. После создания полинуклеотидной конструкции, предлагаемой в изобретении, которая содержит экспрессионную кассету или кассету для РНКi, включенную в полинуклеотидную последовательность, предлагаемую в изобретении и описанную выше, можно использовать стандартные методики для интродукции полинуклеотида в представляющие интерес растение, клетку растения, эксплантат растения или ткань растения. Необязательно клетку растения, эксплантат растения или ткань растения можно регенерировать с получением трансгенного растения. Растение может представлять собой любое высшее растение, включая голосемянные, однодольные и двудольные растения. Приемлемые протоколы известны для представителей сем. Leguminosae (люцерна, соя, клевер и т.д.), сем. Umbelliferae (морковь, сельдерей, пастернак), сем. Cruciferae (капуста, редис, рапс, брокколи и т.д.), сем. Curcubitaceae (дыни и огурцы), сем. Gramineae (пшеница, кукуруза, рис, ячмень, просо и т.д.), сем. Solanaceae (картофель, томаты, табак, перцы и т.д.) и различных других культур (см. протоколы, описанные в Handbook of Plant Cell Culture-Crop Specie под ред. Ammirato и др., изд-во Macmillan Publ. Co., New York, N.Y., 1984; Shimamoto и др., Nature 338, 1989, с. 274-276; Fromm и др., Bio/Technol. 8, 1990, с. 383-839; и Vasil и др., Bio/Technol. 8, 1990, с. 429-434). Трансформация и регенерация однодольных, и двудольных растений в настоящее время является общепринятой, и специалист в данной области может осуществлять выбор наиболее пригодного метода трансформации. Выбор метода трансформации должен варьироваться в зависимости от типа растения, подлежащего трансформации; специалисты в данной области могут определять пригодность конкретных методов для данных типов растений. Приемлемыми методами являются, но не ограничиваясь только ими: электропорация протопластов растений; опосредуемая липосомами трансформация; опосредуемая полиэтиленгликолем (ПЭГ) трансформация; трансформация с помощью вирусов; микроинъекция растительных клеток; бомбардировка микроснарядами растительных клеток; вакуумная инфльтрация; и опосредуемая *Agrobacterium tumefaciens* трансформация.

Трансформацию растений можно осуществлять индивидуальной молекулой ДНК или несколькими молекулами ДНК (т.е. котрансформация), и оба эти метода пригодны для применения в сочетании с полинуклеотидными конструкциями, предлагаемыми в настоящем изобретении. Многочисленные трансформационные векторы пригодны для трансформации растений и экспрессионные кассеты, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять в сочетании с любым из таких векторов. Выбор вектора должен зависеть от предпочтительного метода трансформации и видов-мишеней для трансформации.

Специалистам в данной области доступны и известны различные методы интродукции конструкций в растительную клетку-хозяина. Эти методы, как правило, включают трансформацию с помощью ДНК с использованием *A. tumefaciens* или *A. rhizogenes* в качестве трансформирующих агентов, липосом, осаждения с помощью ПЭГ, электропорации, инъекции ДНК, непосредственного поглощения ДНК, бомбардировки микроснарядами, ускорения частиц и т.п. (см., например, EP 295959 и EP 138341) (см. ниже). Однако полинуклеотидной конструкцией, предлагаемой в изобретении, можно трансформировать не только растительные клетки. Общие сведения о растительных экспрессионных векторах и репортерных генах, и *Agrobacterium* и опосредуемом *Agrobacterium* переносе генов можно почерпнуть у Gruber и др., 1993.

Экспрессионные векторы, содержащие полинуклеотидную последовательность, предлагаемую в изобретении, можно интродуцировать в протопласты или в интактные ткани или выделенные клетки. Предпочтительно экспрессионные векторы интродуцируют в интактные ткани. Общие методы культивирования растительных тканей описаны (см., например, у Maki и др., 1993; и Phillips и др., 1988). Предпочтительно экспрессионные векторы интродуцируют в ткани кукурузы или других растений с помощью метода прямого переноса гена, такого как опосредуемый микроснарядами перенос, инъекция ДНК, электропорация и т.п. Более предпочтительно экспрессионные векторы интродуцируют в растительные ткани, используя введение содержащих микроснаряды сред с помощью биобаллистической пушки (см., например, Tomes и др., 1995). Векторы, предлагаемые в изобретении, можно не только применять для экспрессии структурных генов, но их можно использовать также при клонировании с использованием "экзона-ловушки" или "промотора-ловушки" для выявления экспрессии различных генов в различных тканях (Lindsey и др., 1993; Auch и Reth и др.).

Наиболее предпочтительным является применение векторов бинарного типа на основе Ti- и Ri-плазмид *Agrobacterium* spp. Выведенными из Ti-плазмид векторами трансформируют широкое разнообразие высших растений, включая однодольные и двудольные растения, такие как соя, хлопчатник, рапс, табак и рис (Pacciotti и др., 1985; Вугне и др., 1987; Sukhapinda и др., 1987; Lorz и др., 1985; Potrykus, 1985; Park и др., 1985; Hiei и др., 1994). Применение T-ДНК для трансформации растительных клеток

широко изучено и подробно описано (EP 120516; Hoekema, 1985; Knauf и др., 1983; и An и др., 1985). Для интродукции в растения химерные гены, предлагаемые в изобретении, можно встраивать в бинарные векторы, как описано в примерах.

Специалистам в данной области должно быть очевидно, что выбор метода может зависеть от типа растения, например, является ли оно однодольным или двудольным, предназначенного для трансформации. Приемлемыми методами трансформации растительных клеток являются, но не ограничиваясь только ими, микроинъекция (Crossway и др., 1986), электропорация (Riggs и др., 1986), опосредуемая *Agrobacterium* трансформация (Hinchee и др., 1988), прямой перенос генов (Paszowski и др., 1984) и баллистическое ускорение частиц с помощью устройств, поставляемых фирмой Agracetus, Inc., Мэдисон, шт. Висконсин, и фирмой BioRad, Геркулес, шт. Калифорния (см., например, Sanford и др., US 4945050; и McCabe и др., 1988) (см. также Weissinger и др., 1988; Sanford и др., 1987 (лук); Christou и др., 1988 (соя); McCabe и др., 1988 (соя); Datta и др., 1990 (рис); Klein и др., 1988 (кукуруза); Klein и др., 1988 (кукуруза); Klein и др., 1988 (кукуруза); Fromm и др., 1990 (кукуруза); и Gordon-Kamm и др., 1990 (кукуруза); Svab и др., 1990 (хлоропласты табака); Koziel и др., 1993 (кукуруза); Shimamoto и др., 1989 (рис); Christou и др., 1991 (рис); EP 0332581 (ежа сборная и другие представители сем. Pooideae); Vasil и др., 1993 (пшеница); Weeks и др., 1993 (пшеница)). В одном из вариантов осуществления изобретения применяют метод трансформации протопласта кукурузы (EP 0292435, US 5350689).

Основной целью настоящего изобретения является трансформация сахарной свеклы. Экспериментальные процедуры для трансформации сахарной свеклы хорошо известны специалистам в данной области и описаны, например, у Chang и др., 2002, в этом исследовании применяли меристему сахарной свеклы в качестве материала эксплантата.

После того как трансформированные растения отобраны и выращены до созревания, идентифицируют растения, имеющие представляющий интерес признак. Признак может представлять собой любой признак, описанный выше. Кроме того, для подтверждения того, что представляющий интерес признак является результатом экспрессии интродуцированного представляющего интерес полинуклеотида под контролем регуляторного нуклеотида, предлагаемого в изобретении, уровни экспрессии или активности представляющего интерес полипептида или полинуклеотида можно определять с помощью анализа экспрессии мРНК с использованием Нозерн-блоттинга, ОТ-ПЦР или микромассивов, или экспрессии белка с использованием иммуноблоттинга или Вестерн-блоттинга или анализов сдвига в гелях.

Таким образом, изобретение относится к растительным клеткам и тканям, к растениям, полученным из таких клеток и тканей соответственно, к растительному материалу, к потомству и семенам таких растений и к сельскохозяйственным продуктам, включая продукты переработки растений с улучшенными свойствами, которые можно получать, например, с помощью одного из методов трансформации, описанных ниже.

После того как экспрессионной кассетой, предлагаемой в настоящем изобретении и описанной выше, которая содержит полинуклеотидную последовательность, предлагаемую в изобретении, в сочетании с представляющим интерес полинуклеотидом, трансформированы виды растений, ее можно размножать в этих видах или переносить в другие сорта этих же видов, прежде всего включая предназначенные для продажи сорта, с помощью традиционных методов селекции. Предпочтительными растениями согласно изобретению являются голосемянные, однодольные и двудольные растения, прежде всего агрономически важные культурные растения, такие как рис, пшеница, ячмень, рожь, рапс, кукуруза, картофель, морковь, сладкий картофель, сахарная свекла, фасоль, горох, цикорий, латук-салат, капуста, цветная капуста, брокколи, турнепс, редис, шпинат, спаржа, лук, чеснок, баклажан, перец, сельдерей, тыква крупноплодная, тыква обыкновенная, цуккини, огурец, яблоня, груша, айва, дыня, слива, вишня, персик, нектарин, абрикос, земляника, виноград, малина, ежевика, ананас, авокадо, папайя, манго, банан, соя, табак, томаты, сорго и сахарный тростник.

Описанные выше генетические свойства, сконструированные в трансгенных растениях, передаются при половом размножении или вегетативном росте и в результате их можно поддерживать и размножать в потомстве растений. Как правило, для поддержания и размножения используют известные сельскохозяйственные методы, разработанные для высокоспецифических целей, такие как обработка почвы, посев или сбор урожая. Можно применять также специализированные процессы, такие как гидропоника или технология возделывания в теплицах. Дающие преимущество генетические свойства трансгенных растений, предлагаемых в изобретении, можно применять также при селекции растений с целью создания растений с улучшенными характеристиками, такими как устойчивость к вредителям, гербицидам или стрессу, повышенная питательная ценность, повышенная урожайность или улучшенная структура, обуславливающая защиту от полегания или осыпания. Для осуществления различных стадий селекции требуется хорошо известное вмешательство человека, включая, например, отбор линий, подлежащих скрещиванию, прямое опыление родительских линий или отбор соответствующих потомков растений. В зависимости от требуемых характеристик выбирают различные пути селекции. Соответствующие методы хорошо известны в данной области и включают, но не ограничиваясь только ими, гибридизацию, инбридинг, обратное скрещивание, многолинейное скрещивание, смешение различных линий, неспецифическую гибридизацию, анеопладию. Методы гибридизации включают также стерилизацию растений с по-

лучением растений с мужской или женской стерильностью с помощью механических, химических или биохимических средств. Перекрестное опыление растения с мужской стерильностью пылью другой линии гарантирует, что геном обладающего мужской стерильностью, но женской фертильностью растения, будет в равной степени включать свойства обеих родительских линий. Таким образом, трансгенные растения, предлагаемые в изобретении, можно применять для отбора улучшенных линий растений, что позволяет, например, повышать эффективность общепринятых методов, таких как обработка гербицидами или пестицидами, или обходиться без указанных методов в результате модифицированных генетических особенностей растений. В другом варианте можно получать новые культуры с повышенной устойчивостью к стрессу, благодаря их оптимизированному генетическому «аппарату», что позволяет получать продукт более высокого качества, чем продукты, которые не обладают способностью противостоять аналогичным вредным условиям, воздействующим их развитие.

Одним из вариантов осуществления изобретения является полинуклеотидная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52, которая кодирует белок, функционально эквивалентный гену B.

Примеры

В приведенных ниже примерах проиллюстрированы варианты осуществления изобретения. В свете представленного описания и известного уровня техники специалистам в данной области должно быть очевидно, что приведенные ниже примеры даны только с целью иллюстрации и что многочисленные изменения, модификации и вариации можно применять без отклонения от сущности и объема изобретения, представленного в формуле изобретения.

Пример 1. Характеризация гена PRR7 сахарной свеклы

Пример 1.1. Характеризация предполагаемого гомолога PRR7 из сахарной свеклы

На основе подхода, включающего применение генов-кандидатов, для идентификации и характеристики предполагаемых генов, контролирующих стрелкование у сахарной свеклы, была идентифицирована EST-последовательность, имеющая регистрационный номер CV301305, в качестве предполагаемого гомолога гена PRR7 свеклы с помощью оценки гомологии BLAST-методом. В SEQ ID NO: 1 представлена нуклеотидная последовательность EST CV301305. Частью соответствующей аминокислотной последовательности является мотив домена-приемника регулятора псевдоответа (PRR, pfam00072) или домена-приемника сигнала (REC, cd00156) (фиг. 1), отличительного признака семейства генов PRR, который, вероятно, имеет решающее значение при некоторых связанных с циркадными ритмами событиях (Nakamichi и др., 2005). На фиг. 2 представлен сравнительный анализ аминокислотной последовательности CV301305 и PRR7, ее ближайшего гомолога из *Arabidopsis*, который описан как компонент чувствительной к температуре циркадной системы (внутренних часов организма) (Nakamichi и др., 2007; Salome и McClung, 2005). Известно, что внутренние часы организма контролируют ряд связанных с развитием процессов у растений, включая контроль времени цветения (т.е. стрелкование) (Imaizumi и Kay, 2006; Zhou и др., 2007).

На основе вышеуказанных данных была выведена предполагаемая генная структура части PRR7-фрагмента с помощью сравнительного анализа геномной последовательности и мРНК гена *Arabidopsis* PRR7 (AT5G02810 и NM120359 соответственно) и EST (CV301305) BvPRR7 сахарной свеклы, который подтвердил присутствие нескольких предполагаемых интронных областей (фиг. 3). Праймеры PRR7-F и -R (SEQ ID NO: 2 и 3), фланкирующие предполагаемую 3-ю интронную область, обеспечивали получение продукта амплификации размером примерно 0,5 т.п.н. при применении геномной ДНК свеклы в качестве матрицы. Для амплификации с помощью ПЦП применяли следующие условия: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем 35 циклов амплификации по 30 с при 95°C, 30 с при 60°C и 30 с при 72°C и затем 5 мин при 72°C. ПЦП-эксперименты осуществляли в устройстве GeneAmp PCR System 9600 фирмы Applied Biosystems Inc., используя меченную платиной ДНК-полимеразу Taq и соответствующую реакционную смесь фирмы Invitrogen Corporation, согласно рекомендациям поставщика. Анализ последовательности ПЦП-продукта позволил реконструировать геномную последовательность вокруг интрона 3 гена BvPRR7 и подтвердил присутствие фрагмента длиной 296 пар оснований (SEQ ID NO: 4).

Пример 1.2. Картирование гена BvPRR7

С помощью описанных выше праймеров PRR7-F и PRR7-R геномный фрагмент гена BvPRR7 амплифицировали и секвенировали с использованием панели родительских линий сахарной свеклы, включающей 15 двулетних и 1 однолетнюю линию. Все двулетние линии оказались мономорфными по BvPRR7, поскольку обнаружено только два различных гаплотипа: один аллель, ассоциированный с двулетним типом развития, и один аллель, ассоциированный с однолетним типом развития (табл. 1). Для картирования BvPRR7 в популяции, расщепленной по признаку однолетности, создавали анализ, обеспечивающий выявление SNP в положении № 160 (SEQ ID NO: 4), используя технологию EndPoint TaqMan®. В табл. 2 представлены нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, созданных для анализа PRR7(T1) с использованием TaqMan®, направленного на выявление SNP в положении № 160; в реакции использовали также универсальную мастер-смесь для ПЦП (TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG) (2×) фирмы Applied Biosystems Inc. согласно рекомендациям производителя. ПЦП-

амплификацию осуществляли с использованием следующих условий: 95°C в течение 10 мин, затем 40 циклов при 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 1 мин, используя детекторное устройство для секвенирования последовательности типа ABI PRISM 7700. Оценку с использованием технологии EndPoint осуществляли с помощью программы Sequence Detection System 2.0.

С помощью описанного выше анализа PRR7(T1) ген BvPPR7 был картирован в F2-популяции, включающей 198 растений, которые получали скрещиванием однолетней линии и двулетней линии, полиморфной по SNP в положении № 160. BvPPR7 картирован на хромосоме II на расстоянии примерно 1 сМ по ходу транскрипции относительно маркера GJ131 (фиг. 4), в области, которая, как известно, содержит ген B, обуславливающий независимое от яровизации цветение (Möhring и др., 2004; Gaafar и др., 2005). Результаты PRR7(T1)-анализа продемонстрировали точное соответствие между предсказанным генотипом гена B и генотипом гена BvPPR7. Генотип гена B был предсказан на основе фенотипической оценки F3-популяций, полученных из F2-растений, характеризующихся независимым от яровизации цветением. В табл. 3 дано графическое представление точной карты области гена B для 9 индивидуальных растений-потомков, включающих случаи ближайшей рекомбинации. Сочетание его положения на карте и биологической функции, связанной с чувствительным к температуре циркадным ритмом (Salomé и McClung, 2005), с большой долей вероятности делает BvPPR7 наиболее перспективным кандидатом на роль B-гена.

Пример 1.3. Выявление полноразмерной геномной последовательности BvPPR7

Используя праймеры PRR7-F и PRR7-K, подвергали скринингу ВАС-библиотеку сахарной свеклы с помощью ПЦР. Библиотеку создавали на основе двулетнего коммерческого культивара H20 с тем расчетом, чтобы включала 6 геномных эквивалентов со средним размером вставки 120 т.п.н. (McGrath и др., 2004). Пулы ДНК для этой библиотеки получали от фирмы Amplicon Express, Пулман, шт. Вашингтон. Для скрининга пулов ДНК применяли следующие условия ПЦР: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем 35 циклов амплификации по 30 с при 95°C, 30 с при 60°C и 30 с при 72°C и затем в течение 5 мин при 72°C. ПЦР-эксперименты осуществляли в устройстве GeneAMP PCR System 9600 фирмы Applied Biosystems Inc., используя меченную платиной ДНК-полимеразу Taq и соответствующую реакционную смесь фирмы Invitrogen Corporation согласно рекомендациям поставщика. Последующий скрининг пулов ДНК в отношении присутствия BvPPR7-фрагмента, проведенный согласно инструкциям поставщика, позволил осуществить положительную идентификацию клона ВАС SBA079-L24.

Для получения полноразмерной последовательности гена клон ВАС SBA079-L24 передавали на фирму MWG Biotech AG, Германия, для анализа последовательности с помощью технологии секвенирования, разработанной фирмой "454 Life Sciences". При необходимости бреши между полученными наборами последовательных фрагментов заполняли путем общепринятого секвенирования по Сангеру с получением моногенной последовательности гена BvPPR7 (SEQ ID NO: 5). На основе сравнительного анализа геномной последовательности с EST CV301305 на основе гомологии последовательностей с геном PRR7 из *Arabidopsis* была предсказана предполагаемая структура гена BvPPR7 свеклы, включающая интроны и экзоны, которая представлена на фиг. 5. Согласно предсказанной структуре геномная последовательность включает полный ген BvPPR7, при этом последовательность размером 3,6 т.п.н. простирается против хода транскрипции от стартового кодона ATG, и последовательность размером 2,2 т.п.н. по ходу транскрипции относительно кодирующей области. Соответствующая аминокислотная последовательность BvPPR7 представлена в SEQ ID NO: 6. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности BvPPR7 и всех представителей семейства PRR-гена из *Arabidopsis*, включая TOC1 (PRR1), PRR3, PRR5, PRR7 и PRR9, позволил проиллюстрировать выраженную консервативность мотива домена-приемника регулятора псевдоответа (PRR) (pfam00072) вблизи NH₂-конца и CCT-мотива (pfam06203) на COOH-конце (фиг. 6). Помимо семейства PRR-гена из *Arabidopsis* BvPPR7 характеризуется также выраженной гомологией с PRR7 зерновых культур, что проиллюстрировано с помощью филогенетического дерева, представленного на фиг. 7. Неожданным является то, что гомолог PRR7 в зерновых культурах, более известный как Ppd, рассматривается в качестве основного определяющего фактора фотопериодической реакции (Turner и др., 2005; Beales и др., 2007), а не определяющего яровизационный ответ фактора, как это предполагается в настоящем описании для сахарной свеклы.

Пример 1.4. Анализ генной экспрессии BvPPR7

Для анализа генной экспрессии проростки двулетних яровизированных растений выращивали в камерах с контролируемыми условиями окружающей среды при постоянной температуре 18°C и фотопериоде день/ночь 16/8 ч. Каждые 2 ч в течение 24 ч отбирали образцы листьев и выделяли общую РНК с помощью набора RNAqueous®-4PCR, поступающего в продажу от фирмы Ambion, следуя в целом инструкциям поставщика. При осуществлении стадий выделения РНК добавляли вспомогательное средство для выделения растительной РНК (Plant RNA Isolation Aid) (фирма Ambion) с целью удаления загрязнителей, таких как полисахариды и полифенолы, и образцы РНК обрабатывали ДКАзой I (фирма Ambion) для удаления остатков ДНК. Образцы РНК превращали в кДНК с помощью набора RETROscript® (фирма Ambion), начиная процесс с 1 мкг общей РНК в качестве матрицы. Уровень экспрессии гена BvPPR7 оценивали с использованием количественной ПЦР (кПЦР) с помощью мастер-смеси для ПЦР Power

SYBR® Green PCR Master Mix (фирма Applied Biosystems Inc.) на устройстве для секвенирования последовательностей типа ABI PRISM 7700. При осуществлении ПЦР использовали следующие параметры: начальная денатурация при 95°C в течение 10 мин, затем 40 циклов амплификации по 15 с при 95°C и 1 мин при 60°C. Применяли "прямой" и "обратный" праймеры для BvPRR7, имеющие следующие нуклеотидные последовательности: 5'-TTGGAGGAGGTGTCACAGTTCTAG-3' (SEQ ID NO: 49) и 5'-TGTCATTGTCCGACTCTTCAGC-3' (SEQ ID NO: 50) соответственно. Гены бета-тубулина (BvBTU) и изоцитратдегидрогеназы (BvICDH) использовали в качестве генов, с которыми проводят сравнение (референс-генов) для стандартизации экспрессии BvPRR7. Праймерные последовательности, созданные для этих двух референс-генов, представляли собой 5'-TTGTTGAAAATGCAGACGAGTGT-3' (SEQ ID NO: 13) и 5'-AAGATCGCCAAAGCTTGGTG-3' для BvBTU (AW063029) (SEQ ID NO: 14) и 5'-CACACCAGATGAAGGCCGT-3' (SEQ ID NO: 15) и 5'-CCCTGAAGACCGTGCCAT-3' (SEQ ID NO: 16) для BvICDH (AF173666). В каждый момент времени для оценки использовали по три биологических образца и каждый кПЦР-эксперимент проводили с дублированием. Данные анализировали с помощью пакета программ Sequence Detection System 2.0 (фирма Applied Biosystems Inc.) и пакета программ GenEx (программы для многомерных анализов (MultiD Analyses)).

Как проиллюстрировано на фиг. 8, профиль экспрессии гена BvPRR7 характеризуется циркадным колебанием с пиком экспрессии через 7 ч после рассвета. Этот эксперимент подтвердил ритмичную и циркадную экспрессию BvPRR7, что описано для большинства ассоциированных с внутренними часами генами, идентифицированными к настоящему времени (McClung, 2006).

Пример 1.5. Аллельная вариабельность и связь с требованием к яровизации

С помощью нескольких пар праймеров (табл. 4) амплифицировали полную кодирующую область гена BvPRR7 и секвенировали с использованием панели, включающей 16 двулетних и 14 однолетних растений. Для ПЦР-амплификации использовали следующие условия: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем 35 циклов амплификации по 30 с при 95°C, 30 с при 60°C и 30 с при 72°C и затем 5 мин при 72°C. ПЦР-эксперименты осуществляли с помощью устройства GeneAMP PCR System 9600 фирмы Applied Biosystems Inc., используя меченную платиной ДНК-полимеразу Taq и соответствующую реакционную смесь фирмы Invitrogen Corporation согласно рекомендациям поставщика. Графическое представление обнаруженных генотипов включало 7 различных аллелей; 6 аллелей, ассоциированных с однолетним типом развития, и 1 - с двулетним типом развития (табл. 5). Ассоциированный с двулетним типом развития аллель оказался уникальным для двулетних линий и никогда не встречался в однолетних линиях, что позволило сделать предположение о наличии выраженной корреляции между аллельными вариациями, обнаруженными для BvPRR7, и однолетним или двулетним фенотипом растения. Эти данные подтверждают причинную взаимосвязь между BvPRR7 и В-локусом для независимого от яровизации цветения у сахарной свеклы. Из 19 SNP, характерных для кодирующей области, 7 приводили к аминокислотным заменам в предсказанной белковой последовательности, позволяющим различать ассоциированные с однолетним и ассоциированные с двулетним типом развития аллели. Согласно гаплотипам, проиллюстрированным в табл. 5, любой из SNP в положениях № 3827, 3954, 5284, 5714, 10954, 11220, 11391, 12053, 12127 и 12837 можно применять для того, что различать все ассоциированные с однолетним типом развития аллели от ассоциированных с двулетним типом развития аллелей, с помощью молекулярных маркеров, мишенью которых является один или несколько из указанных SNP.

Помимо кодирующей области гена PRR7, в промоторной области также имеет место полиморфизм между однолетними и двулетними линиями. С использованием праймеров F3808 (SEQ ID NO: 29) и R3809 (SEQ ID NO: 30) получали продукт амплификации размером 0,6 т.п.н. при применении геномной ДНК из двулетних линий в качестве матрицы, но при этом не происходила амплификация однолетних линий. Для ПЦР-амплификации использовали следующие условия: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем 35 циклов амплификации по 30 с при 95°C, 30 с при 60°C и 30 с при 72°C и затем 5 мин при 72°C. ПЦР-эксперименты осуществляли с помощью устройства GeneAMP PCR System 9600 фирмы Applied Biosystems Inc., используя меченную платиной ДНК-полимеразу Taq и соответствующую реакционную смесь фирмы Invitrogen Corporation согласно рекомендациям поставщика. Таким образом, указанная пара праймеров обеспечивает специфическую амплификацию ассоциированных с двулетним типом развития аллелей, но не ассоциированных с однолетним типом развития аллелей. Аналогичные результаты получали при использовании пары F3855 (SEQ ID NO: 35) и R3809 (SEQ ID NO: 30) или F3855 (SEQ ID NO: 35) и R3856 (SEQ ID NO: 36) (табл. 4), при применении которой получали продукты амплификации размером 1,0 и 0,8 т.п.н. при использовании двулетних линий, но при этом не происходила амплификация однолетних линий. Специалисту в данной области должно быть известно, что выбор обеспечивающих дискриминацию полиморфизмов не ограничен перечисленными выше полиморфизмами, но их можно идентифицировать также в других частях некодирующих или фланкирующих областей, таких как терминатор и интроны.

Таблица 1. Полиморфизмы, обнаруженные среди 1 однолетней и 15 двулетних линий сахарной свеклы во фрагменте гена BvPRR7, охватывающем интрон 3
Положение в SEQ ID NO: 4

ID NO: 4.	87	160	406	
гаплотип № 1	T	T	G	однолетный
гаплотип № 2			A	двулетный

В верхнем ряду показано положение нуклеотидов в геномной последовательности фрагмента гена BvPRR7 (SEQ ID NO: 5). В остальных рядах представлены 2 гаплотипа, обнаруженные в панели, включающей 16 линий.

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, соответствующие анализу TaqMan PRR7(T1) для генотипирования SNP № 160

Обозначения предшественников	Последовательность (5' → 3')
PRR7(T1)-F	GAGGTGTCACAGTGTAAGTGTCT
PRR7(T1)-R	AAAGACTGCTACACGAACCACTAAG
PRR7(T1)-FAM	FAM-CTGATGAAAAGCTG-MGB-NFQ
PRR7(T1)-VIC	VIC-CTGATGAAAAGCTG-MGB-NFQ

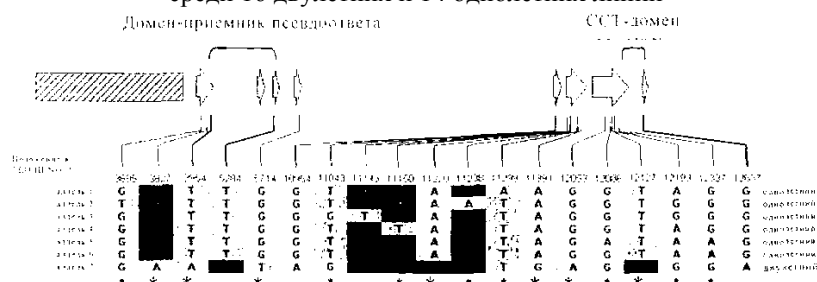
Таблица 3. Генотипы для некоторых маркеров, включающие PRR7(T1)-картирование вокруг гена B в 9 F2-растениях, характерные для случаев рекомбинации на любой стороне гена B. PRR7(T1), а также маркер 9_27(T2) характеризуются точным соответствием с предсказанным генотипом гена B. Генотип гена B оценивают по фенотипу F3-популяции, полученной из индивидуальных F2-растений.

		Количество рекомбинации	98775103	98775161	98775167	98775176	98775206	98775214	98775153	98775237	98775245
E8M4:193	-5	B	A	H	H	A	H	H	A	H	
E05M16:24	-3	B	A	H	H	A	B	A	A	H	
E15M4:162	-2	B	A	H	H	A	B	A	H	H	
E15M4:159	-2	B	A	H	H	A	B	A	H	H	
GJ131	-2	B	A	H	H	A	B	A	H	H	
9_27	0	B	H	B	H	A	B	A	H	H	
PRR7	0	B	H	B	H	A	B	A	H	H	
ген B	0	B	H	B	H	A	B	A	H	H	
GJ01	3	H	H	B	A	H	B	A	H	H	
MP0176	3	H	H	B	A	H	B	A	H	H	
E13M4-196	3	H	H	B	A	H	B	A	H	H	
E09M08-113	3	H	H	B	A	H	B	A	H	H	
E09M08-124	3	H	H	B	A	H	B	A	H	H	
E09M08:03	3	H	H	B	A	H	B	A	H	H	
E13M04:36	3	H	H	B	A	H	B	A	H	H	
MS0278	3	H	H	B	A	H	B	A	H	H	
E09M08-588	3	H	H	B	A	H	B	A	H	H	
E8M4:174	3	H	H	B	A	H	B	A	H	H	
E13M04:50	3	H	H	B	A	H	B	A	H	H	
E16M16:19	4	H	H	B	A	H	B	A	H	B	
E16M16:17	4	H	H	B	A	H	B	A	H	B	
E16M16:20	4	H	H	B	A	H	B	A	H	B	

Таблица 4. Нуклеотидные последовательности ПЦР-праймеров, применяемых для амплификации, и последовательность всех экзонов BvPRR7 и части интронных и промоторных или терминирующих областей

Наименование предшественника	Последовательность (5' → 3')	Локализация	SEQ ID NO
F3766	TTTGATGCTTTTTCAGGCCA	интрон 1	SEQ ID NO:17
R3767	TTTCTTATAGGCTTCACCAGAAAGTC	экзон 3	SEQ ID NO:18
F3354	ATGTCATCTCATGATTGATGGG	экзон 3	SEQ ID NO:19
R3355	TCAGCCCTCTTGCTTCCTATG	экзон 4	SEQ ID NO:20
F3768	TTTCCTCATTCTTTTGTAGTCTAGTGGT	интрон 3/экзон 4	SEQ ID NO:21
R3769	AATATGTGTGAGAAAATGGTGGCA	интрон 4	SEQ ID NO:22
F3782	TCYCAATGGGAAAGGATTG	экзон 6	SEQ ID NO:23
R3783	AATTCGGGGTGGTGCATCAG	экзон 6	SEQ ID NO:24
F3784	GCCCCCAACCACAGTCTACA	экзон 5	SEQ ID NO:25
R3785	GOTCCATTAGCCGTGAATCTG	экзон 6	SEQ ID NO:26
F3806	TTTTTGCATACCGAAGGCGT	промотор	SEQ ID NO:27
R3807	CATTTGTGAAGTAGGTGATAAGGACAA	интрон 1	SEQ ID NO:28
F3808	TTAGATCCTCTCCCTTAGACTCTTCTGT	промотор	SEQ ID NO:29
R3809	TCACCAATTCTTTATCATATCATGACA	промотор	SEQ ID NO:30
F3810	GAGAAAAGGGTTTATAGTGTAAAGTTT	промотор	SEQ ID NO:31
R3811	AACTTAAACCCATCATGTCTTTCAAC	промотор	SEQ ID NO:32
F3853	AACGGACACTGGATTCAAGTCA	промотор	SEQ ID NO:33
R3854	TTATGGGAAAAAATCTCGGTATCT	промотор	SEQ ID NO:34
F3855	GAACCCCATTTTATGATTGACATTTCT	промотор	SEQ ID NO:35
R3856	AATTAGATGAATAAAAGACAAATGAGGAA	промотор	SEQ ID NO:36
F3857	TCCATTGAGGAGTAGGTATGATGAG	интрон 4	SEQ ID NO:37
R3858	CTTCGACCATCATTTTCTGGT	экзон 6	SEQ ID NO:38
F3859	GGAAACCAATATTCACAGTTAGACCT	экзон 6	SEQ ID NO:39
R3860	TCCTGAGCTGCTGATCCACGT	экзон 7	SEQ ID NO:40
F3861	CTGCATCTGGTAAGCCTGGTG	экзон 7	SEQ ID NO:41
R3862	CGTACCTGGCGCACGAAT	экзон 8	SEQ ID NO:42
R3863	AATTGGCCATTTCTTGCTGTAT	интрон 7	SEQ ID NO:43
R3864	AATGTGACCCGTAAACGCCT	терминатор	SEQ ID NO:44
F3865	GGTGTGATGCATATAATCTTGTGG	терминатор	SEQ ID NO:45
R3866	AGCAAGCCTGCGCTGG	терминатор	SEQ ID NO:46

Таблица 5. Гаплотипы и полиморфизмы, обнаруженные в кодирующей области BvPRR7 среди 16 двулетних и 14 однолетних линий



В табл. 5 представлены 19 полиморфизмов, идентифицированных в кодирующих областях при осуществлении сравнения ассоциированных с однолетним и двулетним типом развития аллелей. Полиморфизмы в домене-приемнике псевдоответа и ССТ-домене обозначены жирными линиями. Аминокислотные замещения обозначены маленькими звездочками. Аминокислотные замены, специфические для ассоциированного с двулетним типом развития аллеля, обозначены крупными звездочками. Положение SNP показаны в верхнем ряду и пронумерованы в соответствии с SEQ ID NO: 5.

Пример 2. Валидация трансгенов BvPRR7 с помощью изучения комплементарности

Однолетний фенотип растения, обусловленный геном В, проявляется в виде одиночного доминантного признака; таким образом, требование к яровизации у двулетних растений является рецессивным. Таким образом, можно предсказать, что трансформация ассоциированного с однолетним типом развития аллеля BvPRR7 в характерный для двулетнего типа развития генотип должна придавать характерный для однолетнего типа развития признак цветения характерному для двулетнего типа развития генотипу-акцептору. Для подтверждения этой гипотезы кодирующей последовательностью ассоциированного с однолетним типом развития аллеля BvPRR7 под контролем ассоциированного с однолетним типом развития промотора и фрагмента терминатора трансформируют характерный для двулетнего типа развития генотип G018. Экспериментальная процедура трансформации сахарной свеклы в целом соответствовала описанной у Chang и др., 2002, в которой использовали меристему сахарной свеклы в качестве эксплантата и ген фосфоманнозоизомеразы (PMI) в качестве селективируемого маркера. Плазмидная карта бинарного вектора, несущего генные кассеты как для гена селективируемого маркера PMI, так и для ассоциированного с однолетним типом развития аллеля BvPRR7, показана на фиг. 9. Трансгенные побеги отбирали по признаку наличия активности PMI (Joersbo и др., 1998), затем укореняли, высаживали в почву и переносили в теплицу. В качестве отрицательного контроля использовали нетрансгенные побеги, которые подвергали такой же процедуре регенерации in vitro, но без заражения Agrobacterium и селекции с использованием маннозы. Растения выращивали в вегетационных камерах при постоянной температуре 18°C и фотопериоде 17 ч света и 7 ч темноты. Предполагалось, что в этих условиях ни у одного из нетрансгенных контролей не должно проявляться каких-либо признаков стрелкования в течение периода наблюдения, в то время как однолетние контрольные растения в норме должны выбрасывать стрелку через 8 недель. В отличие от нетрансгенных двулетних контрольных растений у большинства трансгенов стрелкование должно начинаться через 4-10 недель, и они должны обладать основным признаком, харак-

терным для однолетних растений, несмотря на соответствующий двулетним растениям генетический фон. Трансгенные растения, у которых обнаружено стрелкование и цветение, подвергали перекрестному опылению двулетней поддерживающей линией с получением потомства. У растений-потомков оценивали активность PMI и затем их оценивали в отношении стрелкования и цветения без яровизации. Большая часть потомков должна характеризоваться коэффициентом сепарации 1:1 и прямой корреляцией между PMI-активностью и признаком однолетности. Эти данные должны недвусмысленно подтверждать причинную связь между VvPRR7 и независимым от яровизации цветением у сахарной свеклы.

Пример 3. Супрессия трансгенов VvPRR7 обуславливает устойчивость к стрелкованию

Поскольку VvPRR7 играет решающую роль в яровизационном ответе у сахарной свеклы, то VvPRR7 является очевидным кандидатом для создания устойчивости к стрелкованию путем подавления яровизационного ответа. Для этой цели кДНК-фрагмент VvPRR7 размером 0,6 т.п.н. (SEQ ID NO: 1) помещали в кассету для PHKi под контроль конститутивного промотора Ubi3 Arabidopsis (Norris и др., 1993). Инвертированный повтор VvPRR7-фрагмента отделяли вторым интроном от гена StLS1 картофеля (Eckes и др., 1986; Vancanneyt и др., 1990) для стабилизации PHKi-кассеты, но также для повышения эффективности процесса PHKi (Wang и Waterhouse, 2001; Smith и др., 2000). Плазмидная карта бинарного вектора, несущего генную кассету для PHKi, предназначенную для VvPRR7, и селектируемый маркерный ген PMI, представлена на фиг. 10. PHKi-кассетой трансформировали двулетний генотип G018 согласно методу, описанному в предыдущем примере. PMI-позитивные побеги и нетрансгенные контрольные побеги укореняли и переносили в теплицу для акклиматизации в течение минимум двух недель при 18°C до их обработки для яровизации. Согласно принятым методам трансгенные растения подвергали обработке для яровизации, которая предусматривает выдерживание в течение 14 дней при постоянной температуре 6°C и 12-часовой низкой искусственной освещенности. Перед воздействием индуцирующих стрелкование условий яровизированные растения медленно акклиматизировали в течение двух недель в климатических камерах путем ступенчатого повышения температуры с 10 до 18°C. Затем растения пересаживали в более крупные горшки (2 л) и осуществляли мониторинг стрелкования, выдерживая их при постоянной температуре 18°C и фотопериоде с длинным световым днем (17 ч света/7 ч темноты). У нетрансгенных контрольных растений, как правило, стрелкование начиналось в период между 4-6 неделями после яровизации. У трансгенных растений с подавленным геном VvPRR7 часто наблюдалось замедление стрелкования на период от всего лишь двух недель и вплоть до более чем 2 месяцев. В некоторых случаях стрелкование вообще не происходило в условиях, существующих в теплице. Помимо замедления стрелкования и цветения трансгенные растения развивались нормально и не имели фенотипических аномалий. В целом, для растений с замедленным стрелкованием характерно большее количество листьев в момент стрелкования в результате пролонгированной вегетативной стадии.

Ссылки

1. Abe J., Guan G.-P. и Shimamoto Y., A gene complex for annual habit in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Euphytica* 94, 1997, с. 129-135.
2. Barany F., Genetic Disease Detection and DNA Amplification Using Cloned Thermostable Ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, с. 189-193.
3. Batzer M.A., Carlton J.E. и Deininger P.L., Enhanced evolutionary PCR using oligonucleotides with inosine at the 3'-terminus. *Nucleic Acids Res.* 19, 1991, с. 5081.
4. Beales J., Turner A., Griffiths S., Snape J.W. и Laurie D.A., A Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 115, 2007, с. 721-733.
5. Botstein D., White R.L., Skolnick M. и Davis R.W., Construction of genetic linkage map in man using restriction length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32, 1980, с. 314-331.
6. Brunke K.J. и Wilson S.L., Brassica hsp80 promoter. EP 0559603, 1993.
7. Chang Y.-F., Zhou H., Dunder E.M., Rouse S.N., Gu W. and Bouteau E., Methods for stable transformation of plants. WO 02/14523, 2002.
8. Chiapparino E., Lee D. и Donini P., Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. *Genome* 47, 2004, с. 414-420.
9. Cooper D.N., Smith B.A., Cooke H.J. и др., An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome. *Hum. Genet.* 69, 1985, с. 201-205.
10. Eckes P., Rosahl S., Schell J. и Willmitzer L., Isolation and characterization of a light-inducible, organ-specific gene from potato and analysis of its expression after tagging and transfer into tobacco and potato shoots. *Mol Gen Genet* 205, 1986, с. 14-22.
11. English J.J., Mueller E. и Baulcombe D.C., Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* 8, 1996, с. 179-188.
12. Fan J.B., Oliphant A., Shen R., Kermani B.G., Garcia F., Gunderson K.L., Hansen M. и др., Highly parallel SNP genotyping. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 68, 2003, с. 69-78.
13. Felsenstein J., Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 1985, с. 783-791.
14. Gaafar R.M., Hohmann U. и Jung C., Bacterial artificial chromosome-derived molecular markers for

early bolting in sugar beet. *Theor. Appl. Genet.* 110, Number 6, 2005, c. 1027-1037.

15. Imaizumi T. и Kay S.A., Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends Plant Science* 11, 2006, c. 550-557.

16. Joersbo M., Donaldson I., Kreiberg K., Petersen S.G., Brunstedt J. и Okkels F.T., Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol Breeding* 4, 1998, c. 111-117.

17. Konieczny A. и Ausubel F.M., A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers, *Plant J.* 4, 1993, c. 403-410.

18. Kwok P.Y., Deng Q., Zakeri H., Taylor S.L. и Nickerson D.A., Increasing the information content of STS-based genome maps: Identifying polymorphisms in mapped STSs. *Genomics* 31, 1996, c. 123-126.

19. Landegren U., Kaiser R., Sanders J. и Hood L., A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241 4869, 1988, c. 1077-1080.

20. Litt M. и Luty J.A., Hypervariable microsatellite revealed by in-vitro amplification of a dinucleotide repeat in the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44, 1989, c. 397-401.

21. McClung C.R., Plant circadian rhythms. *Plant Cell* 18, 2006, c. 792-803.

22. McGrath J.M., Shaw R.S., de los Reyes B.G. и Weiland J.J., Construction of a Sugar Beet BAC Library from a Hybrid with diverse Traits. *Plant Mol Biol Rep* 22, 2004, c. 23-28.

23. Michaels S.D. и Amasino R.M., A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *The Plant Journal* 14(3), 1998, c. 381-385.

24. Möhring S., Salamini F. и Schneider K., Multiplexed, linkage group-specific SNP marker sets for rapid genetic mapping and fingerprinting of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Molecular Breeding*, т. 14, номер 4, 2005, c. 475-488.

25. Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S., Saiki R., Horn G. и Erlich H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51, 1986, c. 263-273.

26. Nakamichi N., Kita M., Ito S., Sato E., Yamashino T. и Mizuno T., PSEUDO-RESPONSE REGULATORS, PRR9, PRR7 and PRR5, together play essential roles close to the circadian clock of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 46, 2005, c. 686-698.

27. Neff M.M., Neff J.D., Chory J. и Pepper A.E., dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J* 14, 1998, c. 387-392.

28. Nickerson D.A., Kaiser R., Lappin S., Stewart J., Hood L. и Landegren U., Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide ligation assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 87(22), ноябрь 1990, c. 8923-8927.

29. Norris S.R., Meyer S.E. и Callis J., The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Mol Biol* 21, 1993, c. 895-906.

30. Ohtsuka E., Matsuki S., Ikehara M., Takahashi Y. и Matsubara K., An alternative approach to deoxyoligonucleotides as hybridization probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon positions, *J. Biol. Chem.* 260(5), 1985, c. 2605-2608.

31. Okamoto J.K. и Goldberg R.B., Regulation of Plant Gene Expression: General Principles. *Biochemistry of Plants*, т. 15, 1989, c. 1-82.

32. Orita M., Suzuki Y., Sekiya T. и Hayashi K., Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5, 1989, c. 874-879.

33. Pearson W.R., Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology* 183, 1990, c. 63-98.

34. Rossolini G.M., Cresti S., Inganni A., Cattani P., Riccio M.L. и Satta G., Use of deoxyinosine-containing primers vs degenerate primers for polymerase chain reaction based on ambiguous sequence information, *Mol. Cell Probes* 8, 1994, c. 91-98.

35. Ruiz M.T., Voinnet O. и Baulcombe D.C., Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10, 1998, c. 937-946.

36. Salome P.A. и McClung C.R., PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 17, 2005, c. 791-803.

37. Saitou N. и Nei M., The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 1987, c. 406-425.

38. Segev D., PCT Pub. No. WO 90/01069, 1990.

39. Smith N.A., Singh S.P., Wang M.B., Stoutjesdijk P.A. Green A.G. и Waterhouse P.M., Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407, 2000, c. 319-320.

40. Smith T.F. и Waterman M.S., *Advances in Applied Mathematics*. 2, 1981, c. 482-489.

41. Tamura K., Dudley J., Nei M. и Kumar S., MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 2007, c. 1596-1599.

42. Thiel T., Kota R., Grosse I., Stein N. и Graner A., SNP2CAPS: a SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development. *Nucleic Acids Res* 32(1), 2004, c. e5.

43. Tijssen P., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid*

Probes, часть I, глава 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", изд-во Elsevier, New York, 1993.

44. Turner A., Beales J., Faure S., Dunford R.P. и Laurie D.A., The Pseudo-Response Regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* 310, 2005, с. 1031-1034.

45. Vancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez A., Willmitzer L. и Rocha-Sosa M., Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* 220, 1990, с. 245-250.

46. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. и Speleman F., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, 2002, с. 1-11.

47. Vos P., Hogers R., Bleeker M. и др., AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21), 1995, с. 4407-4414.

48. Wang D.G., Fan J.B., Siao C.J. и др., Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 15, 1998, с. 1077-1082.

49. Wang M.B. и Waterhouse P.M., Application of gene silencing in plants. *Curr. Opin. Plant Biol* 5, 2001, с. 124-150.

50. Weber J.L. и May P.E., Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 1989, с. 388-396.

51. Welsh J. и McClelland M., Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18 (24), 1990, с. 7213-7218.

52. Wu D.Y. и Wallace R.B., *Genomics* 4, 1989, с. 560-569.

53. Ye S., Dhillon S., Ke X., Collins A.R. и Day L.N., An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.*, 29, 2001, с. E88-E88.

54. Zhou Y., Sun X.-D. и Ni M., Timing of photoperiodic flowering: light perception and circadian clock. *J. Integrative Plant Biol.* 49, 2007, с. 28-34.

55. Zuckerkandl E. и Pauling L., Evolutionary divergence and convergence in proteins, в "Evolving Genes and Proteins", под ред. V. Bryson и H.J. Vogel., изд-во Academic Press, New York, 1965, с. 97-166.

Перечень последовательностей

```
<110>  Экигента Партисипеймис АГ
<120>  Полинуклеотидные маркеры
<130>  N1453 PCT BS

<150>  07108777.9
<151>  2007-05-23

<160>  52

<170>  PatentIn версия 3.4

<210>  1
<211>  840
<212>  ДНК
<213>  Beta vulgaris

<400>  1
gctcctgtca ttatgatgtc atctcatgat tcatgggtt tagtcttaaa gtgcttatcc    60
aagggcgctg ttgactttct ggtgaagcct ataagaaaaa acgaacttaa aaacctttgg    120
cagcatgttt ggaggaggtg tcacagttct agtggtagtg gaagtgaagg ctgtgtaagg    180
aatggaaaat ccataggaag caagagggtc gaagagtcgg acaatgacac tgacatcaat    240
gaggaagatg ataacagaag cattggttta caagctcggg atggaagtga caatgggaagt    300
gggaccaga gttcatggac aaaaagggtc gcagaagttg agagcccca accacagtct    360
acatgggagc aagcaactga tcoactgat agcacttgct ctgaggtcat ttatccaatg    420
tctgaggcat ttgcccagag ctggatgctt ggtccatgc aggaacttga tggacaggat    480
catcaatatg acaatgtccc aatgggaagg gatttgaga ttggagtacc tagaatttca    540
gattcacggc taaatggacc aaacaaaacg gtttaagttg caactactgc tgaggaaaac    600
caatattcac agtttagact caaccaggaa aatgatggtc gaagttttga tgaagagaac    660
ctggagatga ataatgataa acctaaaagt gattggatta aacaggctat gaactcacca    720
ggaaaagttg aagaacatcg tagaggaaat aaagtatctg atgcaccacc cgaattttca    780
aaataaagga caaaggcatg caacatgtcg aggatatgcc ttctcttctg ctcatctctg    840

<210>  2
<211>  493
<212>  ДНК
```

<213> Beta vulgaris

<400> 2

atgtcatctc atgattcgat gggtttagtc ttaaagtgc tccaaggc cgctgttgac 60
 tttctggtga agcctataag aaaaaaygaa cttaaaaacc ttggcagca tgtttggagg 120
 aggtgtcaca gtgtaagtgt ctttacattt tccagcttty catcagctta gtggttcgtg 180
 tagcagtctt tcarattttc gaactttcta gcacatatga caaattaaac ctgcatgcta 240
 attcccgatt agataatgga ataagctctt tcagctggtc tttacttct ttctcttctc 300
 ctcttatgaa aaactgggat gccactatgc atctgttcc aggtgtttgt ttagtgtttc 360
 ttctctttat tegtgttttt gtttttattt ttaattttaa tttartttt tctcattct 420
 ttttttagtc tagtggtagt ggaagtgaag gctgtgtaag gaatggaaaa tccataggaa 480
 gcaagagggc tga 493

<210> 3

<211> 493

<212> ДНК

<213> Beta vulgaris

<400> 3

atgtcatctc atgattcgat gggtttagtc ttaaagtgc tccaaggc cgctgttgac 60
 tttctggtga agcctataag aaaaaatgaa cttaaaaacc ttggcagca tgtttggagg 120
 aggtgtcaca gtgtaagtgt ctttacattt tccagctttt catcagctta gtggttcgtg 180
 tagcagtctt tcaattttc gaactttcta gcacatatga caaattaaac ctgcatgcta 240
 attcccgatt agataatgga ataagctctt tcagctggtc tttacttct ttctcttctc 300
 ctcttatgaa aaactgggat gccactatgc atctgttcc aggtgtttgt ttagtgtttc 360
 ttctctttat tegtgttttt gtttttattt ttaattttaa ttttagttt tctcattct 420
 ttttttagtc tagtggtagt ggaagtgaag gctgtgtaag gaatggaaaa tccataggaa 480
 gcaagagggc tga 493

<210> 4

<211> 493

<212> ДНК

<213> Beta vulgaris

<400> 4

atgtcatctc atgattcgat gggtttagtc ttaaagtgc tccaaggc cgctgttgac 60
 tttctggtga agcctataag aaaaaatgaa cttaaaaacc ttggcagca tgtttggagg 120
 aggtgtcaca gtgtaagtgt ctttacattt tccagctttt catcagctta gtggttcgtg 180
 tagcagtctt tcagattttc gaactttcta gcacatatga caaattaaac ctgcatgcta 240
 attcccgatt agataatgga ataagctctt tcagctggtc tttacttct ttctcttctc 300
 ctcttatgaa aaactgggat gccactatgc atctgttcc aggtgtttgt ttagtgtttc 360
 ttctctttat tegtgttttt gtttttattt ttaattttaa ttttaattt tctcattct 420
 ttttttagtc tagtggtagt ggaagtgaag gctgtgtaag gaatggaaaa tccataggaa 480
 gcaagagggc tga 493

<210> 5

<211> 15037

<212> ДНК

<213> Beta vulgaris

<400> 5

attattgtac atayawgacy attacgtaa ctaaattaaa aaaagtttta aaaatgcaaa 60
 acagaaaata aaatcaaata tcgacatttg gaaatttata atagaaatga ataaaaataa 120
 gggagaaaata aatgaagaac aaaataaatg agaaagagaa ttaaatggt tcttgaaaaa 180
 taaatgagag agaaaaggag ggaatgagtg agtgatgaga gagaagagc tggccactt 240
 tcaaaaattc tgcacaaagc ctgcacaaat ttggccctcc taaaagcacc aaactacgt 300
 agttttggcc aagggtgtagg atgctcatcc tacacctccg tgcaggatct aaattgcgct 360
 tagaaatagg gtctcctaatt attctctac tagcattttt tgcacgcgat gctgtcttga 420
 atttttttca agatagaaac tcgatttttt tcgacgtatg taaaagtcaa aatttaacaa 480
 ttagacatac aaagtataat tgtttttagt taaaaaattt aattggttta gtctctgtaa 540
 cttgagtttc tcaccagtct tttttttttt tttttttttt tttactttca aagttaaatt 600
 ctatgaacaa aatagaattt ttattgaatt tatctatgat ttctaattt actccctccg 660
 accaaaaata tagttcccat ttcccttttt tcacggtaat ttatgcaaat agaataaag 720
 agggatagta aagatttttt gttattttta ataaatgttg tatgggaaaa gatgatttta 780

```

ggagagaaag tagagaataa ttggtgaaag agtattaatt gtaacatttt gggtgaataa 840
acaaaggaaa aaacaaaatt caagaagcaa ataatgaga attgtttcct tgaataatgc 900
aaaagtgggt ttaattccc aaaatatgcc caaaaaaaa aaaattccct gtgtaccgtc 960
cacgtaagac ggcacgcgag attttttttt cctacttcaa tacaaccgct acttaaagta 1020
gcggtttact gatTTTTTTT tttatctact taggtaaaa cttggcgctg agtgatataa 1080
ctcgctactt caagtagcga tttactgaaa tccccaactc catagtttga tatgtgcttg 1140
caacattttg ccaggtataa ccgctactca ggttagcggg ttatgtgtat aaaccgctac 1200
ttaaagtgcg ggtttatttt aatataaacc actattgtga gtagcgggtt acgtgggcaa 1260
aaacaaaaaa aaaaatagtt tctcgcgtgt cgtcctacgt ggacggtacg caggggaattt 1320
ttaattttt ggcatattt tgggaactaa aaccacttt tgcattatc aaggaaaaaa 1380
tcaaaaaa tgatgggaca cgggttttct agacaaatta cgaaaaaatg tggaactaaa 1440
tatgaaaatg gaaactatat ttggggacac ccaaaatgga aatgggaatt atattttggg 1500
acggagggag tataattttt tagttgattt ttgaattaag tatactactt catatattgt 1560
taagaaactg gacacttgga tttcaagtc aatttttgtg agtatgtatt gacgttctag 1620
tgtattgggt gtagtttcta agttaatttt tgtttttcta aagtttactc atttgagtga 1680
ttgtataat gtaaattatg caattctatg attttagttg aottgtgagt gattgttata 1740
attttatttc cattattttt atttgaatct ccotttgggt tgtatgtgaa ttgtaat 1800
agaaaggcaa aggggtaaaa tagtctcttc attcgggaac accatagttc ccctccttc 1860
cttatataat aaagatgatg atgatttttg ataataatga ttgttaagt aattatgtga 1920
atgtttttgt atgtattgac gtcctagtat attagtttta gtttgaagt taattttttt 1980
gtttttgtaa agtttccga tcatttgagt gattttctgt attttttgtg attttctcaa 2040
ttctatgagt gattttgtaa gtttcttgat ataagtgatt tctgagtggt gttgaattaa 2100
tttcggttg cttgtttaga accccatttt agtattgaca tttcttttgt aatttagaaa 2160
gggaaagggg ggtaaaatag gcatttcaaa aaaggacacc attgtcccc ccttccctta 2220
tgtaattgag atactctaaa agaataccga gagttttttc ccaaaaagga gtattttttt 2280
taaaattttt tccataaagg agtatttatt agtaccgaat tgatttccca aatcattatc 2340
cttcgcgcaa ttgcataatg gagatatttg gtgttgacgt gtgaatatgg ggcataata 2400
ataggaggtc aaaaacaaaa ctacaagggt taaaaatgac acaatattaa acaagcatct 2460
cacattctca ctggtaactt tttttaacc tattaaaaga acaaaccttt aactctctc 2520
acaatctgac acgtgtcgaa tatgtattta ctgagatcaa tttagatcct ctcccttaga 2580
ctctctgtc ttctcagtc agcttttagat ctcaacctcc atgtcagcaa agttacctta 2640
cgtgtcatcc tacgtggcct ctctctctac cctcactcc tccacgtcaa catttctctc 2700
caaaattaaa aaatcatttt tttattatat ttacttgaat gtatataata atgtctactg 2760
atcttctctt ttagaactat ctctctctct cattggaacc tcaaatcat tcttatttta 2820
tttcgagaaa aggaaaaaaa agcacatctt ttttgaagat taatttgttg attattattg 2880
agcttcactg tattaaaaaa catagtaaaa gttctttcct catttgtctt ttattctatc 2940
taattttttt tagtgaagaa ccctaatttt gtttgtgaat tctcaagttc aagttttgat 3000
ttgggtattt tttttgatga aatttgtgca gctgtaggat gttatcgtgc tgagaaaagg 3060
gttttagatg gtaagttttt tttcttttga tttctctctc ctactttttt ttttgttttg 3120
ctttagataa tactgtcatg atatgatata aagaattggg gatttgggta gtttatttaa 3180
cctatgatta tgtgttattt gtttgatct ttcaatttat ctgggtctgt gtgtatatat 3240
gttttgtttt tcttcaagta ttgggttatt attgaagtgg gtaattagga atttgctact 3300
aatctatgga ttgggttctt gtttgatga atttactata gatttgaggt ttaatttatg 3360
ttttataggt tagaaaaagga aatcaatgat ttgtttgttg atttgatag attgtttgtt 3420
agtgtgtgta tgatgatatt aacttccatt attcttcccc aaattagggg taattgatgg 3480
ttttttgcat accgaaggcg tattctcttt gatgatggag tgattgttga aaagacatga 3540
tgggttaag ttgcaggatt atttcatttc aataaacata attgatcaat ttggatctgt 3600
tgaatgaggt tgattcacia aatgaagat gggcccggtg ttgccaagtc ggtggcagag 3660
cttaataaac atatagttgc tgtgaaaaaa gaaggtaggg gtagggttgc aggtgaaggg 3720
caggggcttt ccgaggagga cgaactgaga attattgagg atggtgaaga tgcacaacgc 3780
aggcgttctt tgagttctgt tcagcttcca gttcactc acaggcatca gccacaagta 3840
caacccagg ggagagtctg ttgggagagg tttctcctg ttggatctcc taaggttttg 3900

```

```

ctcgtagaaa gtgatgactc aactcgtcat attgttagtg ctttgcctacg gaaatgtagc 3960
tatgaagggtg atttgatctg ttttaatccc atatatgcaa tgccttgtcc ttatcaccta 4020
cttcaacaaa tgattaagag aattgtactc cctcgttcca aaataatagc aacacttagc 4080
cttcocgtag actttaggga gcgtttgggt catattatgg tatgggtttg gaattaggaa 4140
tgaaccaag gtggtatggg gttggaactt gatacttaat accttgtatt tggtttcatt 4200
taggaatgaa aaaatttctt ttatttgata cctagaggta aggtatgagc cataccacc 4260
tcccccatg ggtttctaaa ccccatacct tatgggtttg aggtatgggt ttaaaattta 4320
aaaataagtt aaacaaacac taggtatgtg ttttgttcat tccaaacca taccctatac 4380
ctaaaactag tgaacaaac acccccttaa ggccttggg acaaaggga tccattacta 4440
gatctggtga cattaatacc taagtttaca tcagtttcc ttaaactcct cgttttaaaa 4500
aaagtaaaaa aacctgttag tctgagtaag ttactaatt tttgtctaa aattcaacac 4560
attatctaca tgcaagcact tactagtaca atacaactca aacaatatat gcactctatc 4620
tggtcacaat gaaccgaaaa ctaatctttt catacccttg ttgatgctt ttttcaggcc 4680
atacaattt cttaaccta aattgcctcc tcagtcactg tcaaaaattg cagttttaac 4740
atcctcaaga ccatgtgatg tactgttaga ttatattaag accctattgt aaataaagca 4800
tgtatagtgg aataaaatgc atgtcttctt actttttttt ggggtccatg aactcattgt 4860
ttgatatttt gcagttgtag ggtgccaaa tggcatagaa gcattgaaaa tcttagaaga 4920
tttgagcaat cagattgacc tagttttaac tgaggtagtc acatcaggac tctctggtat 4980
aggtcttctg tccaagataa tgagtcacaa aagctgccag aatactcctg tcattagtga 5040
gctttcgttc cttgttgtat tagtgtatgt tctgtatttg attttcttcc tttgtgcata 5100
tctgccttg ttttttacia ttatttagat tttagatgaa aatgtatact cattttatgg 5160
tctttagctg caacatttga ttattttgtg tgcagtgatg tcactcctatg attcogtggg 5220
tttagtctta aagtgcctat ccaagggcgc tgttgacttt ctggtgaagc ctataagaaa 5280
aaacgaactt aaaaactctt ggcagcatgt ttgaggaggt tgccacagtg taagtgtctt 5340
tacattttcc agctttccat cagcttagtg gttcgtgtag cagcttttca aattttogaa 5400
ctttctagca catatgacaa attaaacctg catgctaatt cccgattaga taatggaata 5460
agctctttca gctggtcttt tacttcttcc tcttctcctc ttatgaaaaa ctggtatgcc 5520
actatgcacc ttgttccagg tgtttgttta gtgtttcttt cctttattcc tttttttgtt 5580
tttattttta attttaattt taatttttcc tcattctttt tttagtctag tggtagtgga 5640
agtgaagct gtgtaaggaa tggaaaatcc ataggaaagca agagggtctga agagtggac 5700
aatgacactg acatcaatga ggaagatgat aacagaagca ttggtttaca agctcgggat 5760
ggaagtgaca atggaagtgg gaccaggtta gtgctaacc ctgtaatat aaacttccca 5820
tagtaggtgt ggttaatgtg acgctgttaa ggccttttgg gtggttgctt ctagtccact 5880
aaggataata agaaatagct cgtatttgat agttagggca cctcaatato accctctctt 5940
gtatgtttgt tgaactacat ttttagccag acttgagtat ttatcctga aggatagaac 6000
aggtgcattt ttggttcggt ttgttagttg ttactgttat gcaaagacta ttgccaccat 6060
tttctcacac atatttaaca tgggaagtgtc ctaaccaccc cccaacccaa aaaatgggag 6120
ggagaatta ctggagatgg gaaagaagtt acataaaaag ttagtcgttt gggctatgat 6180
tgtttgttgt atttgcaaa ttagcgcgtt ctcttcctgg atgcttcaaa ataagctgat 6240
gcaccataaa gtaccactct tggcttcacc tgttggtgtg gaccacaacca atgtaccctt 6300
gttgatctcg agatagacaa agagggaagtt taatttctct ttatatgtta tctctcttca 6360
atttgttagc agctatgtct ctttcgttga catttagaac ccatgttagg ttcatattta 6420
tagttagggt attgtatcaa aattgccatc acaataaaca gaacattaat ttctattggg 6480
aaggattcaa ggtcaaaata tacaggaaag agcagtgtag gagatatcat cttgttgaa 6540
aacaaaagaa acattaacat caactgttga taactttgc aagattggat gacaaaatga 6600
ggagtgcac taatataaaa caaattggga actgtcagct atatcctgca tatcaagaat 6660
ggagacottt aagaaaagta agaccatttt ttgttgggaa gtcaagccat tgtccagtt 6720
tccttgtgaa atttagttca tcttagcttt ctctaccaa catgaattct ctttctcttc 6780
agcccttgca aacttggttt tatgctaatt atcagtgttt ccttcattta gtacgtgag 6840
agggtttatt tggttgatca aagaatactt gatgacctg aggtatagtc tctacatgga 6900
gaagtctctc taagtgtaca aagaacttag ttogaccaac ttgatattag gaagagataa 6960
cacgatcacc tcgtggtcta gactctggag aggtcaaaagt gtgcaaaagg gtatttttga 7020

```

```

aagacaatgg cttgttgatt catgactgaa attggatggt cgtgactgag cataactat 7080
tagtgggtct cttctaaggt gatataagta tgtgataacc caatcctgta tatttcttcg 7140
aggacatcaa ttgtgetact attctagggt gctggagacc catacatata gagccattga 7200
caattaacac aaacttcaac cacttatctt tatttcattt aagctatcaa tccctaagaa 7260
agagcccatc caagctcctg ctttaggtgc atcccctccc ttttcagcta gtgcacaaaa 7320
aatgaacttt cgagatagac tgctaaattt gctttgtcaa gaagacaaaa ttttgataca 7380
caactgtaat tgcattttat gacacttacg ctgatatatc tgcaagtga gttgatatgc 7440
aaaaactatg tagcctcctt cgtctacggt aatagatctc cgtcaatgtg atgcttgtgt 7500
gccatcataa aatgatattg ggtctttaga ctctgttact ctacagctga aggatcttag 7560
ccttggcatt tatatccttt ttatccaaaa gttaaaaaaa gcggaccgtt tgaccocatgt 7620
aaggaaaaag gaaaggaatc gagaagaca aaggaggggg aagaagttaa atctcctaaa 7680
aagcttgttt tgtcgggtga gagagggagc gacttgaat tgccattgat gatgattggt 7740
tcacaattgt aatcgaatc aaactcactc tctctctctc tctctctctt atcaccctcc 7800
tcaactataa acatcacagt cctttaaacg tgactgttcc gggggatagt gactggtagg 7860
gatgggcaag ggtcgggtct ggtgggacc tagaccgga cctaatcttt tttttgtaga 7920
cccaaccctg gaccctaagg gtctgaaaaa attggacctt gaccagacc cttagggtct 7980
gaagggtcta gagggtcagg aggggtccagg cttaaatctt ttattttgcc aaatttttag 8040
cattattaat atcaataatc atttgaaatt cgcattgaac aaacacaaa aaaaatcgca 8100
tgaatcaaac acaaaaatc gcattgaaac aacactaaca tataaattga aaaaaacgaa 8160
acaaacaaa acttataaac gaaaaaaatt gaaacnaaca caattccaaa catataaact 8220
gaaaaaaaaa acgaacaaa cacaatatata caaactgaaa aaaagaagaa acaaacacaa 8280
ctacataag agttcagaat ggtgtgtata gtttatgttt tagtcaatta gaaaatcaat 8340
ttgttttttt tttaaagtta aaatgtatat attaataaag tttagggctt aagggtgttg 8400
aacatttata gggtaatggg ttgaaactc atatgggtat gtactagaag aggaggagggt 8460
ctagtatgca aaaggtaga gtgcattcaag tggtaacaac gcgcattggt ataccaatgt 8520
cgcgagtcgc gacaggcgtc gcgggtcgcg accagcgctt cgcgagcttc ttgcgatgtc 8580
gcgacgcgtc ttctgccttg gaatgcgaaa aaatgcctcg gcggttttat atccgttgtg 8640
atgctttgtt gatcatttta atgactttta aggtctttta atcagtagat taaaggcctt 8700
tgatgagtga ttaagatggg ggttatgtga ttaacctctc tagtcaatga aatgttgatt 8760
atgcttatat aacctttgga ttccatgag tgaggagtta gaagaaaatc agaattttct 8820
atactctctc aaaagtcttc ttgcttagct taagagaaac ctgcaatct tctcttagt 8880
gttcttcaca aacacaaaac acaagttctt gttgattcac ttagaagatc atctaagtg 8940
attgtttctc tccattgtat ctcatagtt atttcgtgtt aaccgggtga tcttagaggg 9000
gcgaaattaa actaatgga aagcgtagtt tccgtgcctt ggagtgggat atccggttct 9060
ctcattgac acaagcctaa cataaagggtc ggtctgggt ccaaatttta agaccgggac 9120
ccggacccta aaaaattcac ttggaccag acccggaacc ggaactcttag ggtctgaaaa 9180
agttggaccc aaacccttaa attagggtcg ggtccaacag ggtccgggta ggtctttgga 9240
cccatgccca tccctagtga ttgggtagcc cattgcagaa tattgagaac gcaatataa 9300
ggggtgttga gaaagagggt tttagtgtta ttgtttaaga aagttgggaa aggaatgaga 9360
gatgaagtac agaagaaaaa gtctagaaag tgaagcatgg gagtctgttt cttttctttt 9420
tccataagtt tcccacaaa tgtcccttaa gtggttcagc cagcctttg gacaagctta 9480
ccaccaagct ccccatccca gatcatattt gaatcaaca tctttctttt tttagaatat 9540
tctttttttg tgcagtaaa gcaattccat gagatatga ccttatattt ctctaaaaata 9600
tataaataat tgatgaagca attttcagat cattagataa gcgttctaca aaagaacct 9660
ctttttttgc ttccittgtt acttggaaaa tbtagtctcc atatataatt ttaccatggc 9720
agtacttcta tagaccacta agttcttcgc ttgtgcaacc tatagtcat ttaagagggt 9780
ttaggtatag acagccttca ctttcaattg gtttagtgtt acctccagta tcaactgacg 9840
aattttcaat aggaacttct gtccataact aattgcaga aagcactaac taaacaaccc 9900
cttagttctt tagttaagcy cttgattggt cacatccagc ttttagtttt tagtatggag 9960
atttataaag tagtatgact tgagttgaat agtgaacgta agattagaca tatttatata 10020
gtcgtgttaa ttttggaaac tgacaggagt gactagaaac cacttttttt gtgtccaaaa 10080
tttccatata ttgtttttta aaaaaactgc taaatcacga tgataacaaa caaaccttac 10140

```

acaggtaccg gaatgatatt gaaacaaatt gaggttagtg ataagccata atcccttacc 10200
 ttgaaattca gaggtgtct gctgcagtct ctatcatctt cttatttcac taaatcaatt 10260
 attacctgct tcaacctcaa cgggtccgagg cttagacatt gtgtctttga tagtatcatc 10320
 acagctgaaa attaatgtgt actttcttct atttaaatc catttgagag tgcctttggt 10380
 agtcattatg aatgtcgtga gatcacatc cgtgaaatat agttttcatc acattcttac 10440
 ctgcatgtgt aaggaaaagt atagcgttag tgttcaatct ttgtctactt ctgggtgactg 10500
 gtcaatggtc aaagtatgca gcatgatttt gtgtttgtca gtttcttctt taaataagtg 10560
 tgaactgctc tagtctaagt tgcctgaact cttaaaaagt gttggacttg ttagttgtta 10620
 catgtataca atgttgattg ggtgggcttt tccatatatt attatatttg ttgaatcaca 10680
 atgaagtacc tatttcatt tgaggagtag gtatgatgag gttagtaggg agtttgagtg 10740
 ttaaaggtta tgtgaagatg taaaaattc ctgacaatga gaccttagta tccgacggtc 10800
 ggaattttac caattttatt gccttggtac cttctattt ttacttagta tttctttttc 10860
 ataaattttt gtgatctaga gtcatggac aaaaagggtc gcagaagttg agagccccc 10920
 accacagtct acatgggagc aagcaactga tccacctgat agcacttggt ctgaggtcat 10980
 ttatccaatg tctgaggcat ttgccagcag ctggatgcct ggatccatgc aggaacttga 11040
 tggacaggat catcaatatg gtatgtggta ctgtatttga tagaagttac aataatgtgt 11100
 aaactgaaac cacttaatga cctagtatcc atctgtatca gacaatgtcc caatgggaaa 11160
 ggatttggag attggagtac ctagaatttc agattcacgg ctaaattggac caaacaacac 11220
 ggttaagtta gcaactactg ctgaggaaaa ccaatatcca cagttagacc tcaaccagga 11280
 aatgatggt cgaagttttg atgaagagaa cctggagatg aataatgata aacctaaaag 11340
 tgagtggatt aaacaggcta tgaactcac aggaaaagtt gaagaacatc gtgagggaaa 11400
 taaagtatct gatgcaccac ccgaaatttc caaaataaag gacaaggca tgcaacatgt 11460
 cgaggatatg cttctcttgg tgctcagtc gaagagggtg ggtgatattg cagacacgag 11520
 cactaatgtc tcagaccaga atattgttgg gcgttcagag ctttcagcct tccaccagga 11580
 tgctagagaa ggtgaaactt gaatttatat aatggacaag tggacaatat ctcattttta 11640
 aattgttga ggtacaatc aggcacaact ggtaaccagg gtcaaacagg taatgttggc 11700
 agttgtcttc caccaaaata tagttcagaa gcagcaaac agtcccatct tgatgtcca 11760
 catcaaatct cgaatagcag tagtaacaat aacaatatgg gctctactac taataagttc 11820
 ttcaaaaagc ctgctatgga cattgataag acacctgcaa atcaacacgt caactgttct 11880
 catcattcac atgtgtttga gccagtgcac agttccata tgtctaataa taaccttact 11940
 gcatctggt agcctgggtg tggctccgta aatggtatgc tgcaagaaaa cgtaccagta 12000
 aatgctgttc tgcgcgaaga aaataacgtg gatcagcagc tcaagattca gcaccacct 12060
 cactacatc attacgatgt ccatagtgtg cagcagctac caaaggttct tgttcaacat 12120
 aatagcccaa aaagcaagga tgtgacagca cccccacagt gtgggtcttc aaacacttgt 12180
 agatgcctaa ttgaagcaaa tgttgccaat tgcagtttga atggaagtgg tagtggaagc 12240
 aatcatggga gcaatttctt taatggaagt agtctgtctg tgaatgttga aggaacaaac 12300
 atggtcaatg atagtgggat agctgcaaaa gatgggtgctg aaaaatggaag tggtagtgga 12360
 agtgggaagt gtagtggtag tgggtgttgg gtggatcaaa gtcatcagc tcaacgagaa 12420
 gctgccttga ataaattccg tctcaagcgt aaagaaagat gctttgacaa aaaggtaata 12480
 ctccaaatc tctccagaat gtttatactt ggacatctag tatgtacato cttgaatcta 12540
 aactgtaaaa gctgaatttc agaataaaaa acacaaatta tatcaagtat gaaggcagag 12600
 tattgtagta attatagttt ttctgggtat gaattagtac ttacatttac cagaagcctg 12660
 ctgtcacaag ccataatttg atcatcaagc aacaataatt tggcatttct ttgcttgat 12720
 tgaaagtgag atgacttcaa acttatattgt gtatcatcac atcaggtgcg atatcaaac 12780
 agaaagaagt tagcagatca aagacctcgt gtctgtgggc aattcgtgcg ccaggtacga 12840
 gaaaacaaag gaaggaatac cgatagctaa caccaattct ttccacaagt tgcgtccaag 12900
 atcatttatg ccactctgat gtcagctgtc ttoatatgta caaatttcga attttatgtg 12960
 tgcagaggt gctaaatact gtcaaacctc agtgattctg ttgggtttag gctgtagaaa 13020
 gacatctttt ctttgtgtt ttcatgggtc ttattttgag ctgtgttcac tactttttat 13080
 aacatgtag cccttggtg ctttggaata taagcttttc cttaagggtg tgatgcata 13140
 aatcttgttt ggtgttagat tataatgaca ttcttcagg cgtttacggg tcacatttct 13200
 cggaatcctt tcaaacgcga ttccggaaac aatggctcat atttcttttt gggttcaagg 13260

```

agaaggctat ttaaacaga aaagatttag gttacagaaa tcagtgatga agcaatgagt 13320
ttcattatag aataggtaga agtaggggtt gttttttccg tactcttgag atagaaagtg 13380
gggatagatt ctttggactc gtcagaaagg aataatatag ttgtctacct ttttcatttt 13440
tagttcttgt aggagtttta ttccacttcc atttttgtaa aatttaggag ttgtaaggac 13500
gtgtaaagag aatctgccat ccagatttta accgacggta aatttggtct tttcatgttt 13560
tctcaagtaa ctataatgtt ttcacgaat ctatagggat tttctaagt gtacctgata 13620
gaggcacaca gtaacaataa tataagtaca tatattcttt aagaataatg acatagtaat 13680
tatattttta atacaataa aagatgtcct tatgtaatga aacaataaac ttttccttga 13740
aggtatgcca taattaatta cttattttt agatatttt atatttagt tgggtagtgg 13800
aactactaaa taaaaaatg gttatagtaa catgtactca tgtgcgaacc gaaaaaaccc 13860
ctatgttttc tctaaaagt cccaaaccct tgagcttata gcccgacgg cccagcgag 13920
gcttgctgga ggcgcgctc gtcaccctg tcgocgacga gctgcatgt cgtatcgttc 13980
ggtctctga aggttttagt ttccctgttc ctctttgtgt tattcatcgt tcccatcccc 14040
catgtctccc ctccctctgt cagtgggtgt cggcctcccc tccccctatt aatggttctc 14100
ggcctcccc tcccttccc ctaatagtgg ttgttggtct cccctcccc tttcatgttg 14160
tcaagttgtt ctttccccc ttctccctt tctagtctct cttttggtgt tcttggtgtt 14220
gttagtttag tggcttttgt tggttagtgc ggctgagtgc ttctgtctcg tatgcccttc 14280
cttgctcccc tatttggttt tggttatgtt ggggtttcgg ttaacccctg tcccatgttt 14340
aaacgtggga gggcctcagg atttagatat aaaggtcacc attctcgcgc ttagacgtga 14400
gagggattaa gtgttcaggg ataagggtc cgttcctgcg cttaaacgtg ggagaactta 14460
aaggttctag gttttacagg agttttggga ttgaaagta tatgaactct gtttggcaga 14520
agatgacagt gcaatgtggg gattaatcat ttctgtttct tcttttttaa taagttagtc 14580
tcttattatg agagtttct attagttcta atcccttaa tttctgtag gggttgtaag 14640
tctagtttgt cgttgtttag tatatctagt tcgagaagct cgaaagttag aggttggtga 14700
aaaatgtact tactggttgc agatcaagaa tattaagacg aatgtttgac ttcaatttac 14760
tattgcatca gtaggaaat atggtgagtc atogaatato cattatggtt ggaatagtac 14820
catatcatgg aagcggtttc gaagcgtgta tattagtaaa atagatgaag atattcaa 14880
cgtgttttta gattatcttt tatgtacgta agggtcatta ttgtttaga tgttgtagtg 14940
tttttaatt taatgataat ttttcttat tccacttaa aagtaaacaa tgcattcatg 15000
tgcacatatt agtacatata ttgtatata catctcg 15037

```

```

<210> 6
<211> 788
<212> PRT
<213> Beta vulgaris

```

```

<400> 6

```

```

Met Arg Leu Ile His Lys Asn Glu Asp Gly Pro Gly Val Ala Lys Ser
1           5           10           15

```

```

Val Ala Glu Leu Asn Gln His Ile Val Ala Val Lys Lys Glu Gly Arg
20           25           30

```

```

Gly Arg Val Ala Gly Glu Gly Gln Gly Leu Ser Glu Glu Asp Glu Leu
35           40           45

```

```

Arg Ile Ile Glu Asp Gly Glu Asp Ala Asn Ser Arg Arg Ser Leu Ser
50           55           60

```

```

Ser Val Gln Leu Pro Val His Thr His Arg His Gln Pro Gln Val Gln
65           70           75           80

```

```

Pro Gln Gly Arg Val Cys Trp Glu Arg Phe Leu Pro Val Gly Ser Pro
85           90           95

```

```

Lys Val Leu Leu Val Glu Ser Asp Asp Ser Thr Arg His Ile Val Ser
100          105          110

```

```

Ala Leu Leu Arg Lys Cys Ser Tyr Glu Val Val Gly Val Pro Asn Gly
115          120          125

```

```

Ile Glu Ala Trp Lys Ile Leu Glu Asp Leu Ser Asn Gln Ile Asp Leu
130          135          140

```


022877

Val Leu Thr Glu Val Val Thr Ser Gly Leu Ser Gly Ile Gly Leu Leu
145 150 155 160

Ser Lys Ile Met Ser His Lys Ser Cys Gln Asn Thr Pro Val Ile Met
165 170 175

Met Ser Ser His Asp Ser Met Gly Leu Val Leu Lys Cys Leu Ser Lys
180 185 190

Gly Ala Val Asp Phe Leu Val Lys Pro Ile Arg Lys Asn Glu Leu Lys
195 200 205

Asn Leu Trp Gln His Val Trp Arg Arg Cys His Ser Ser Ser Gly Ser
210 215 220

Gly Ser Glu Ser Cys Val Arg Asn Gly Lys Ser Ile Gly Ser Lys Arg
225 230 235 240

Ala Glu Glu Ser Asp Asn Asp Thr Asp Ile Asn Glu Glu Asp Asp Asn
245 250 255

Arg Ser Ile Gly Leu Gln Ala Arg Asp Gly Ser Asp Asn Gly Ser Gly
260 265 270

Thr Gln Ser Ser Trp Thr Lys Arg Ala Ala Glu Val Glu Ser Pro Gln
275 280 285

Pro Gln Ser Thr Trp Glu Gln Ala Thr Asp Pro Pro Asp Ser Thr Cys
290 295 300

Ala Gln Val Ile Tyr Pro Met Ser Glu Ala Phe Ala Ser Ser Trp Met
305 310 315 320

Pro Gly Ser Met Gln Glu Leu Asp Gly Gln Asp His Gln Tyr Asp Asn
325 330 335

Val Pro Met Gly Lys Asp Leu Glu Ile Gly Val Pro Arg Ile Ser Asp
340 345 350

Ser Arg Leu Asn Gly Pro Asn Lys Thr Val Lys Leu Ala Thr Thr Ala
355 360 365

Glu Glu Asn Gln Tyr Ser Gln Leu Asp Leu Asn Gln Glu Asn Asp Gly
370 375 380

Arg Ser Phe Asp Glu Glu Asn Leu Glu Met Asn Asn Asp Lys Pro Lys
385 390 395 400

Ser Glu Trp Ile Lys Gln Ala Met Asn Ser Pro Gly Lys Val Glu Glu
405 410 415

His Arg Arg Gly Asn Lys Val Ser Asp Ala Pro Pro Glu Ile Ser Lys
420 425 430

Ile Lys Asp Lys Gly Met Gln His Val Glu Asp Met Pro Ser Leu Val
435 440 445

Leu Ser Leu Lys Arg Leu Gly Asp Ile Ala Asp Thr Ser Thr Asn Val
450 455 460

Ser Asp Gln Asn Ile Val Gly Arg Ser Glu Leu Ser Ala Phe Thr Arg
465 470 475 480

Tyr Asn Ser Gly Thr Thr Gly Asn Gln Gly Gln Thr Gly Asn Val Gly
485 490 495

Ser Cys Ser Pro Pro Asn Asn Ser Ser Glu Ala Ala Lys Gln Ser His
500 505 510

Phe Asp Ala Pro His Gln Ile Ser Asn Ser Ser Ser Asn Asn Asn Asn
515 520 525

Met Gly Ser Thr Thr Asn Lys Phe Phe Lys Lys Pro Ala Met Asp Ile
530 535 540

Asp Lys Thr Pro Ala Lys Ser Thr Val Asn Cys Ser His His Ser His
545 550 555 560

Val Phe Glu Pro Val Gln Ser Ser His Met Ser Asn Asn Asn Leu Thr
565 570 575

Ala Ser Gly Lys Pro Gly Val Gly Ser Val Asn Gly Met Leu Gln Glu
580 585 590

Asn Val Pro Val Asn Ala Val Leu Pro Gln Glu Asn Asn Val Asp Gln
595 600 605

Gln Leu Lys Ile Gln His His His Tyr His His Tyr Asp Val His
610 615 620

Ser Val Gln Gln Leu Pro Lys Val Ser Val Gln His Asn Met Pro Lys
625 630 635 640

Ser Lys Asp Val Thr Ala Pro Pro Gln Cys Gly Ser Ser Asn Thr Cys
645 650 655

Arg Ser Pro Ile Glu Ala Asn Val Ala Asn Cys Ser Leu Asn Gly Ser
660 665 670

Gly Ser Gly Ser Asn His Gly Ser Asn Phe Leu Asn Gly Ser Ser Ala
675 680 685

Ala Val Asn Val Glu Gly Thr Asn Met Val Asn Asp Ser Gly Ile Ala
690 695 700

Ala Lys Asp Gly Ala Glu Asn Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
705 710 715 720

Ser Gly Ser Gly Val Gly Val Asp Gln Ser Arg Ser Ala Gln Arg Glu
725 730 735

Ala Ala Leu Asn Lys Phe Arg Leu Lys Arg Lys Glu Arg Cys Phe Asp
740 745 750

Lys Lys Val Arg Tyr Gln Ser Arg Lys Lys Leu Ala Asp Gln Arg Pro
755 760 765

Arg Val Arg Gly Gln Phe Val Arg Gln Val Arg Glu Asn Lys Gly Arg
770 775 780

Asn Thr Asp Ser
785

<210> 7
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер PRR7(T1) -F

<400> 7
gagggtgtcac agtgaagtg tct 23

<210> 8
<211> 25
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер PRR7(T1) -R

<400> 8
aaagactgct acacgaacca ctaag 25

<210> 9
<211> 14
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> зонд PRR7(T1) -FAM

<400> 9
ctgatgaaaa gctg 14

<210> 10
<211> 14
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> зонд PRR7(T1) -VIC

<400> 10 ctgatggaaa gctg	14
<210> 11 <211> 23 <212> ДНК <213> Искусственная	
<220> <223> праймер BvPRR7	
<400> 11 atgtcatctc atgattcgat ggg	23
<210> 12 <211> 21 <212> ДНК <213> Искусственная	
<220> <223> праймер BvPRR7	
<400> 12 tcagccctct tgettcctat g	21
<210> 13 <211> 23 <212> ДНК <213> Искусственная	
<220> <223> праймер BvBTU	
<400> 13 ttgttgaaaa tgcaagcag tgt	23
<210> 14 <211> 20 <212> ДНК <213> Искусственная	
<220> <223> праймер BvBTU	
<400> 14 aagatcgcca aagcttggtg	20
<210> 15 <211> 19 <212> ДНК <213> Искусственная	
<220> <223> праймер BvICDH	
<400> 15 cacaccagat gaaggccgt	19
<210> 16 <211> 18 <212> ДНК <213> Искусственная	
<220> <223> праймер BvICDH	
<400> 16 ccctgaagac cgtgccat	18
<210> 17 <211> 21 <212> ДНК <213> Искусственная	
<220> <223> праймер F3766	
<400> 17 tttgatgctt ttttcaggcc a	21
<210> 18 <211> 27 <212> ДНК <213> Искусственная	
<220> <223> праймер R3767	
<400> 18 ttttcttata ggcttcacca gaaagtc	27
<210> 19 <211> 23 <212> ДНК <213> Искусственная	

```

<220>
<223> праймер F3354

<400> 19
atgtcatctc atgattcgat ggg
23

<210> 20
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер R3355

<400> 20
tcagccctct tgcttccat g
21

<210> 21
<211> 29
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер F3768

<400> 21
tttctcatt ctttttttag tctagtgg
29

<210> 22
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер R3769

<400> 22
aatatgtgtg agaaaatggg ggca
24

<210> 23
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер F3782

<400> 23
tcysaatggg aaaggatttg
20

<210> 24
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер R3783

<400> 24
aatttcgggt ggtgcatcag
20

<210> 25
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер F3784

<400> 25
gcccccaacc acagtcacac
20

<210> 26
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер R3785

<400> 26
ggtccattta gccgtgaatc tg
22

<210> 27
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер F3806

<400> 27
tttttgata csgaaggcgt
20

```

```

<210> 28
<211> 28
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер vR3807

<400> 28
catttggtga agtaggtgat aaggacaa                28

<210> 29
<211> 28
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер F3808

<400> 29
ttagatcctc tcccttagac tcttctgt                28

<210> 30
<211> 29
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер R3809

<400> 30
tcaccaattc tttatatcat atcatgaca                29

<210> 31
<211> 28
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер F3810

<400> 31
gagaaaaaggg ttttagatgg taagtgtt                28

<210> 32
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер R3811

<400> 32
aactttaacc catcatgtct ttccaac                27

<210> 33
<211> 25
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер F3853

<400> 33
aactggacac ttggatttca agtca                25

<210> 34
<211> 26
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер R3854

<400> 34
ttatgggaaa aaactctcgg tattct                26

<210> 35
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер F3855

<400> 35
gaaccccatc ttagtattga catttct                27

<210> 36
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер R3856

```

```

<400> 36
aattagatga ataaaaagac aaatgaggaa 30

<210> 37
<211> 26
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер F3857

<400> 37
tccatttgag gagtaggtat gatgag 26

<210> 38
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер R3858

<400> 38
cttcgaccat cattttcctg gt 22

<210> 39
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер F3859

<400> 39
ggaaaaaаааа tattcacagt tagacct 27

<210> 40
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер R3860

<400> 40
tcttgagctg ctgatccacg t 21

<210> 41
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер F3861

<400> 41
ctgcactctgg taagcctggt g 21

<210> 42
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер R3862

<400> 42
cgtaacctggc gacgaat 18

<210> 43
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер F3863

<400> 43
aatttgгсса ttctttgctt gtat 24

<210> 44
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер R3864

<400> 44
aatgtgaccс gтааагссct 20

<210> 45
<211> 26
<212> ДНК
<213> Искусственная

```

```

<220>
<223> праймер F3865

<400> 45
ggtgtgatgc atataatctt gtttgg 26

<210> 46
<211> 16
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер R3866

<400> 46
agcaagcctg cgctgg 16

<210> 47
<211> 13
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> зонд PRR7 (№3827) -FAM

<400> 47
acaggcatca gcc 13

<210> 48
<211> 15
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> зонд PRR7 (№3827) -VIC

<400> 48
tcacaggcct cagcc 15

<210> 49
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> «прямой» праймер BvPRR7, применяемый для анализа генной экспрессии
<400> 49
ttggaggagg tgtcacagtt ctag 24

<210> 50
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> «обратный» праймер BvPRR7, применяемый для анализа генной экспрессии

<400> 50
tgtcattgtc cgactcttca gc 22

<210> 51
<211> 24128
<212> ДНК
<213> Beta vulgaris

<400> 51
maaacgttgt gatcatctaa tattattgaa tatattatct ccataactta tccataatatt 60
atttagttta ttacacttga tggaggacaa aatccttcaa tctccactt gtctaagaac 120
aagtgtgtaa ccttcaaaact ccttaagtcg cttaatgtct aacttgatga catgataaca 180
tcatatgttc atcataacaa tattcaagtc gtcccttgaa atctgagttt gaactgtcga 240
aacaatgat taacttctta atccatttga gcacggccat gcattttcag ttctcactct 300
tcaagaggcc aagacaccaa tccaaactct taggaggact tatccaatct tgtatgaacca 360
aagctcccaac tcaattcata gcagttccaa tgcgtgcttt tataacctcc ttttacggca 420
cggcggttttg cagcgtcaag aacatactaa tccctaagta agaacagttt catactcatg 480
tcaaaggaat ccactaaata tattaataag agtctcataa accttttaga gaactcccaac 540
taggtctgcc cagcgtgtat caactatata agcctatgca aatgactaga catctccatg 600
tccctatagc ccatgaaact gcgctatcaa tcaacttgca atctagtcca tgaaaattgaa 660
tcatttacgt tcaacttaat gattcgaaact agggactaag gtatattata actcctgttc 720
actggataga gttccattcg tcaaatcaag tatttgacaa ttctatcaaa cgttatataaa 780
tactttgaac gttttattta atactaaacc aagattaaat aagaacaaaa cttttattga 840
taaacataaa cataacatat caaagcgagt aattataact gtgaactaat taaaagttaa 900
tagtacaaa ttaaaccocac tctcotatat gcttaagccc tatagcccta gtatgactct 960

```

```

catgcttggg ctgtggcaaa ggtttagtca aaggatcagc gacattacta tccgtatgaa 1020
ccttgcaaac tattacatcc ttctctcaa cgattttctg aatgagatga aactttctaa 1080
gtacatgttt acatctttga tgtgatcttg gttccttaga ctgagctatg gcaccattgt 1140
tatcacaatg taaaaacaata ccatctccaa cactaggcac tactcctagc tccagaatga 1200
acttcttcac ccaaacggct tcctttgctg catctgctgc agcaatatac tcagcttctg 1260
tcgtagaatc agcgacagtg ctttgctttg aacttttcca gctcactgcc cctccattta 1320
gacaaaagat gaaaccagat tgggatcgga aatcatcttt gtcagtttgg aaacttgcat 1380
ctgtgtaacc ctcaacaatt aacttacttt tacctccata cactaagaaa ttatccttag 1440
tccttctcaa gtacttttag atattcttag ctgcactcca gtgtgcgtca cctggatttg 1500
attggaatct gctacacatg ctcaaggcat atgaaacatc tgggcgagta caaatcatgg 1560
agtcataat ggagcctata gctgacgcat aaggacattc actcattcgc ttaatctcat 1620
caggcccaag aggacactga gtcttgctaa gcgacactcc atgttgcatg ggtaggaagc 1680
ctctcttaga gttttccatg ttgaacttag tgacgatctt atctatataa gttcgttggc 1740
taagtcgat catctcttta gaactatccc tatagatctt gatcccaaaa atatactcgg 1800
cgttttcgag gtctttcata gaaaaacaac tttttaacca ttcttgact gactcaagca 1860
tgggaatgtt gtttccatg agaagtatgt catctacata caagaccaag aagactatgt 1920
tactccactt ttcttcttg taaacacaag actttctcc atttttaaga aaacaaact 1980
ctttgattgc ctcatcaaaa cgaagattcc aactcgtga tgcttgcttc aatccataaa 2040
tggatttttg aagcttacat accctcctag gattttctgg atccacaaaa cctcctggct 2100
gtgtcatata cacatctctt ttcaagaacc cattcaagaa agcggttttg acatccattt 2160
gccaaatctc gtaatcatag aaggcgcgga tcgctaggag tatccgaacg gatttaagca 2220
tggctaccgg tgaaaagggt tcgtcatagt ctataccatg aacttgcttg aaccttttg 2280
caaccaacct tgctttgtaa acctgaatat taccatctt gtctgttttc actttgaaaa 2340
cccatttgca accaataggt gtgatcccat cgggcaaatc taccaagtc cactctgat 2400
ttcagacat ggatgccatt tcggacctca tggcttcgag ccatttttcc gagtcttcac 2460
tcatcaaagc ttgcttgtaa gtagtaggtt cctcaaatc taaaatcatt atctcagaat 2520

tttcagttaa caagaaatca acaaacctct tgggtggtat tcttgttcta ctagacttac 2580
gaggggctgc aacaggagaa attttcttct caacaatag agaattttcg cacgaattag 2640
attcgagtgg gacaatagga ggltcgtgta cgggatgcac gtctccaac acttggtcag 2700
ttatgggaga agattctccc aaaggaggaa ctacttcaag cccaacatct ggcctcttg 2760
tcgttgcttc taacatagga tgaactatgt ccatttggtg atcttctcga acttcttcga 2820
gaaatcatt actccactt gccttttttg aaataaaatc tttttccaaa aagacaccac 2880
gacgagcaac aaacactttg cctcagtg cgttgtagaa gtaatagccc ttggtttcct 2940
ttggataacc cacaagaaa cacttatctg atttaggggc gagtttatct gaaagtaaac 3000
gctttacata aacctcacat ccccaaatc gtagaaaaga caagtttgga acttttccac 3060
tccatatctc atatggtgtc ttatctactg ctttgatgg agttctatta agtggtgaaag 3120
tagcagtttc gagagcatat cccagaagg atattggaag atcagcaaaa ctcatcatag 3180
accgaacct atcaagtaga gttcgattcc tcctttccga aacaccatc aactgaggtg 3240
ttccaggcgg agtgagttgt gaaagaatc cacaactctt caagtgatca ttaaaactct 3300
ggctcaata ttcaccacca cgatcgatc gcagtgcctt gattgttttg ccaagctgg 3360
tttggaactc attttggaa tccttgaatt ttccaaatga ttcgaactta tgcttcatta 3420
aatagacata tccatatcta cttaaatcgt ccgtaaaagt aatgaagtat ccaaacctc 3480
ccctagcttt tgtgctcatt ggtccacata catcagtag tattaggccc aatagatcac 3540
tgaccttttc accctttcca gtaaaagggt actttgtcat ttaccatt aaacatgat 3600
cacacacatc aaatggctca aagtcaaaag atgttagaag tccatcttta tgcaactct 3660
gaatgcgttt cgcgttttat gtctctaaac gacaatgcca taagtaagta ggattagtat 3720
cgttgttct atgttttttg ttgtctatgt taaggacatc ttgtctaaag tctaggtaat 3780
atagaccatt agacctotta gcagtggcat aaaacattga attcaataa acagagaaac 3840
aacctttctc aattgtaaat gaaaacctt cattatcaa aacaggaata gaaataatgt 3900
ttttggtaat agcaggaacg taataacaat tattaagctc taatattaat ccagaaggca 3960
aaggtagact ataagtccca actgcaacgg cggcaactct tgcaccattt ccaactcgca 4020
gttccactc tccttagacc aaggtctcac tccttcttag tccctgcaca ttogaagtaa 4080

```



```

tgtgagaac acaaccggta tcaaatacc aagaagtaga tgttgctaaa ttaatgtcaa 4140
tgacatagat acctgaagaa gaagccccag acttcttata cttcaagtae tttgggcagt 4200
tacgcttcca atgacctatt tgatcacaa agaagcactt ggcatttgcg gccacctttg 4260
gctttgcctt tgectgtggc ttaatagcag tcttagtggc aacttgcttg ccttatctt 4320
gcttttctt gccagcccat tcttcttaa aaccttttc cttttgaac ataagaactt 4380
ccttcttagg tgcaatagtg atgttttgct cggcagtcac gagcatocca tgcaactcag 4440
caagggtttt cgacacocca ttcataatga aattcaatcg aaacgtattg aacctcttat 4500
gaagtgaagt cagaatgatg tcagtagcca actcttggct ataaggaaag cccaacctct 4560
coatggcttc aaaataacca atcatttoga agacatgagt ggcgaccggc ttgccttcaa 4620
ctaacgaaca ctcaagaata gccttgtgag ttcatacct ctctatccga gcttgttggt 4680
gaaacatggt ttcaactgt cggataatgc tataggcatc caagcttgca aacctctttt 4740
gaaggcttgg ttcataagcc gctagcataa ggcaagtaac aattactgac ctttctgcaa 4800
cggccttatg ggctcttttc tcagcatcag tagaggtagt aqttaaaact gggatcggtg 4860
ttcaagaac atctcttoga ccttcggacc taagaacaat tcttagatc ctttcccaat 4920
caagggaagt gtcccgcttc aatttatctt tctcaaggat tgaacgtaag ttaaagggtg 4980
aattattggt gttaccagac atgatatcta catagaagat gcaaaaagta taagtatgtt 5040
tatcataata gcttttaaca aattttaaac actttaaaat aaaagctatg cacttgacca 5100
attttaagt gtcccttttg aatcaagtgg ttctaagatc ctatcaaaaa tgattataa 5160
gtggactttg gccccaactt aaaaccaagt ttaaaaggta agtaaaactcc ttactaatt 5220
acaacaattg taactcttag ttaatgggtg attgctaagg tgattacgct cccaggtaag 5280
gaagttacc acaacgttgg ggagagcctt cctaactcta gacagagcat gtcacccaaa 5340
cacaaaaacc cataaacttt gctacaaaa ccaaaaccgt ttgatgatt ttgttgggcc 5400
aaaccaaact aaacttgcaa atttcggaaa ttactctac ttgcccgaag attgaaagta 5460
atactctgct ttggcagaac ctattactaa cgatcaagtt ttagtaggtg tttatttga 5520
atagcaaaaa ccaatattt tatttaaggg acctaagtaa attattatgt tgatttaatt 5580
gctagtgaac atttaataa ttaaatcaca agcataataa acttagaaag catttaaaag 5640
caatatttaa atgcataaaa ttaaatatga tcttagtatg gccctaaac ctaaagacta 5700
ctctttaaga ctcccttggt gaatcccat ggcctccat ccttgtgctt cataggataa 5760
gattgaatca ccattcttct tattaact tgaataaata tttttgaaa ttataaacta 5820
aaaaattaca aaaaatacca acgatcgta gatcgattt agattacaaa aatacattaa 5880
cgatacgcat atcgattttt ctatccaagt tttgggcat actagtcacc gcattgattc 5940
ataatatcat atatacaaaa acatgcattt taatcaacta ttaaaataaa ttatcatggt 6000
ttaacaaact taacaataa taacaccatg aagatttaat cacacattaa atcctatggt 6060
tggtacctta agacaaaatt taatcatatt agaatttcgt ctacaaaag ctttaaaata 6120
ttaatcacc aaatttaact atattaaact taaagaaaa ttaagcaat tgtaggcacc 6180
acatataatt taatcatatt aaaaacaaa acttaacatg atgactaacc acataaaaag 6240
ggcatgaag aattaatcaa ctattaatac taacaaccta acatgtaatt aacatcataa 6300
aaaaataata atagttaact actccttagt aacccctttt aaatttaact agtcaattat 6360
cacatataat taactaataa aattaaagct cattatttaa ttcaattatg acttaaatat 6420
aaaattaat accattaatt aattatttg caaattggaa tatactcaa aacaagaaaa 6480
agaaagaaaa aaaaaaaaa agcaggctgc caaggcagca gtgtacactg ccacctcagt 6540
gccggccacc tgcgcgacca ccagaaacga ccagaacctg ccaccgctc gctggccacg 6600
gcgaccagca ccggcagcac tgcagcgag gcagcaggcc gcgccaacag cagcgcccag 6660
cgcagggaag tcgcgcgcgc cgagccacca cgacgcgggc cacagtccgg cggcagccca 6720
gccaccatgt cggtcgaatt ccggtggacc ttccccctt ccttttcaat tatcatcaac 6780
ccttgtgcat aattgaatga aagttaaac aaattgattt ggggaaaaaa ttaggggtca 6840
tatcaatttt gttttaaaaa aaamcatgaa ctaacacaaa aaatctgata ttttgtgatg 6900
tgagatttca attttgagta taatatatat ttatatatat acatwaaat ccaattttta 6960
tgtttccaat caattaatat cataatatca attatgcaaa taaattcata tataaagccc 7020
tcccttaatt gaattaaaaa atgaataaaa acatgcatac acatgatcat attaatctat 7080
gcaataggct aactgatacc actgtaggaa cttagatgca taatgcggaa aatcaagtat 7140
caaatacttg tacatctata ccaagatcat tgcataaatt agtatgaatc aaacaatagt 7200

```

```

atagaattat acccttgatg cgtatgttcc tcttgcacc aaacttctag tggagatcac 7260
cttagaacgt caagcgccgt tccctctaatg ttggtccacg aacaacactt ggtaccacc 7320
gtatgctagt acggaagaga gaaaaacact ctcttacttt tgtggtgagg gccgaaaaatg 7380
agtgtgaaaa gactaaggga aaaatcagat ttttccctct agaagtgtga aaagtgtata 7440
tccaccttgg taaccccata tcaatatata aggtgggttac aaaagagggtg tttcatgagg 7500
ctttatttts cctcataatg tcatacatta tgagtctaata aaactcatga gttacaactc 7560
tcccatcca tcatcaaac gcgcaaccca ttccacaaat ggatttggat aaatatccaa 7620
gtgtcattac ttgtgtgacc tcataggact caatgatatt agtagttggc cctaatacata 7680
ttagtccaac aaaccacaat tagcttctag caaacggtg tgatcatcta atattattga 7740
atataattat tccataactt atcctaatat tatttagttt attacacttg atcgaggaca 7800
aaatccctca caaatgcata tgggtttgat tacaataata tacgagtga catttgggta 7860
ttttcaatga tcaaagtaat gaccatcagt gtacattgtg atttatcctt atttacgttg 7920
gttgcggtac ctttttatta ttattattag ctccacctac agttgcatgt acatgcacgt 7980
acctagcatg tacactttgt tgacattcat gtacattaac cygggttaacg ttacaattat 8040
gttgttatgt gttgacctt tgttttaata ctogtattga gttttttttg ttttgtttgt 8100
gtctatatca caaggattgt actttggatg tctattattg ttcatttgtt gttattgaag 8160
attttatggg gggatgtcat tgtgcatttt gattttgtta atgaacaacc acgaagccaa 8220
gaatgtacaa agaaacataa tagaataaaa gtaacccaat tccctaaagct gatgtcaagt 8280
gagtaatttg caatctttgt acactggtgt gttgatgttt gttcgcttat gaaattcaat 8340
atgtacaatt atagtcatat acctcatagt gtcacagggt ccacaaaaaa aactcaatat 8400
gggtattaaa acaaaaggtc aatacataac aacatgattg caaccoagtt aatgtacatg 8460
aatgtcaaca aagtgtacat goaaggtagc tgoatgtaca tgcaactgta tgtggagcta 8520
ataataaaaa aaggtagcgc aaccaacgta aataaggata aatcacaaatg tacactgatg 8580
gtcattactt tgatcactga aaataaggat acattattgt ttgattgaat gttcactgga 8640
tatgaactca tgtacaaata ttctagcaag attgttcaat tattaagcct gaatgtacaa 8700
tgttgttatg actgaatgtt caagttattt tatagagctg actttgttct gtgtacatta 8760

aagttgcggt aatgatcatt gtgtatgact aaatatacat tagcttccact aacatgcgtg 8820
cataacatat tctatagaca caaacaaaac aaaaaaaaaa tcaatatggg tactagatta 8880
aaagggtcaac acataacaac ctgattgtaa cccagttaat gtacatgaat gtcaacaaag 8940
tgtacatgca aggtacgtgc atgtacatgc aactgttagt ggagctaata ataaaaaaaa 9000
ggttccacaa ccaacgtaaa taaggataaa tcacaatgta cactgatggt cattactttg 9060
atcactgaaa ataccocaaat gtacactcgt atattattgt acatcaaac atatgcattt 9120
gttacattaa aaaaagtttt aaaaatgcaa aacagaaaat aaaatcaat atcgacattt 9180
ggaaatttat aatagaaatg aataaaaaata agggagaaaat aaatgaagaa caaaataaat 9240
gagaaagaga attaaaatgg ttcttgaaaa ataaatgaga gagaaaagga gggaaatgagt 9300
gagtgatgag agagaaagag ctggcccact ttcaaaaatt ctgccaaaag cctgccaaat 9360
tttggccctc ctaaaagcat caaaactacg tagtttttggc caaggtgtag gatgctcatc 9420
ctacaccttc gtgcaggatc taaattgccc ttagaaaatg ggtctcctaa tatttctcta 9480
ctagcatttt ttgcacgcga tgcgtgcttg aatttttttc aagatagaaa ctogattttt 9540
ttcgacgtat gtaaaagtca aaattttaaact attagacata caaagtataa ttgttttttag 9600
ttacaaaatt taattggttt agtctctgta acttgagttt ctacacagtc tttttttttt 9660
tttttttttt ttttactttc aaagttaaatt tctatgaaca aaatagaaat tttattgaat 9720
ttatctatga tttctaatat tactccctcc gacccaaaat atagtccca tttccctttt 9780
ttcacggtaa tttatgcata tagaataata gagggatagt aaagattttt tgtttattta 9840
aataaatgtt gtatgggaaa agatgatttt aggagagaaa gttagaata attggtgaaa 9900
gagtattaat tgtaacattt tgggtgaata aacaaaggaa aaacaaaaat tcaagaagca 9960
aataaatgag aattgttttc ttgaataatg caaaagtggg ttttaattcc caaaatatgc 10020
ccaaaaataa aaaaattccc tgtgtaccgt ccacgtaaga cggcacgcga gatttttttt 10080
tccacttca atacaaccgc tacttaaaat agcggtttac tgattttttt ttttatctac 10140
ttaggtaaaa cttggcgctt gagtgatata actcgctact tcaagtacgc atttactgaa 10200
atccccaact ccatagtttg atatgtgctt gcaacatttt gccacggtaa accgctactc 10260
agggtagcgg tttatgtgta taaaccgcta cttaaagtag cggtttattt taatataaac 10320

```

cactattgtg agtagcgggt tacgtgggca aaaacaaaa aaaaaatagt ttctcgctg 10380
 tegtectacy tggacggtac gcagggaatt ttttaatttt tgggcataatt ttgggaacta 10440
 aaacccactt ttgcattatt caaggaaaaa attcaaataa atgatgggac acggtttttc 10500
 tagacaaatt acgaaaaaat gtggaactaa atatgaaat ggaactata ttttgggaca 10560
 cccaaaatgg aatggggaat tatatttttg gacggaggga gtataatttt ttagttgatt 10620
 ttggaactaa gtatactact tcatatattg ttaagaaact ggacacttgg atttcaagtc 10680
 aaatttttgt gagtatgtat tgacgttgta gtgtattggt tgtagtttgt aagttaattt 10740
 ttgtttttgt aaagtttact catttgagtg atttgtataa tgtaattat gcaattctat 10800
 gattttagtt gacttgtgag tgattgttat aattttattt ccattatttt tattggaatc 10860
 tccctttggt ttgtatgtga atttgttaatt tagaaaggca aaggggtaaa atagtctctt 10920
 cattcgggaa caccatagtt cccctccttc ccttatataa taaagatgat gatgattttt 10980
 gataataatg atttgttaagt gaattatgtg aatgtttttg tatgtattga cgtcctagta 11040
 tattagtttt agtttgaag ttaatttttt tgtttttgta aagtttcccg atcatttgag 11100
 tgattttcgt gattttttgt gattttctca attctatgag tgatttgaag agtttcttga 11160
 tataagtgat ttctgagtg tggtgaatta atttcoggtg gctttgttag aacccatttt 11220
 tagtattgac atttcttttg taatttagaa agggaaaggg gggtaaaaaa ggcatttcaa 11280
 aaaaggacac cattgctccc ccttcctctt atgtaattga gatattctaa aagaataccg 11340
 agagtttttt ccataaagg agtatttttt ttaaaatttt ttccataaag gagtatttat 11400
 tagtaccagg ttgatttccc aaatcattat ccttgogcaa attgcataat ggagataatt 11460
 ggtgttgacg tgtgaatatg gggccataat aataggaggt caaaaacaaa actacaaggg 11520
 ttaaaatcgt cacaatatta aacaagcacc tcacattctc actgggtcact tttttttaac 11580
 ctattaaaag aacaaacctt taactctcct cacaatctga caogtgctga atattgattt 11640
 actgagatca atttagatcc tctcccttag actcttctgt ctctcagta cagetttaga 11700
 tctcaacctc catgtcagca aagttacctt acgtgtcacc ctacgtggcc tctccttcta 11760
 cccctcactc ctccacgtca acattttcct ccaaaattaa aaaaatcattt ttttattata 11820
 ttaacttgaa tgtatataat aatgtctact gatcttcttc tttagaacta tctccttctc 11880
 tcatgtgaac ctcaaaatca ttctattttt atttcagaaa aaggaaaaaa aagcacatct 11940
 tttttgaaga ttaattttgt gattattatt gagcttcacc gtattaaaaa acatagtaaa 12000
 agttcttttc tcatttgtct ttttattcat ctaatttttt ttagtgaaga accctaattt 12060
 tgttttgtaa ttctcaagtt caagttttga ttgggtattt ttttttgatg aaatttgtag 12120
 agctgtagga tgttatcgtg ctgagaaaaa ggttttagat ggtaagtttt tttttctttg 12180
 atttctctct cctacttttt tttttgtttt gotttagata atactgtcat gatatgatat 12240
 aaagaattgg tgatttgggt agtttattta acctatgatt atgtgttatt tgttttgatc 12300
 ttccaattta tctggtgctg tgtgtatata tgttttgttt ttcttcaagt atttggttat 12360
 tattgaagtg ggtaattagg aatttgctac taactctatg atttgggttc tgttgtgatt 12420
 aatttactat agatttgagg tttaatttat gttttatagg ttgaaaaagg aaatcaatga 12480
 ttgttttggt gatttgagta gattgtttgt tagtgtgtgt atgatgatat taacttccat 12540
 tattcttccc caaattaggg gtaattgatg gttttttgca taccgaaggc gtattctctt 12600
 tgatgatgga gtgattgttg aaaagacatg atgggttaaa gttgcaggat tatttcattt 12660
 caataaacat aattgatcaa ttggatctg ttgaatgagg ttgattcaca aaaatgaaga 12720
 tgggcccgtt gttgccaagt cgggtggcaga gcttaataaa catatagttg ctgtgaaaaa 12780
 agaaggtagg ggtagggttg caggtgaagg gcaggggctt tccgaggagg acgaactgag 12840
 aattattgag gatgggtgaag atgcaaacag caggcgttct ttgagttctg ttcagcttcc 12900
 agttcatact cacaggcacc agccacaagt acaaccccag gggagagtct gttgggagag 12960
 gtttctcctt gttggatctc ctaaggtttt gctctagaaa agtgaatgact caactcgtca 13020
 tattgttagt gctttgctac ggaaatgtag ctatgaagggt gatttgatct gttttaatcc 13080
 catatatgca atgtctgttc cttatcacct acttcaacaa atgattaaga gaattgtact 13140
 cctcgttccc aaaataatag caacacttag ccttcccgtg gactttaggg agcgttttgt 13200
 tcatattatg gtatgggttt ggaattagga atgaaaccaa ggtggtatgg ggttggaact 13260
 tgatacttaa taccttgat ttggtttcat ttaggaaatga aaaaatttct tttatttgat 13320
 acctagaggt aaggtatgag ccataccacc ctcccccat gggttttctaa acccatatcc 13380
 ttatgggttt gaggtatggg tttaaaattt aaaaataagt taaacaaaaa ctagggtatgt 13440

gttttgttca ttccaaaccc atacctcata cctaaaacta gtgaacccaa caccacctta 13500
 aggatcttgg gacaaaggga atccattact agatctggtg acattaatac ctaagtttac 13560
 atcagtttca cttaaactct tegtttttaa aaaagtaaaa aaacctgta gtctgagtaa 13620
 gtttactaat ttttgttcta aaattcaaca cattatctac atgcaagcac ttactagtac 13680
 aatacaactc aaacaatata tgcactctat ctgttcacaa tgaaccgaaa actaatcttt 13740
 tcataccctt gtttgatgct tttttcaggc catacaaat tctttaacct aaattgcctc 13800
 ctgagtcact gttcaaaatt gcagttttaa catcctcaag accatgtgat gtactgttag 13860
 attatattaa gacctattg taaataaagc atgtatagtg gaataaaatg catgtcttcc 13920
 tacttttttt tgggggtcat gaactcattg ttgatattt tgcagttgta ggggtgccaa 13980
 atggcataga agcatggaaa atcttagaag atttgagcaa tcagattgac ctagttttaa 14040
 ctgaggtagt cacatcagga ctctctggta taggtcttct gtccaagata atgagtcaca 14100
 aaagctgcc aataactcct gtcattagtg agctttcggt ctttgttcta ttagtgtatg 14160
 ttctgtattt gattttcttt ctttgtcat atcttgcctt gtttttaca attatttaga 14220
 ttttagatga aaatgtatac tcaatttatg gtcttagct gcaacatttg attattttgt 14280
 gtgcagtgat gtcactctcat gattcgatgg gtttagtctt aaagtcttta tccaaggcgg 14340
 ctgttgactt tctggtgaag cctataagaa aaaacgaact taaaaccctt tggcagcatg 14400
 tttgaggag gtgtcacagt gtaagtgtct ttacatttcc cagcttccca tcagcttagt 14460
 ggtctgtgta gcagcttttc aaattttoga actttctage acatatgaca aattaaacct 14520
 gcatgctaatt tcccgattag ataatggaat aagctcttcc agctggctct ttacttcttt 14580
 ctcttctctt ctatgaaaa actgggtatgc cactatgcat cttgttccag gtgtttgttt 14640
 agtgtttctt tcttttattc gtttttttgc ttttattttt aattttaatt ttaatttttc 14700
 ctcaattctt ttttagtcta gtggtagtgg aagtgaagc tgtgtaagga atggaanaat 14760
 cataggaagc aagagggctg aagagtcgga caatgacact gacatcaatg aggaagatga 14820
 taacagaagc attgttttac aagctcggga tgggaagtac aatggaagtg ggacccaggt 14880
 agtgctaacc cctgtaatat taaacttctt atagtaggtg tggtaaatgt gacgctgta 14940
 aggccttttg ggtggtgct tctagttcac taaggataat aagaaatagc tcgctattga 15000
 tagtttaggc acctcaatat cactctctct tgtatgtttg ttgaactaca ttttagcca 15060
 gacttgagta ttttatcttg aaggatagaa caggtgcatt tttggttgcg gttgttagtt 15120
 gttactgta tgcaagact attgccacca ttttctcaca catatttaac atggaagtgt 15180
 cctaaccacc cccaaccaca aaaaatggga gggagaaatt actggagatg ggaaagaagt 15240
 tacataaaa gttagtcgtt tgggtcatga ttgtttgttg tatttgcaa gttagcgcgt 15300
 tctctctctg gatgcttcaa aataagctga tgcaccataa agtaccactc ttggcttcac 15360
 ctgttggtgt ggacccaacc aatgtacct tgttgatctc gagatagaca aagaggaagt 15420
 ttaatttctc tttatatgtt atctctcttc aattgttag cagctatgtc tcttctgtg 15480
 acatttagaa cccatgttag gttcatattt atagttaggt gattgtatca aaattgocat 15540
 cacaataaac agaacattaa tttctatttg gaaggattca aggatcaaat atacaggaag 15600
 gagcagtgta ggagatatca tcttggtgaa caacaaaaga aacattaaca tcaactgggt 15660
 ataactcttg caagattgga tgacaaaatg aggagtcgat ctaataataa acaaatggg 15720
 aactgtcagc tatatctctc atatcaagaa tggagacctt taagaaaagt aagaccattt 15780
 tttgttggga agtcaagcca ttgtccaggt ttccttgtga aatttagttc atcttagctt 15840
 tctttacca acatgaattc tctttccttt cagcccttgc aaacttggtt ttatgctaatt 15900
 tatoagtgtt tctttcattt agtacgtga gagggtttat ttggttgatc aaagaatact 15960
 tgatgacctt gaggtagatg ctctacatgg agaagttcct ctaagtgtac aaagaatcta 16020
 gttcgaccaa ctttgattta ggaagagata acacgatcac ctctgggtct agactctgga 16080
 gaggtcaaag tgtcaaaaag ggtatttttg aaagacaatg gcttggtgat tcatgactga 16140
 aattggatgg tctgactga gcataacta ttagtgggtc tcttctaagg tgatataagt 16200
 atgtgataac ccaatcctgt atatttcttc gaggacatca attgtgtac tattctaggg 16260
 tgctggagac ccatacatat agagccattg acaatttaaca caaactcaa ccacttattt 16320
 ttatttcatt taagctatca atccctaaga aagagcccat ccaagctcct gctttaggtg 16380
 catccctctc cttttcagct agtgacaaa aaatgaactt tcgagataga ctgctaaatt 16440
 tgotttgtca agaagacaaa attttgatac acaactgtaa ttgcatttta tgacacttac 16500
 gctgatatat ctgcaagtga agttgatatg caaaaactat gtgcctcctc tegtctacgg 16560

```

taatagatct ccgtcaatgt gatgcttgtg tgccatcata aaatgatat gggtcttttag 16620
actctgttac tctacagctg aaggatctta gcttggcat ttatactctt ttatccaaa 16680
agttaaaaaa agcggaccgt ttgacccatg taaggaaaaa ggaagggaat cgagaaaagc 16740
aaaggagggg aaagaagtta aatctcctaa aaagcttgtt ttgtcgggtg agagaggggag 16800
cgacttgaaa ttgccattga tgatgattgg ttccaatgt taatcgaaat caaactcact 16860
ctctctctct ctctctctct tatcaccccc ctcaaacctat aacatcacag tcttttaaac 16920
gtgactgttt cgggggatag tgactggtag ggaaggcga gggtcgggtc tggctggacc 16980
ctagaccccg accctaattt tttttgttag acccaaaccc ggaccttaag ggtctgaaaa 17040
aattggacct tgaccagac ccttaggggtc tgaagggtct agagggtcag gaggggtccag 17100
gcttaaaatt tttattttgc caaattttta gcattattaa tatcaataat catttgaat 17160
tcgcatgaaa caaacacaaa aaaaaatcgc atgaatcaaa cacaaaaatt cgcattgaac 17220
aaacactaac atataaattg aaaaaacga aacaaacaca aactataaa cgaaaaaaat 17280
tgaaccaa acaatccca acatataaac tgaaaaaaaa aacgaaacaa acacaatat 17340
acaaactgaa aaaaagaaga aacaaacaca acttacataa gagttcagaa tgggtgttat 17400
agtttatgtt ttatgtcatt agaaaatcaa ttgttttttt ttttaaagtt aaaatgtata 17460
tattaaataa gttaggggtc taagggtgtg gaacatttat agggtaatgg gtttgaact 17520
catatgggta tgtactagaa gaggaggagg tctagtatgc aaaaggtag agtgcacaa 17580
gtggtaacaa cgcgcattgt tataccaatg tcgcgagtcg cgacaggcgt cgcgggtcgc 17640
gaccagcgcc tcgcgagctt ctctgcattg cgcgacgctt ctctgcctt ggaatcgaa 17700
aaaaatgccc ggcggtttta tatccgttgt gatgctttgt tgatcatttt aatgactttt 17760
aaggctcttt aatcagtaga ttaaaggcct ttgatgagtg attaatgg gggttatgtg 17820
attaacctct ctagtcaatg aaatgttgat tatgttata taacctttgg attcctatga 17880
gtgaggagtt agaagaaaat cagaattttc tatactctct caaaagtctt ctgtcttagc 17940
ttaagagaaa ccttgcaatc ttctcttgag tgtctctcac aaacacaaaa cacaagtctt 18000
tgttgattca cttagaagat catctaagtg gattgtttct ctccattgta tctcattagt 18060
tatttcgtgt taaccgggtg atcctagagg ggcgaatta aactaattgg aaagcgtagt 18120
ttcctgtcct tggagtggga tatccggttc tctcattgat cacaagccta acataagggt 18180
cgggtctggg tccaaatttt aagaccogga ccgcgacct aaaaaattca cttggacca 18240
gaccggacc cggaacttta gggtctgaaa aagttggacc caaacctta aattagggtc 18300
gggtccaaa gggtccgggt agggctttgg acccatgccc atccctagtg attgggtagc 18360
ccattgcaga atattgagaa cgcaatataa aggggtgttg agaaagaggg ttttgagtgt 18420
attgtttaag aaagtggga aaggaatgag agatgaagta cagaagaaaa cgtctagaaa 18480
gtgaagcatg ggagtctgtt tcttttctt ttctaaaagt ttccaccaa atgtccctta 18540
agtggttcag ccacgccttt ggacaagctt accaccaagc tcccacccc agatcatatt 18600
tgaatcaaac atctttcttt ttttagaata ttcttttttt gtgcattgaa gccaatcca 18660
tgagatatgt acctatatt tctctaaaat atataataa ttgatgaagc aattttcaga 18720
tcattagata agcgttctac aaaagaacca tctttttttg ctctctgtg tacttgaaa 18780
atgtagtccc catatataat ttaccatgg cagtacttct atagaccact aagtcttcg 18840
cttgtcaac ctatagtcca tttaagaggg tttaggtata gacagccttc actttcaatt 18900
ggttagagtc taccocagt atcactgaca gaattttcaa taggaacttc tgtcataact 18960
taattcgag aaagcactaa ctaacaacc ccttagttct ttagttaagc gcttgattgg 19020
tcacatccag cttttagttt ttagtatgga gattataaa gtagtatgac ttgagttgaa 19080
tagtgaacgt aagattagac atatttatat agtcgtgtta attttgaaa ctgacaggag 19140
tgactagaaa ccactttttt tgtgtccaaa atttccatat attgtttttt aaaaaaactg 19200
ctaaatcag atgatacaa acaaacctta cacagggtacc ggaatgatat tgaaacaaat 19260
tgagggtagt gataagccat aatcccttac cttgaaattc agaggctgtc tgtgcagtc 19320
tctatcatct tcttatttca ctaaatcaat tattaccctg ttcaacctca acggtccgag 19380
gcttagacat tgtgtctttg atagtatcat cacagctgaa aattaatgtg tactttcttc 19440
tatttaataa ccatttgaga gtgccttttg tagtcattat gaatgtcgtg agatcacaat 19500
ccgtgaaata tagttttcat cacattctta cctgcattgt taaggaaaag tatagcgtta 19560
gtgttcaatc tttgtcact tctgggtgact ggtcaatggt caaagtatgc agcatgattt 19620
tgtgtttgtc agtttcttct ttaataaagt gtgaactgct ctagtctaag ttgtcgaac 19680

```

tcttaaaaag tgttggaactt gttagtgtgt acatgtatac aatgttgatt ggggtgggctt 19740
 ttccatatat tattatattt gttgaatcac aatgaagtac ctatttccat ttgaggagta 19800
 ggtatgatga ggttagtagg gagtttgagt gttaaaggtt atgtgaagat gtaaaaatc 19860
 actgacaatg agaccttagt atccgacggt cggaaattta ccaattttat tgccttgta 19920
 ccttctcatt ttacttagt atttcccttt cataaatttt tgtgatctag agttccatgga 19980
 caaaaagggc tgcagaagtt gagagccccc aaccacagtc tacatgggag caagcaactg 20040
 atccacctga tagcacttgt gctcaggcca tttatccaat gtctgaggca ttgcccagca 20100
 gctggatgcc tggatccatg caggaacttg atggacagga tcatcaatat ggtatgtggt 20160
 actgtatttg atagaagtta caataatgtg taacctgaaa ccacttaatg acctagtatc 20220
 catctgtatc agacaatgtc ccaatgggaa aggatttgga gattggagta cctagaattt 20280
 cagattccag gctaaatgga ccaaacaaaa cggttaagtt agcaactact gctgaggaaa 20340
 accaatatc acagttagac ctcaaccagg aaaatgatgg tcgaagtttt gatgaagaga 20400
 acctggagat gaataatgat aaacctaaaa gtgagtggat taaacaggct atgaactcac 20460
 caggaaaagt tgaagaacat cgtagaggaa ataaagtatc tgatgcacca cccgaaattt 20520
 ccaaaaataa ggacaaaggc atgcaacatg tcgaggatat gccttctctt gtgctcagtc 20580
 tgaagagggt gggtgatatt gcagacacga gcactaatgt ctgagaccag aatattgttg 20640
 ggcgttcaga gctttcagcc ttcaccaggt atgctagaga aggtgaaact tgaatttata 20700
 taatggacaa gtggacaata tctcatTTTT aaattgttc aggtacaatt caggcacac 20760
 tggtaaccag ggtcaaacag gtaatgttgg cagttgtctt ccaccaata atagttcaga 20820
 agcagcaaag cagtcaccatt ttgatgtctc acatcaaat tcgaatagca gtagtaacaa 20880
 taacaatag ggctctacta ctaataagtt cttcaaaaag cctgctatgg acattgataa 20940
 gacacctgca aaatcaacag tcaactgttc tcatcatcca catgtgtttg agccagtcca 21000
 aagttcccat atgtotaata ataaccttac tgcactctgg aagcctgggt ttggtccgt 21060
 aaatggtatg ctgcaagaaa acgtaccagt aaatgtgttt ctgccgcaag aaaataacgt 21120
 ggatcagcag ctcaagattc agcaccacca tcaactccat cactacgatg tccatagtgt 21180
 acagcagcta ccaaagggtt ctgttcaaca taatatgccc aaaagcaagg atgtgacagc 21240

 acccccacag tgtgggtctt caaacacttg tagatcgcca attgaagcaa atgttgccaa 21300
 ttgcagtttg aatggaagtg gtatgggaag caatcatggg agcaatttcc ttaatggaag 21360
 tagtgctgct gtgaatgttg aaggacaaa catggtcaat gatagtggga tagctgcaaa 21420
 agatgggtct gaaaatggaa gtggtagtgg aagtggaaat ggtagtggta gtggtgttg 21480
 tgtggatcaa agtcgatcag ctcaacgaga agctgccttg aataaattcc gtctcaagcg 21540
 taaagaaaga tgccttgaca aaaaggtaat actccaaatt ctctccagaa tgttttact 21600
 tggacatcta gtatgtacat ccttgaatct aaactgtaaa agctgaattt cagaataaaa 21660
 aacacaaatt atatcaagta tgaaggcaga gtatgtagt aattatagtt tttctggtat 21720
 ggaattagta cttacattta ccagaagcct gctgcacaa gccataattt gatcatcaag 21780
 caacaataat ttggccattt cttgottgta ttgaaagtga gatgacttca aacttatttg 21840
 tgtatcatca catcagggtc gatatcaaa cagaaagaag ttagcagatc aaagacctcg 21900
 tghtcgtggg caattcgtgc gccaggtagg agaaaacaaa ggaagggaata ccgatagcta 21960
 acaccaatc tttccacaag ttgctgccaa gatcatttat gccactctga tgtcagctgt 22020
 cttcatatgt acaaatctcg aattttatgt gtgcatgagg tgcataaac tgtcaaacct 22080
 cagtgtattc gtttggttta ggctgtagaa agacatcttt tccttctgtt tttcatggtt 22140
 cttattttga gctgtgttca ctacttttta taacatggta gcccttggtt gccttggaa 22200
 ataagctttt ccttaagggt gtgatgcata taacttbtgt tgggtgttaga ttatatgac 22260
 atttcttcag gcgtttacgy gtcacatttt ccggaatcct ttcaaacgcy attccgga 22320
 caatggctca tattttcttt tggtttcaag gagaaggcta tttaaacag aaaagattta 22380
 ggttacagaa atcagtgatg aagcaatgag ttctattata gaataggtag aagtagggg 22440
 tgttttttcc gtactcttga gatagaaagt ggggatagat tcttggact cgtcagaaag 22500
 gaataatata gttgtctacc tttttcattt ttagttcttg taggagtttt atbccacttc 22560
 catttttgta aaatttagga gttgtaagga cgtgtaaaaga gaactcgcca tccagatttt 22620
 aaccgacggt aaatttggtc ttttcattgt ttctcaagta actataatgt tttcatcgaa 22680
 tctataggga ttttctaag tgtacctgat agaggcacac agtaacaata atataagtac 22740
 atatattctt taagaataat gacatagtaa ttatatTTTT aatacaata aaagatgtcc 22800

ttatgtaatg aaacaaataa cttttccttg aaggatgccc ataattaatt accttatttt 22860
 gaagatattt tataatttagt ttgggtagtg gaactactaa ataaaaatat gggtatagta 22920
 acatgtactc atgtgcgaac cgaaaaaaac cctatgcttt ctctaaaagt tcccaaaccc 22980
 ttgagcttat agccccgacg gccacgcgca ggcttgctgg agcgcccgct cgctcaccct 23040
 gtgcgcgacg agcctgcacg tcgtatcgtt cggctctctg aaggtttagt ttccctgtt 23100
 cctctttgtg ttattcatcg ttcccatccc ccattgtctc ccttcccctg tcagtgggtg 23160
 tcggcctccc cttcccctat taatgggttg cggcctcccc ttccctttcc cctaatagtg 23220
 gttgttggtc tcccctccc ctttcatgtt gtcaagttgt tecttcccc gttctccct 23280
 ttctagtc cccttttgggtg ttcttgtgtg tgttagttta gtggctttgg ttgggttagtt 23340
 cggctgagtg cttcgtcgtc gtatgccctt ccttgctccc ctatttgggt ttggttatgt 23400
 tggggttttg gttaaccccc ttcccatgct taaacgtggg agggcctcag gatttagata 23460
 taaaggctcat cattctcgcg cttagacgtg agagggatta agtgttcagg gataagggt 23520
 ccgttctcgc gcttaaacgt gggagaactt aaagggtcta ggttttacag gagttttggg 23580
 attggaagt atatgaactc tgtttggcag aagatgacag tgcaatgtgg ggattaatca 23640
 tttcgttttc ttccttttta ataagttagt ctcttattat gagagttttc tattagtct 23700
 aatccccctta atttcttgta ggggttgtaa gtctagtttg tcgttgttta gtatatctag 23760
 ttcgagaagc tcgaagttt gaggttggtg aaaaatgtac ttactggtg cagatcaaga 23820
 atattaagac gaatgtttga ctccaattta ctattgcac aggtaggaaa tatggtgagt 23880
 catcgaatat ccattatggt tggaatagta ccatactcag gaagcgggtt cgaagcgtgt 23940
 atattagtaa aatagatgaa gatattcaaa tcgatgtttt agattatctt ttatgtacgt 24000
 aagggtcatt attgtgttag atgtgtgatg gttttttaat ttaatgataa tttttcccta 24060
 ttcccactta aaagtaaca atgcattcat gtgcacatat tagtacatat atttgtatat 24120
 acatctcg 24128

 <210> 52
 <211> 2367
 <212> DHK
 <213> Beta vulgaris

 <400> 52
 atgaggttga ttcacaaaaa tgaagatggg ccgggtgttg ccaagtccgt ggcagagctt 60

 aatcaacata tagttgctgt gaaaaaagaa ggtaggggta gggttgcagg tgaagggcag 120
 gggctttccg aggaggacga actgagaatt attgaggatg gtgaagatgc aaacagcagg 180
 cgttctttga gttctgttca gcttccagtt catactcaca ggcatcagcc acaagtacaa 240
 ccccagggga gagtctgttg ggagaggttt ctccctgttg gatctcctaa ggttttgcct 300
 gtagaaagt atgactcaac tcgtcatatt gttagtgcct tgctacggaa atgtagctat 360
 gaagtgttag gggatgcaaa tggcatagaa gcatggaaaa tcttagaaga tttgagcaat 420
 cagattgacc tagttttaac tgaggtagtc acatcaggac tctctggtat aggtcttctg 480
 tccaagataa tgagtcacaa aagctgccag aatactcctg tcattatgat gtcattctcat 540
 gattcgatgg gtttagctt aaagtgtta tccaaggcgc ctgttgactt tctggtgaag 600
 cctataagaa aaacgaact taanaacctt tggcagcatg tttggaggag gtgtccaggt 660
 tctagtggta gtggaagtga aagctgtgta aggaatggaa aatccatagg aagcaagagg 720
 gctgaagagt cggacaatga cactgacatc aatgagggaag atgataacag aagcatttgt 780
 ttacaagctc gggatggaag tgacaatgga agtgggaccc agagttcatg gacaaaaagg 840
 gctgcagaag ttgagagccc ccaaccacag tctacatggg agcaagcaac tgatccacct 900
 gatagcatt gtgctcaggt catatatcca atgtctgagg catttgccag cagctggatg 960
 cctggatcca tgcaggaact tgatggacag gatcatcaat atgacaatgt cccaatggga 1020
 aaggatttgg agattggagt acctagaatt tcagattcac ggctaaatgg accaaacaaa 1080
 acggttaagt tagcaactac tgcagaggaa aaccaatatt cacagttaga cctcaaccag 1140
 gaaaaatg atgcaagttt tgatgaagag aacctggaga tgaataatga taaacctaaa 1200
 agtgagtgga ttaaacaggc tatgaactca ccaggaaaag ttgaagaaca tcgtagagga 1260
 aataaagtat ctgatgcacc acccgaaatt tccaaaataa aggacaaaagg catgcaacat 1320
 gtgcagata tgccttctct tgtgtcaggt ctgaagaggt tgggtgatat tgcagacacg 1380
 agcactaatg tctcagaaca gaatatgtt gggcgttcag agctttcagc cttcaccagg 1440
 tacaattcag gcacaaactg taaccagggt caaacaggta atgttgccag ttgctctcca 1500

```

cacaataata gttcagaagc agcaaaagcag tcccattttg atgctccaca tcaaatttcg 1560
aatagcagta gtaacaataa caatatgggc tctactacta ataagttctt caaaaagcct 1620
gctatggaca ttgataagac acctgcaaaa tcaacagtc aactgtttca tcattcacat 1680
gtgtttgagc cagtgcaaa gttcccatatg tctaataata accttactgc atctggtaag 1740
cctgggtgtg gctccgtaaa tgggtatgctg caagaaaagc taccagtaaa tgctgtttcg 1800
ccgcaagaaa ataacgtgga tcagcagctc aagattcagc accaccatca ctaccatcat 1860
tacgatgtcc atagtgtaca gcagctacca aaggttttcg ttaacataa tatgcccaaa 1920
agcaaggatg tgacagcacc cccacagtggt gggctttcaa acactttag atcgccaatt 1980
gaagcaaatg ttgccaattg cagtttgaat ggaagtggta gtggaagcaa tcatgggagc 2040
aatttcctta atggaagtag tgctgctgtg aatgttgaag gaacaaacat ggtcaatgat 2100
agtgggatag ctgcaaaaga tgggtgctgaa aatggaagtg gtatgggaag tggaaagtgt 2160
agtgttagtg gtgttggtgt ggaatcaagt cgatcagctc aacgagaagc tgccttgat 2220
aaattccgct tcaagcgtaa agaaagatgc tttagacaaa aggtgcgata tcaaagcaga 2280
aagaagttag cagatcaaa gacctgtgtt cgtgggcaat tcgtgcgcca ggtacgagaa 2340
aacaaggaaa ggaataccga tagctaa 2367

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотид, включая его информативные фрагменты, который (1) генетически сцеплен с или принадлежит гену стрелкования (В гену) в геноме сахарной свеклы, (2) может быть использован в качестве маркеров для картирования, идентификации и/или обнаружения В гена сахарной свеклы и (3) получен из области геномной ДНК, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 51, где указанный полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, содержит:

а) нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, включающей последовательности SEQ ID NO: 1, 5 или 52 и аллельные варианты этих последовательностей, которые ассоциированы с однолетним типом развития сахарной свеклы; или

б) нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, включающей последовательности SEQ ID NO: 1, 5 или 52 и аллельные варианты этих последовательностей, которые ассоциированы с однолетним типом развития сахарной свеклы.

2. Полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, по п.1, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, которая имеет G в положении 3695, C в положении 3827, T в положении 3954, T в положении 5284, G в положении 5714, G в положении 10954, T в положении 11043, C в положении 11143, C в положении 11150, A в положении 11220, C в положении 11238, A в положении 11299, A в положении 11391, G в положении 12053, G в положении 12086, T в положении 12127, A в положении 12193, G в положении 12337 и G в положении 12837 и представляет собой аллель 1, ассоциированный с однолетним типом развития сахарной свеклы.

3. Полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, по п.1, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, которая имеет T в положении 3695, C в положении 3827, T в положении 3954, T в положении 5284, G в положении 5714, G в положении 10954, T в положении 11043, C в положении 11143, C в положении 11150, A в положении 11220, A в положении 11238, T в положении 11299, A в положении 11391, G в положении 12053, G в положении 12086, T в положении 12127, G в положении 12193, G в положении 12337 и G в положении 12837 и представляет собой аллель 2, ассоциированный с однолетним типом развития сахарной свеклы.

4. Полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, по п.1, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, которая имеет G в положении 3695, C в положении 3827, T в положении 3954, T в положении 5284, G в положении 5714, G в положении 10954, G в положении 11043, T в положении 11143, C в положении 11150, A в положении 11220, C в положении 11238, T в положении 11299, A в положении 11391, G в положении 12053, G в положении 12086, T в положении 12127, G в положении 12193, G в положении 12337 и G в положении 12837 и представляет собой аллель 3, ассоциированный с однолетним типом развития.

5. Полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, по п.1, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, которая имеет G в положении 3695, C в положении 3827, T в положении 3954, T в положении 5284, G в положении 5714, G в положении 10954, T в положении 11043, C в положении 11143, T в положении 11150, A в положении 11220, C в положении 11238, T в положении 11299, A в положении 11391, G в положении 12053, G в положении 12086, T в положении 12127, A в положении 12193, G в положении 12337 и G в положении 12837 и представляет собой аллель 4, ассоциированный с однолетним типом развития сахарной свеклы.

6. Полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, по п.1, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, которая имеет G в положении 3695, C в положении 3827, T в положении 3954, T в положении 5284, G в положении 5714, G в положении 10954, T в положении 11043, C в поло-

жении 11143, С в положении 11150, А в положении 11220, С в положении 11238, Т в положении 11299, А в положении 11391, G в положении 12053, А в положении 12086, Т в положении 12127, А в положении 12193, А в положении 12337 и G в положении 12837 и представляет собой аллель 5, ассоциированный с однолетним типом развития сахарной свеклы.

7. Полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, по п.1, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, которая имеет G в положении 3695, С в положении 3827, Т в положении 3954, Т в положении 5284, G в положении 5714, G в положении 10954, Т в положении 11043, С в положении 11143, С в положении 11150, А в положении 11220, С в положении 11238, Т в положении 11299, А в положении 11391, G в положении 12053, G в положении 12086, Т в положении 12127, А в положении 12193, А в положении 12337 и G в положении 12837 и представляет собой аллель 6, ассоциированный с однолетним типом развития сахарной свеклы.

8. Полинуклеотид, включая его информативный фрагмент, по п.1, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, которая имеет G в положении 3695, А в положении 3827, А в положении 3954, С в положении 5284, Т в положении 5714, А в положении 10954, G в положении 11043, С в положении 11143, С в положении 11150, С в положении 11220, С в положении 11238, Т в положении 11299, G в положении 11391, А в положении 12053, G в положении 12086, С в положении 12127, G в положении 12193, G в положении 12337 и А в положении 12837 и представляет собой аллель 7, ассоциированный с двулетним типом развития сахарной свеклы.

9. Полинуклеотидный SNP маркер, полученный на основе полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 51 или ее информативного фрагмента, содержащий один или несколько полиморфизмов, выбранных из группы полиморфизмов в нуклеотидных положениях № 87, 160, 406, 3827, 3954, 5284, 5714, 10954, 11220, 11391, 12053, 12127 и 12837 SEQ ID NO: 5, где эти полиморфизмы раскрыты в табл. 1 и 5 описания и являются диагностическими для В-аллеля в В-локусе сахарной свеклы и позволяют различать характерный для однолетнего или двулетнего типа развития генотип или различные гаплотипы в группах растений сахарной свеклы, имеющих характерный для двулетнего или однолетнего типа развития генотип.

10. Пара праймеров, состоящая из "прямого" праймера и "обратного" праймера, где праймеры (1) ренатурируются с нуклеотидной последовательностью в В гене сахарной свеклы с последовательностью SEQ ID NO: 51 и (2) амплифицируют его информативный фрагмент в ПЦР-реакции, где продукт амплификации является диагностическим для В-аллеля в В-локусе и позволяет различать растения, имеющие характерный для однолетнего или двулетнего типа развития генотип или различные гаплотипы в группах растений сахарной свеклы, имеющих характерный для двулетнего или однолетнего типа развития генотип, где указанная пара праймеров выбрана из группы пары праймеров, состоящей из:

а) "прямого" праймера PRR7-F, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 7, и "обратного" праймера PRR7-R, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 8, для амплификации фрагмента, содержащего C/T SNP, соответствующего положению № 87 в SNP SEQ ID NO: 5; где наличие Т в нуклеотидной последовательности продукта амплификации в положении, которое соответствует положению № 87 в SEQ ID NO: 5, указывает на то, что в качестве матрицы была использована геномная ДНК однолетней линии сахарной свеклы, в то время как наличие С в нуклеотидной последовательности продукта амплификации в положении, которое соответствует положению № 87 в SEQ ID NO: 5, указывает на то, что в качестве матрицы была использована геномная ДНК двулетней линии сахарной свеклы;

б) "прямого" праймера PRR7-F, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 7, и "обратного" праймера PRR7-R, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 8, для амплификации фрагмента, содержащего C/T SNP, соответствующего положению № 160 в SNP SEQ ID NO: 5; где наличие Т в нуклеотидной последовательности продукта амплификации в положении, которое соответствует положению № 160 в SEQ ID NO: 5, указывает на то, что в качестве матрицы была использована геномная ДНК однолетней линии сахарной свеклы, в то время как наличие С в нуклеотидной последовательности продукта амплификации в положении, которое соответствует положению № 160 в SEQ ID NO: 5, указывает на то, что в качестве матрицы была использована геномная ДНК двулетней линии сахарной свеклы;

в) "прямого" праймера PRR7-F, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 7, и "обратного" праймера PRR7-R, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 8, для амплификации фрагмента, содержащего A/G SNP, соответствующего положению № 406 в SNP SEQ ID NO: 5; где наличие G в нуклеотидной последовательности продукта амплификации в положении, которое соответствует положению № 406 в SEQ ID NO: 5, указывает на то, что в качестве матрицы была использована геномная ДНК однолетней линии сахарной свеклы, в то время как наличие А в нуклеотидной последовательности продукта амплификации в положении, которое соответствует положению № 406 в SEQ ID NO: 5, указывает на то, что в качестве матрицы была использована геномная ДНК двулетней линии сахарной свеклы;

г) "прямого" праймера F3806, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 27, и "обратного" праймера R3807, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 28, для амплифика-

ф) "прямого" праймера F3768, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 21, и "обратного" праймера R3769, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 22, для амплификации фрагмента, содержащего T/G SNP, соответствующего положению № 5714 в SNP SEQ ID NO: 5; где наличие G в нуклеотидной последовательности продукта амплификации в положении, которое соответствует положению № 5714 в SEQ ID NO: 5, указывает на то, что в качестве матрицы была использована геномная ДНК однолетней линии сахарной свеклы, в то время как наличие T в нуклеотидной последовательности продукта амплификации в положении, которое соответствует положению № 5714 в SEQ ID NO: 5, указывает на то, что в качестве матрицы была использована геномная ДНК двулетней линии сахарной свеклы;

h) "прямого" праймера F3859, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 39, и "обратного" праймера R3860, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 40, для амплификации фрагмента, содержащего G/A SNP, соответствующего положению № 11391 в SNP SEQ ID NO: 5; где наличие А в нуклеотидной последовательности продукта амплификации в положении, которое соответствует положению № 11391 в SEQ ID NO: 5, указывает на то, что в качестве матрицы была использована геномная ДНК однолетней линии сахарной свеклы, в то время как наличие G в нуклеотидной последовательности продукта амплификации в положении, которое соответствует положению № 11391 в SEQ ID NO: 5, указывает на то, что в качестве матрицы была использована геномная ДНК двулетней линии сахарной свеклы;

ж) "прямого" праймера F3861, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 41, и "обратного" праймера R3862, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 42, для амплификации фрагмента, содержащего C/T SNP, соответствующего положению № 12127 в SNP SEQ ID NO: 5; где наличие Т в нуклеотидной последовательности продукта амплификации в положении, которое соответствует положению № 12127 в SEQ ID NO: 5, указывает на то, что в качестве матрицы была использована геномная ДНК однолетней линии сахарной свеклы, в то время как наличие С в нуклеотидной последовательности продукта амплификации в положении, которое соответствует положению № 12127 в SEQ ID NO: 5, указывает на то, что в качестве матрицы была использована геномная ДНК двулетней линии сахарной свеклы;

- 65 -

ратного" праймера F3809, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 30, которые обеспечивают получение продукта амплификации размером 0,6 т.п.н., когда в качестве матрицы применяют геномную ДНК из двулетних линий, но не обеспечивают получение продукта амплификации в случае, когда в качестве матрицы применяют геномную ДНК из однолетних линий;

л) "прямого" праймера F3855, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 35, и "обратного" праймера F3809, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 30, которые обеспечивают получение продукта амплификации размером 1,0 т.п.н., когда в качестве матрицы применяют геномную ДНК из двулетних линий, но не обеспечивают получение продукта амплификации в случае, когда в качестве матрицы применяют геномную ДНК из однолетних линий; и

м) "прямого" праймера F3855, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 35, и "обратного" праймера F3856, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 36, которые обеспечивают получение продукта амплификации размером 0,8 т.п.н.; когда в качестве матрицы применяют геномную ДНК из двулетних линий, но не обеспечивают получение продукта амплификации в случае, когда в качестве матрицы применяют геномную ДНК из однолетних линий.

11. Набор полинуклеотидных зондов для использования в анализе аллельной дискриминации для выявления полиморфизмов в В гене генома сахарной свеклы с целью различения однолетних и двулетних растений сахарной свеклы, содержащий два различных молекулярных зонда, которые комплементарны подобласти нуклеотидной последовательности В гена сахарной свеклы SEQ ID NO: 51, где последовательности указанных двух полинуклеотидных зондов частично перекрываются и отличаются одним нуклеотидом в перекрывающейся области, который представлен полиморфным сайтом в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 515 гена, где первый полинуклеотидный зонд мечен первым флуоресцентным красителем и представляет один аллель и где второй полинуклеотидный зонд мечен вторым флуоресцентным красителем, который не идентичен первому красителю, и представляет второй аллель, где указанный набор полинуклеотидных зондов выбран из:

а) набора полинуклеотидных зондов, состоящего из первого полинуклеотидного зонда, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9, и второго полинуклеотидного зонда, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10; и

б) набора полинуклеотидных зондов, состоящего из первого нуклеотидного зонда, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 47, и второго полинуклеотидного зонда, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 48.

12. Применение пары праймеров по п.10 в анализе аллельной дискриминации для выявления полиморфизмов в В гене генома сахарной свеклы с целью различения однолетних и двулетних растений сахарной свеклы.

13. Способ выявления отсутствия или присутствия аллеля сахарной свеклы, ассоциированного с однолетним типом развития сахарной свеклы, включающий:

а) отбор образца генома растения сахарной свеклы, подлежащего анализу,

б) анализ в указанном образце интронной последовательности гена В, которая является комплементарной соответствующей области последовательности SEQ ID NO: 51, причем указанный анализ осуществляют с помощью ПЦР-реакции с использованием "прямого" и "обратного" праймера, при осуществлении которого фланкируют подобласть последовательности SEQ ID NO: 51, которая содержит полиморфизм, выбранный из группы полиморфизмов в нуклеотидных положениях № 87, 160, 406, 3827, 3954, 5284, 5714, 10954, 11220, 11391, 12053, 12127 и 12837 SEQ ID NO: 5, раскрытых в табл. 1 и 5 описания, и

в) сравнение проанализированной последовательности, полученной на стадии (б), с последовательностью SEQ ID NO: 4 или с SEQ ID NO: 5, которые являются последовательностями аллеля, ассоциированного с двулетним типом развития сахарной свеклы, или с последовательностью SEQ ID NO: 3, которая является последовательностью аллеля, который ассоциирован с однолетним типом развития сахарной свеклы.

14. Способ выявления отсутствия или присутствия аллеля, ассоциированного с однолетним типом развития сахарной свеклы, включающий:

а) отбор образца генома растения сахарной свеклы, подлежащего анализу,

б) секвенирование нуклеотидной последовательности интронной области гена В сахарной свеклы, полученной из генома сахарной свеклы путем ПЦР-амплификации с использованием "прямого" праймера PRR7-F, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 7, и "обратного" праймера PRR7-R, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 8, и

в) сравнение секвенированной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 4, которая является последовательностью аллеля, ассоциированного с двулетним типом развития сахарной свеклы, или с последовательностью SEQ ID NO: 3, которая является последовательностью аллеля, ассоциированного с однолетним типом развития сахарной свеклы соответственно, где присутствие тимина в положении, соответствующем положению 87 SEQ ID NO: 5, и/или присутствие тимина в положении, соответствующем положению 160 SEQ ID NO: 5, и/или присутствие гуанина в положении, соответствующем положению 406 SEQ ID NO: 5, указывает на присутствие аллеля, ассоциированного с однолетним типом развития сахарной свеклы, и где присутствие цитозина в положении, соответствующем положению 87

SEQ ID NO: 5, и/или присутствие цитозина в положении, соответствующем положению 160 SEQ ID NO: 5, и/или присутствие аденина в положении, соответствующем положению 406 SEQ ID NO: 5, указывает на присутствие аллеля, связанного с двулетним типом развития сахарной свеклы.

15. Способ по п.14, в котором интронная область имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2.

16. Способ выявления загрязнения характерным для однолетнего типа развития генотипом предназначенных для продажи семян сахарной свеклы, где этот способ включает применение полинуклеотида по любому из пп.1-8 или его информативных фрагментов в качестве маркера в способе выявления отсутствия или присутствия аллеля, ассоциированного с признаком однолетности у растения сахарной свеклы по любому из пп.13-15.

17. Применение полинуклеотида по одному из пп.1-8 в качестве молекулярного маркера для выявления отсутствия или присутствия аллеля, ассоциированного с признаком однолетности в геноме сахарной свеклы.

18. Способ выявления отсутствия или присутствия аллеля, ассоциированного с однолетним типом сахарной свеклы, включающий:

- а) отбор образца генома растения сахарной свеклы, подлежащий анализу,
- б) амплификацию фрагмента ДНК из этого образца с помощью пары праймеров, которые комплементарны и связываются с промоторной областью гена В с последовательностью SEQ ID NO: 51, и
- в) сравнение амплифицированной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 4, которая является последовательностью аллеля, ассоциированного с двулетним типом развития сахарной свеклы.

и где присутствие цитозина в положении, соответствующем положению 87 SEQ ID NO: 5, и/или присутствие цитозина в положении, соответствующем положению 160 SEQ ID NO: 5, и/или присутствие аденина в положении, соответствующем положению 406 SEQ ID NO: 5, указывает на присутствие аллеля, ассоциированного с двулетним типом развития сахарной свеклы.

Bc (12H4 A)	2	[75].VLS	RS. (3)	DLIAVWADIVSSEFGTGEQA. (3)	113
Bv (CV301305)	1	MMS	SHD. (3)	LVLFCVKEGVFVMSRYNFKN. (3)	37
Kp (F21645)	58	[78].F1	SKK. (1)	HVVEFEEFELILKQSESRIN. (3)	170
Es (P13800)	4	[78].IIS	IND. (3)	YVTHVKTGRGVLDEMDATIE. (3)	118
Sc (Q04942)	2	[75].LTS	RH. (3)	DVVVESESADVGVVQGRYBA. (3)	113
SL (P25852)	5	[76].IM	RS. (3)	TVVEVKEGLVIGRLDFDRDE. (3)	118
Fa (Q00934)	4	[76].MI	KG. (3)	THQVKEGVFVGVVDLGRRE. (3)	116
EF (P0AEC4)	526	[79].A00	INV. (2)	DKEQVNVMDIVSESLVPAITA. (3)	640
Hb (P26762)	973	[81].LFG. (1)	TAS. (4)	EVORCAVMDVSEIGVDAVQ. (3)	1092
Kc (P37740)	3	[78].F1	GA. (3)	LVGVKGVFVGVFENDDNHVVD. (3)	111

ФИГ. 1

CV301305	PVIMSSSHDSMGLV KCLSKGAVDLVKPIRKNELK LWOHWVRRC SSSGSGSES	166
AT-PRR7	PVIMSSSHDSMGLV KCLSKGAVDLVKPIRKNELK LWOHWVRRC SSSGSGSES	214
CV301305	HSKSPKRA--SP-DIDID--E--NPSIGL--AGSG--GSGC--SSSWTR--AV--SP--	357
AT-PRR7	HSKSPK--SP-DI--E--NPSIGL--AGSG--GSGC--SSSWTR--AV--SP--	357
AT-PRR7	TKSPKPRG--SKL--GSGSTEN--NPSIGL--AGSG--GSGC--SSSWTR--AV--SP--	274
CV301305	STNKAATDPE DSTCAQV--GPM--E--SS--V--D--S--E--LADGHT--PRV--VMSGLDTP--	581
AT-PRR3	STNKA--DPE DSTCAQV--GPM--E--S--V--D--S--E--LADGHT--PRV--VMSGLDTP--	329
CV301305	ESDGRHNSNKEVTKLADNEDG--V--DGL--L--D--N--GRSP--END--P--P--SS--V--P--AM	711
AT-PRR7	ESDGRHNSNKEVTKLADNEDG--V--DGL--L--D--N--GRSP--END--P--P--SS--V--P--AM	711
AT-PRR7	ENGLADLR--KDEILSW--SIMP--ST--SSSKWV--V--P--P--SS--V--P--AM	588
CV301305	NSFG--E--P--P--P--N--V--ZAP 7n5	
AT-PRR7	NSFG--E--P--P--P--N--V--ZAP 4U5	

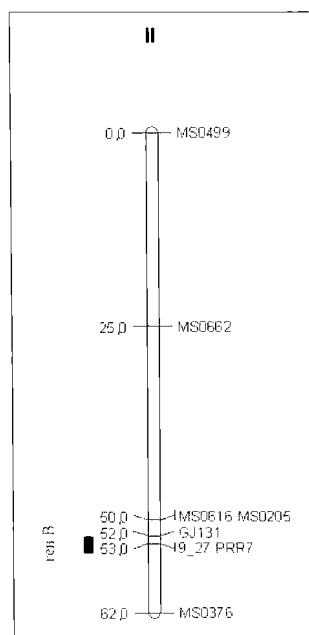
ФИГ. 2

ALPKR7 CDS	(1)	ATGAATGCTTAATGAGGAGGGGAGGGTTACGTTTACCCAATCACTGATGCGAAAGACCGGA	60
ALPKR7 cont	(1)	ATGAATGCTTAATGAGGAGGGGAGGGTTACGTTTACCCAATCACTGATGCGAAAGACCGGA	61
ALPKR7 CDS	(63)	GAGACAGAAATTCGATAGGGTTGAGAGTCGACAGAGAAGCATAGTGAAGAAGAGAAATCT	120
ALPKR7 cont	(63)	GAGACAGAAATTCGATAGGGTTGAGAGTCGACAGAGAAGCATAGTGAAGAAGAGAAATCT	121
ALPKR7 CDS	(121)	ATAGGAATTTACTATGGATGTGAGAAATGGCAGTTTCAGGTGGACCTGCGAAATTCGATTTGG	180
ALPKR7 cont	(121)	ATAGGAATTTACTATGGATGTGAGAAATGGCAGTTTCAGGTGGACCTGCGAAATTCGATTTGG	181
ALPKR7 CDS	(181)	CACAAACAGCGCGCAATCTGTTCTGTGGGAAGGTTTCTCATGTGAGAACCAATAGAGTT	240
ALPKR7 cont	(181)	CACAAACAGCGCGCAATCTGTTCTGTGGGAAGGTTTCTCATGTGAGAACCAATAGAGTT	241
ALPKR7 CDS	(241)	CTGCTTGTGAAATGACGACTGCACCTCGTATATCGTTACTGCACCTCTTTCGCAATTTGT	300
ALPKR7 cont	(241)	CTGCTTGTGCAAAATGACGACTGCACCTCGTATATCGTTACTGCACCTCTTTCGCAATTTGT	301
ALPKR7 CDS	(301)	AGCATTAAG	360
ALPKR7 cont	(301)	AGCATTAAGCTCAGTTTGAAGATTATGAGGCCCAATTTAATTTATAGCGCATATGAG	361
ALPKR7 CDS	(361)	CGGTTTTCGGTTCTCTGTTTGTGATGACATATATTAACTTCATGCGACGTTTGTGG	420
ALPKR7 cont	(361)	CGGTTTTCGGTTCTCTGTTTGTGATGACATATATTAACTTCATGCGACGTTTGTGG	421
ALPKR7 CDS	(421)	CGTCAATAGGCTACAGCTTGGAGGTTGTAGAGATCTAAACATCATATGATATG	480
ALPKR7 cont	(421)	CGTCAATAGGCTACAGCTTGGAGGTTGTAGAGATCTAAACATCATATGATATG	481
ALPKR7 CDS	(481)	TTGTAAACAGAGTGATCATGCCCTTACTTATCTGGTATCGGTCTCTTGTGCAAGATTTTGA	540
ALPKR7 cont	(481)	TTGTAAACAGAGTGATCATGCCCTTACTTATCTGGTATCGGTCTCTTGTGCAAGATTTTGA	541
ALPKR7 CDS	(541)	ACCACAAAATCTCGTCGCAACATCCGCTGTGATCA	600
ALPKR7 cont	(541)	ACCACAAAATCTCGTCGCAACATCCGCTGTGATCACTAGAGTTCTTTTCCTTGGGTGTTTTA	601
CY13135	(1)	GCCTCTGCTATTA	60
ALPKR7 CDS	(60)	61
ALPKR7 cont	(60)	CATTGAGGCTCTTTTCTTTAGTTAGAGCATTTGTTATATCTCTTATAGCATATTTGGA	62
CY13135	(101)	102
ALPKR7 CDS	(102)	103
ALPKR7 cont	(102)	104
CY13135	(141)	142
ALPKR7 CDS	(142)	GACTCAATGGGCGTTCTTAAAGTCTTATCGAAGAGAGCTGTGACCTTTCTTTGTTAG	200
ALPKR7 cont	(142)	GACTCAATGGGCGTTCTTAAAGTCTTATCGAAGAGAGAGCTGTGACCTTTCTTTGTTAG	201
CY13135	(181)	182
ALPKR7 CDS	(182)	CCATATAGAAATAATAGCTATAGATCTCTTGGCAGCATGTTGGAGAAGATGCCAAAT	240
ALPKR7 cont	(182)	CCATATAGAAATAATAGCTATAGATCTCTTGGCAGCATGTTGGAGAAGATGCCAAAT	241
CY13135	(221)	222
ALPKR7 CDS	(222)	CTATATAGAAATAATAGCTATAGATCTCTTGGCAGCATGTTGGAGAAGATGCCAAAT	280
ALPKR7 cont	(222)	CTATATAGAAATAATAGCTATAGATCTCTTGGCAGCATGTTGGAGAAGATGCCAAAT	281
CY13135	(261)	262
ALPKR7 CDS	(262)	CTATATAGAAATAATAGCTATAGATCTCTTGGCAGCATGTTGGAGAAGATGCCAAAT	320
ALPKR7 cont	(262)	CTATATAGAAATAATAGCTATAGATCTCTTGGCAGCATGTTGGAGAAGATGCCAAAT	321
CY13135	(301)	302
ALPKR7 CDS	(302)	303
ALPKR7 cont	(302)	304
CY13135	(341)	342
ALPKR7 CDS	(342)	343
ALPKR7 cont	(342)	344
CY13135	(381)	382
ALPKR7 CDS	(382)	383
ALPKR7 cont	(382)	384
CY13135	(421)	422
ALPKR7 CDS	(422)	423
ALPKR7 cont	(422)	424
CY13135	(461)	462
ALPKR7 CDS	(462)	463
ALPKR7 cont	(462)	464
CY13135	(501)	502
ALPKR7 CDS	(502)	503
ALPKR7 cont	(502)	504
CY13135	(541)	542
ALPKR7 CDS	(542)	543
ALPKR7 cont	(542)	544
CY13135	(581)	582
ALPKR7 CDS	(582)	583
ALPKR7 cont	(582)	584
CY13135	(621)	622
ALPKR7 CDS	(622)	623
ALPKR7 cont	(622)	624
CY13135	(661)	662
ALPKR7 CDS	(662)	663
ALPKR7 cont	(662)	664
CY13135	(701)	702
ALPKR7 CDS	(702)	703
ALPKR7 cont	(702)	704
CY13135	(741)	742
ALPKR7 CDS	(742)	743
ALPKR7 cont	(742)	744
CY13135	(781)	782
ALPKR7 CDS	(782)	783
ALPKR7 cont	(782)	784
CY13135	(821)	822
ALPKR7 CDS	(822)	823
ALPKR7 cont	(822)	824
CY13135	(861)	862
ALPKR7 CDS	(862)	863
ALPKR7 cont	(862)	864
CY13135	(901)	902
ALPKR7 CDS	(902)	90

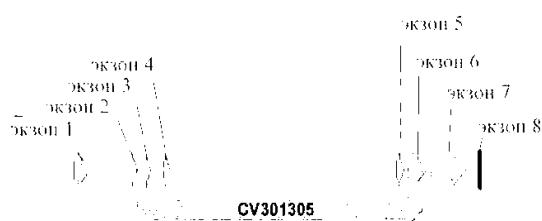
ФИГ. 3-1

ALPFR7_CDS	(1616)	AGTGGAAAGTGAAGAGCGAAACGCATCAAACTCAAAGTCTCTTGAAATCGAAAAGTTATTA	1368
ALPFR7_F08	(1021)	ACTGGGAAGTGAAGAGCGGAAACGCATCAAACTCAAAGTCTCTTGAAATCGAAAAGTTATTA	
CV350135	(157)	AGTGGAAAGTGAAGAGCTCTCTTAAATGAATGAAAATCGAATGGAAGCTG	1140
ALPFR7_CDS	(676)	AAATCTGATCAAGATTTCAGGAAGCAGTGTATGAATGAAAATGGGAGATCTGGCGCTGAAT	1140
ALPFR7_F08	(1681)	AAATCTGATCAAAATTCAGGAAGCAGTGTATGAATGAAAATGGGAGATCTGGCGCTGAAT	
CV350135	(204)	GATCTGGACCAATGACACTGACATGATGATGAAATGATGATACAGAAGCATGTSITTAACA	1200
ALPFR7_CDS	(736)	GCTAGTGTATGGAAGTACTGATGGGAGTGGCGCTCAG	1200
ALPFR7_F08	(1141)	GCTAGTGTATGGAAGTACTGATGGGAGTGGCGCTCAGGTATGACAGCAATCTGTAATATCGAT	
CV350135	(174)	GCTCGGATGGGAAGTGAACATGGAAGTGGHACCCAG	1266
ALPFR7_CDS	(772)	1261	1266
ALPFR7_F08	(1261)	AATCTAAATATACACCGGAAGCTATCTCTTTTAAAAATTTTAAACACCAATATATAG	
CV350135	(510)	1261	1320
ALPFR7_CDS	(772)	1321	1320
ALPFR7_F08	(1361)	GTTGGAATGATGCAACTCTCACTTTGACCTCAGATGGCTATAAATGTTGAAATGCGCTTAA	
CV350135	(305)	1361	1368
ALPFR7_CDS	(772)	1369	1368
ALPFR7_F08	(1361)	CTAAGCAATTTGAAAGTCAATGATTTTAAATTTAGATCTATCTCAGTGAATAAAATGAGT	
CV350135	(510)	1361	1440
ALPFR7_CDS	(772)	1441	1440
ALPFR7_F08	(1441)	AAATTTCTAGTCTATTCTGAAGTTTATTTTTCACATGGTTTATCTCCAAAATCTAGGT	
CV350135	(210)	1441	1506
ALPFR7_CDS	(772)	1507	1506
ALPFR7_F08	(1441)	TGATTTTGCATATACCTTTTCTTGTTCAGACTCTTCGGACAAAAAGCTCTGATGTGGA	
CV350135	(210)	1507	1560
ALPFR7_CDS	(772)	1561	1560
ALPFR7_F08	(1441)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(210)	1561	1620
ALPFR7_CDS	(694)	1621	1620
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	1621	1680
ALPFR7_CDS	(694)	1681	1680
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	1681	1740
ALPFR7_CDS	(694)	1741	1740
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	1741	1800
ALPFR7_CDS	(694)	1801	1800
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	1801	1860
ALPFR7_CDS	(694)	1861	1860
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	1861	1920
ALPFR7_CDS	(694)	1921	1920
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	1921	1980
ALPFR7_CDS	(694)	1981	1980
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	1981	2040
ALPFR7_CDS	(694)	2041	2040
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	2041	2100
ALPFR7_CDS	(694)	2101	2100
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	2101	2160
ALPFR7_CDS	(694)	2161	2160
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	2161	2220
ALPFR7_CDS	(694)	2221	2220
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	2221	2280
ALPFR7_CDS	(694)	2281	2280
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	2281	2340
ALPFR7_CDS	(694)	2341	2340
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	2341	2400
ALPFR7_CDS	(694)	2401	2400
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	2401	2460
ALPFR7_CDS	(694)	2461	2460
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	2461	2520
ALPFR7_CDS	(694)	2521	2520
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	2521	2580
ALPFR7_CDS	(694)	2581	2580
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	2581	2640
ALPFR7_CDS	(694)	2641	2640
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	2641	2700
ALPFR7_CDS	(694)	2701	2700
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	2701	2760
ALPFR7_CDS	(694)	2761	2760
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	2761	2820
ALPFR7_CDS	(694)	2821	2820
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	2821	2880
ALPFR7_CDS	(694)	2881	2880
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	2881	2940
ALPFR7_CDS	(694)	2941	2940
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	2941	3000
ALPFR7_CDS	(694)	3001	3000
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3001	3060
ALPFR7_CDS	(694)	3061	3060
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3061	3120
ALPFR7_CDS	(694)	3121	3120
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3121	3180
ALPFR7_CDS	(694)	3181	3180
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3181	3240
ALPFR7_CDS	(694)	3241	3240
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3241	3300
ALPFR7_CDS	(694)	3301	3300
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3301	3360
ALPFR7_CDS	(694)	3361	3360
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3361	3420
ALPFR7_CDS	(694)	3421	3420
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3421	3480
ALPFR7_CDS	(694)	3481	3480
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3481	3540
ALPFR7_CDS	(694)	3541	3540
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3541	3600
ALPFR7_CDS	(694)	3601	3600
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3601	3660
ALPFR7_CDS	(694)	3661	3660
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3661	3720
ALPFR7_CDS	(694)	3721	3720
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3721	3780
ALPFR7_CDS	(694)	3781	3780
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3781	3840
ALPFR7_CDS	(694)	3841	3840
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3841	3900
ALPFR7_CDS	(694)	3901	3900
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3901	3960
ALPFR7_CDS	(694)	3961	3960
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	3961	4020
ALPFR7_CDS	(694)	4021	4020
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4021	4080
ALPFR7_CDS	(694)	4081	4080
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4081	4140
ALPFR7_CDS	(694)	4141	4140
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4141	4200
ALPFR7_CDS	(694)	4201	4200
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4201	4260
ALPFR7_CDS	(694)	4261	4260
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4261	4320
ALPFR7_CDS	(694)	4321	4320
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4321	4380
ALPFR7_CDS	(694)	4381	4380
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4381	4440
ALPFR7_CDS	(694)	4441	4440
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4441	4500
ALPFR7_CDS	(694)	4501	4500
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4501	4560
ALPFR7_CDS	(694)	4561	4560
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4561	4620
ALPFR7_CDS	(694)	4621	4620
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4621	4680
ALPFR7_CDS	(694)	4681	4680
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4681	4740
ALPFR7_CDS	(694)	4741	4740
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4741	4800
ALPFR7_CDS	(694)	4801	4800
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4801	4860
ALPFR7_CDS	(694)	4861	4860
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4861	4920
ALPFR7_CDS	(694)	4921	4920
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4921	4980
ALPFR7_CDS	(694)	4981	4980
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	4981	5040
ALPFR7_CDS	(694)	5041	5040
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	5041	5100
ALPFR7_CDS	(694)	5101	5100
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	5101	5160
ALPFR7_CDS	(694)	5161	5160
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	5161	5220
ALPFR7_CDS	(694)	5221	5220
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	5221	5280
ALPFR7_CDS	(694)	5281	5280
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	5281	5340
ALPFR7_CDS	(694)	5341	5340
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	5341	5400
ALPFR7_CDS	(694)	5401	5400
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	5401	5460
ALPFR7_CDS	(694)	5461	5460
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	5461	5520
ALPFR7_CDS	(694)	5521	5520
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	5521	5580
ALPFR7_CDS	(694)	5581	5580
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	5581	5640
ALPFR7_CDS	(694)	5641	5640
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	5641	5700
ALPFR7_CDS	(694)	5701	5700
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	5701	5760
ALPFR7_CDS	(694)	5761	5760
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	5761	5820
ALPFR7_CDS	(694)	5821	5820
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	5821	5880
ALPFR7_CDS	(694)	5881	5880
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	5881	5940
ALPFR7_CDS	(694)	5941	5940
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	5941	6000
ALPFR7_CDS	(694)	6001	6000
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	6001	6060
ALPFR7_CDS	(694)	6061	6060
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	6061	6120
ALPFR7_CDS	(694)	6121	6120
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	6121	6180
ALPFR7_CDS	(694)	6181	6180
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	6181	6240
ALPFR7_CDS	(694)	6241	6240
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	6241	6300
ALPFR7_CDS	(694)	6301	6300
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	6301	6360
ALPFR7_CDS	(694)	6361	6360
ALPFR7_F08	(1561)	TGACATCTCAAGAGCGGATATCTCTATGGACAGGAT	
CV350135	(142)	6361	6420
ALPFR7_CDS	(694)	6421	642

ФИГ. 3-2



Фиг. 4



Фиг. 5

1	60
AtPRR3
AtPRR5	MMQWPPQPIILDIFSNPNTLTTVRWGVRHPLS1ITVKTFAFPFLDIFPSPHYHYRHK
AtPRR9
AtTCC1
AtPRR7
BvPRR7MLLIHYN
61	120
AtPRR3MCFNNIETGDEVETTERQVPS
AtPRR5	VLPFALFSPISPLTNILICFVTVSLSELSLSSGIIDLGFKLSVCVYIMTSEVVEVT
AtPRR9MRFI
AtTCC1VVLISIDGMETI
AtPRR7MD
BvPRR7	ESGEGSRVPTIDPKTGRTKPRVSGRTKHN
121	180
AtPRR3	DTANTRN.....VVISQQQQQF-LAHV
AtPRR5	VTAPEAGQQKLS.....RRKIRKKNAGVTQL
AtPRR9	KRVKESD.....V
AtTCC1	LNGECKQG.....DGIDSRV
AtPRR7	MDVINGSS.....GGLQIPLSQQTAA
BvPRR7	EDGEDANSRRSLSSVQLPVNTHRHQVQVQGG
181	240
AtPRR3	LLGCYVYVMSRIKPEKSDVLEHVMVGHISSTL
AtPRR5	LLCAYVYVMSRIKPEKSDVLEHVMVGHISSTL
AtPRR9	LLCAYVYVMSRIKPEKSDVLEHVMVGHISSTL
AtTCC1	LLCAYVYVMSRIKPEKSDVLEHVMVGHISSTL
AtPRR7	LLCAYVYVMSRIKPEKSDVLEHVMVGHISSTL
BvPRR7	LLCAYVYVMSRIKPEKSDVLEHVMVGHISSTL
241	300
AtPRR3	RPVIMMSHDSVVKKSGAVDGLKPRNELSLWHWRRRH
AtPRR5	RPVIMMSHDSVVKKSGAVDGLKPRNELSLWHWRRRH
AtPRR9	RPVIMMSHDSVVKKSGAVDGLKPRNELSLWHWRRRH
AtTCC1	RPVIMMSHDSVVKKSGAVDGLKPRNELSLWHWRRRH
AtPRR7	RPVIMMSHDSVVKKSGAVDGLKPRNELSLWHWRRRH
BvPRR7	RPVIMMSHDSVVKKSGAVDGLKPRNELSLWHWRRRH
301	360
AtPRR3	GIHQVYVYVMSRIKPEKSDVLEHVMVGHISSTL
AtPRR5	GIHQVYVYVMSRIKPEKSDVLEHVMVGHISSTL
AtPRR9	GIHQVYVYVMSRIKPEKSDVLEHVMVGHISSTL
AtTCC1	GIHQVYVYVMSRIKPEKSDVLEHVMVGHISSTL
AtPRR7	GIHQVYVYVMSRIKPEKSDVLEHVMVGHISSTL
BvPRR7	GIHQVYVYVMSRIKPEKSDVLEHVMVGHISSTL
361	420
AtPRR3	TKSTSP.....N
AtPRR5	SQPNETPLLANEQSK.....QARAFDMGASFRKTRRNREESVAQYRSRT
AtPRR9	TFDVTMDLIG.....GIDFFPGS
AtTCC1	TFDVTMDLIG.....GIDFFPGS
AtPRR7	TFDVTMDLIG.....GIDFFPGS
BvPRR7	TFDVTMDLIG.....GIDFFPGS
421	480
AtPRR3	ADQKSDICTSGSTG.....MSKKKEEP
AtPRR5	ADQKSDICTSGSTG.....MSKKKEEP
AtPRR9	ADQKSDICTSGSTG.....MSKKKEEP
AtTCC1	ADQKSDICTSGSTG.....MSKKKEEP
AtPRR7	ADQKSDICTSGSTG.....MSKKKEEP
BvPRR7	ADQKSDICTSGSTG.....MSKKKEEP

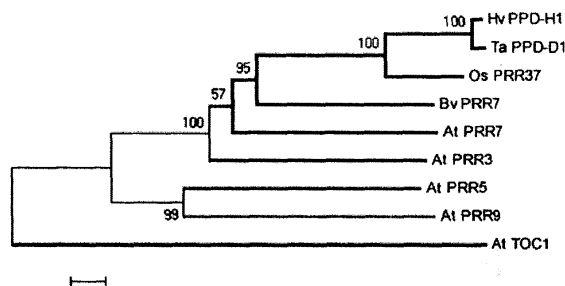
Фиг. 6-1

```

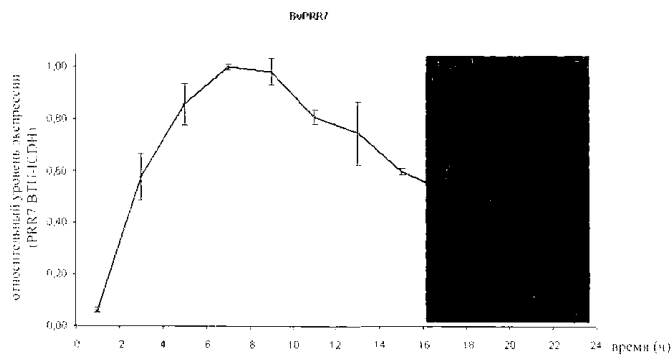
461                                     540
At PRR3  --RSSQSS-----QVESKAPSS--NFSSLCLEBOTHKT---
At PRR5  DRIYLANQVNTSEP-----FNHAPPRNDIEFYTGASPPPPFQCLNEWPG
At PRR9  -----TPTESHSLKRVTCGCGATTSSQEN--
At TOC1  VLETNQSSTFLVNGN-----GSHHHRGAALFQVVACEGIIINTYCAISRG-T
At PRR7  QMEEDSSPKAMSCHLDQNRPEAPNTILKTLDTNAGVFLSGLMNVVERSSHPG-T
Bv PRR7  WIKQAMSPGKVEHRRGN---KVSADAPPEISKYDQSHQHVSMFLVLAALAG--D
541                                     600
At PRR3  PRPRIVY--SVLREHNE--K--G--AT-----
At PRR5  QSSEYTPTEINIQFQNTIYTSAMAPASLSPSSVSPHYSMSMHPFTH-----
At PRR9  --IGSSSTFQVLIVTHOKOOSLVE--EN-----
At TOC1  EQVHQSSTLSSGASYHGLEEFILTSMSHSGENVQENNTIPQVAMIR-----
At PRR7  EDISTLVEDQVLEPSSSSSSPSNANKIKGNLSTSLQDNN-----
Bv PRR7  IASTTNSGCLVCSGLSSTSGTTGNQSGTGNVSSSPMNSSEAAKQSHFDAP
601                                     660
At PRR3  -----AKAEMTESCPHDSPIAKLLSSSSSVPL
At PRR5  -----SGLQRDQSMVDERRVYATEHSAIG
At PRR9  -----AASKEEAGQSTNBSIAGCSTEKPEES
At TOC1  -----SDSSCSGSPSAPNAYPYMHGVMMQVMM
At PRR7  -----SQQLIITAAAYCHNNMESLPHNHFHVGSNIFD
Bv PRR7  HQLSNSSSHNNMSTTNKFKPKAMDIDTAAKSTVNCIHHSHVFEPVCHMSNNIDT
661                                     720
At PRR3  -----
At PRR5  NHIDQLIE-----
At PRR9  -----
At TOC1  QAMMPQYGHQIPHCQPNHPSMTGYPPYNNHMTSLQHSQMSLQ-----
At PRR7  KSTTEHNAFTYTGAPKVSAGSSVKHSSFOPLCDNHHNIAEYHLVHAE--
Bv PRR7  ASYFPGVGVVHMLQENVVNAVLQENNVQQLIQHHHHYHYDVHLSVQQLPKVSVQH
721                                     780
At PRR3  -----Q-----
At PRR5  -----
At PRR9  -----
At TOC1  -----
At PRR7  -PEK-----LPQCGSSNVYNETIEGNNRTVNYSTNIGSVSGSHGSGNGPYGSSNGMNAAG
Bv PRR7  NMPKSEYVTAAPPQCGSSNTCSPIEAN--VANCILNGSGSGSHGSGNFLAGSSAANVDS
781                                     840
At PRR3  -----QSST-----DRWA--REALAKFRKRRCRCKK
At PRR5  -----KYNEDGYLSVGLQQLREALAKFRKRRCRYGK
At PRR9  -----AFQRW-----RS--REALAKFRKRRCRCCK
At TOC1  -----NGQMSVHHMPAHPPSNEVFNKLDRBALAKFRKRRCRCCK
At PRR7  MMSSDLAGAGNG--NGDSSSSSSGNLADENKISREALAKFRKRRCRCK
Bv PRR7  TNVINDSGIAAKGAGNGSSSSSSAGGVGVDQSRSA--REALAKFRKRRCRCK
841                                     900
At PRR3  RYPRKRLA--RP--GOFF--CHYSSGSH--
At PRR5  RYPRKRLA--RP--GOFF--STQAP--
At PRR9  RYPRKRLA--RP--GOFF--SDASTIS--
At TOC1  RYPRKRLA--RP--GOFF--KNGVVDLNGQFDSADYDDENFEEEEEEBESSFQ
At PRR7  RYPRKRLA--RP--GOFF--FA--AATIDGKIE
Bv PRR7  RYPRKRLA--RP--GOFF--ENKUPTES--
901                                     960
At PRR3  -----
At PRR5  -----
At PRR9  -----
At TOC1  DDALGT-----
At PRR7  DS-----
Bv PRR7  -----

```

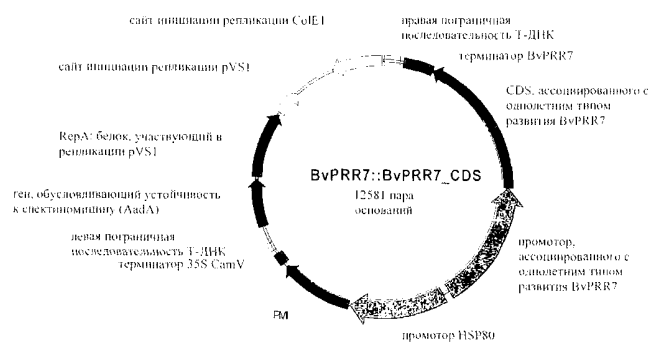
Фиг. 6-2



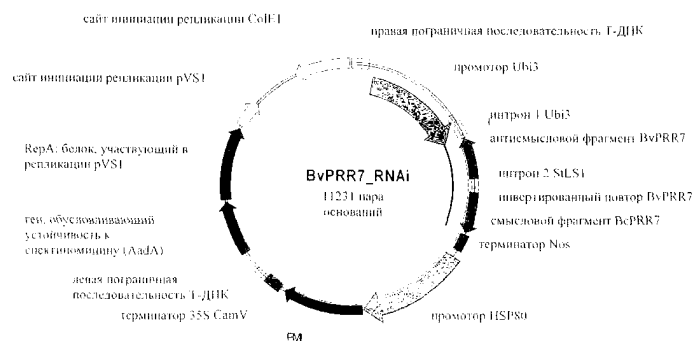
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

