

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 022877

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2016.03.31

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

(21) Номер заявки
200901525

(22) Дата подачи заявки
2008.05.23

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

(31) 07108777.9

(32) 2007.05.23

(33) ЕР

(43) 2010.10.29

(86) PCT/EP2008/056390

(87) WO 2008/142167 2008.11.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ЗИНГЕНТА ПАРТИСИПЕЙШИНС 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

B1

(57) В заявке описаны полинуклеотиды, которые близко сцеплены с обусловливающим 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 обусловливающего 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.

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 B 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 B 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 B 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 свекольных рода *B. vulgaris* ssp. *maritima* характерен однолетний тип развития в результате присутствия обуславливающего стрелкование гена B в B-локусе, который картирован в центральной области хромосомы II. Доминантный аллель B-локуса часто встречается у различных диких видов свекольных, 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 B-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 свекольных, что может вызывать загрязнение образующихся семян пыльцой 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 свекольных не вырастают непосредственно после сбора семян. Растения являются неяровизированными 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 свекольных. В этих случаях важно иметь маркер, близко сцепленный с геном B, 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 B. Изобретение относится также к применению указанного полинуклеотида для создания маркеров, которые можно применять для картирования, идентификации и выделения обуславливающего стрелкование гена или гена B 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 B), 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 B), 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 обусловливающим стрелкование геном или геном В в геноме сахарной свеклы, и который содержит один или несколько из следующих элементов:

а) инtronную 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 инtronную 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 подпадают 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 обусловливающим 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-

ственno, 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 BAC 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 BAC 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, С в положении 3827, Т в положении 3954, Т в положении 5284, Г в положении 5714, Г в положении 10954, Т в положении 11043, С в положении 11143, С в положении 11150, А в положении 11220, С в положении 11238, А в положении 11299, А в положении 11391, Г в положении 12053, Г в положении 12086, Т в положении 12127, А в положении 12193, Г в положении 12337 и Г 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 Т в положении 3695, С в положении 3827, Т в положении 3954, Т в положении 5284, Г в положении 5714, Г в положении 10954, Т в положении 11043, С в положении 11143, С в положении 11150, А в положении 11220, А в положении 11238, Т в положении 11299, А в положении 11391, Г в положении 12053, Г в положении 12086, Т в положении 12127, Г в положении 12193, Г в положении 12337 и Г 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 Г в положении 3695, С в положении 3827, Т в положении 3954, Т в положении 5284, Г в положении 5714, Г в положении 10954, Г в положении 11043, Т в положении 11143, С в положении 11150, А в положении 11220, С в положении 11238, Т в положении 11299, А в положении 11391, Г в положении 12053, Г в положении 12086, Т в положении 12127, Г в положении 12193, Г в положении 12337 и Г 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 создаются 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 (одноклекулятный 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 B, но прежде всего с областью в гене B, 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 B-аллеля в B-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 инtronе 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 инtronе, 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 скреплена с геном B, 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 B-аллеля в B-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 B-аллеля в B-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 скреплена с геном B, 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 B-аллеля в B-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 заражений 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, ассоцииированного 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, ассоцииированного 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, ассоцииированного 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, ассоцииированном с двулетним типом развития, но не присутствует в аллеле, ассоцииированном 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 инtronной 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 инtronной 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 инtronная 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 инtronную область полинуклеотида, предлагаемого в изобретении и описанного выше, с помощью "прямого" и "обратного" праймеров, фланкируя подобласть в инtronной 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 мечена молекула-зонд, более предпочтительно молекула-зонд, меченная первым флуоресцентным красителем и гасителем, представляет собой один аллель, а вторая молекула-зонд, прежде всего мечена 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, SSR, делеции или инсертции 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 инtronной 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 инtronной 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 инtronная 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, ассоцииированного с признаком однолетности в геноме сахарной свеклы, которое предусматривает

- а) идентификацию указанных полиморфных сайтов,
- б) оценку связи указанных полиморфизмов с отсутствием или присутствием аллеля, ассоцииированного 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, фланкирующих 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 B, 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 кассету экспрессии, которая несет кодирующую последовательность гена B, 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 кассету экспрессии, которая несет кодирующую последовательность гена B, 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 фосфоманнозоизомеры, ген ксилозоизомеразы.

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 B, 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 РНК-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 B, 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 области кодирующей последовательности гена B, 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 РНКи под контролем конститутивного промотора, такого, например, как промотор Ubi3 из *Arabidopsis*.

Одним из вариантов осуществления изобретения является трансформирующий вектор и/или применимый для РНКи 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 выведения эволюционной истории использовали метод "объединения соседей" (Neighbor-Joining Method) (Saitou и Nei, 1987). Для выведения эволюционной истории анализируемых таксонов применяли консенсусное дерево, построенное методом "бутстрэпа" ("bootstrap") на основе 1000 реплик (Felsenstein, 1985). Ветви, соответствующие разделению, воспроизведимому 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 выведения 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 "бреки" 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 (NP_568919); 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 (AYA17586); 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 инtronом 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 интрана 3 BvPRR7 и ее аллельная изменчивость, предназначенная для картирования,

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

SEQ ID NO: 4 - нуклеотидная последовательность интрана 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 индустриальных 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 относится 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 существует 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 одноклаптонные полиморфизмы (SNP), индели (т.е. инсерции/дедеции), 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 нукleinовой 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 экстра-генным 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 "информационный фрагмент" относится к полинуклеотидному фрагменту с информационным содержанием, которое является восстановимым и может способствовать определению и/или характеризации 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, одноклекулярные 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 "информационного 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 нукleinовых кислот растения, где нукleinовая 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, по-всеместных 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 пиридинам. "Фрагмент полинуклеотида (полинуклеотидный фрагмент)" представляет собой часть данной полинуклеотидной молекулы. В высших растениях дезоксирибонукleinовая кислота (ДНК) представляет собой генетический материал, а рибонукleinовая 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 (Batzer и др., 1991; Ohtsuka и др., 1985; Rossolini и др., 1994). Понятия полинуклеотид используют взаимозаменяя с понятиями нукleinовая 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 "нукleinовая 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-метилированные олигонуклеотиды), и т.п. В некоторых вариантах осуществления изобретения нукleinовая 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 нукleinовой кислоты, связанному с биологической функцией. Так, гены включают кодирующие последовательности и/или регуляторные последовательности, необходимые для их экспрессии. Например, понятие "ген" относится к фрагменту нукleinовой 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 селектируемый 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 взаимозаменяя.

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 инtron, такую как кДНК, или может включать один или несколько инtronов, 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 помотора. 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 транскрибуемой последовательности, который обозначают также как положение +1. Относительно этого сайта нумеруют все другие последовательности гена и его контролирующие 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 контролирующие 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 определяет 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 эндизонами 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 нукleinовой 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 "гибридизуется" 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 взаимозаменяю. 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 отмычки, 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 отмычки, 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-мишней 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 отмычки является применение 0,15M NaCl при 72°C в течение примерно 15 мин. Примером строгих условий отмычки является отмыка 0,2×SSC при 65°C в течение 15 мин (описание SSC-буфера см. у Sambrook, ниже). Часто отмывка в очень строгих условиях предшествует отмывка в расслабленных условиях для удаления фонового сигнала зонда. Примером отмычки 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 расслабленных условий отмычки 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 протопласти, клетки в культуре клеток, клетки в тканях растения, пыльца, пыльцевые трубы, семяпочки, 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 зародыши.

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 B), и применение указанных полинуклеотидов для создания маркеров, которые можно использовать для картирования и идентификации гена, обуславливающего стрелкование, или гена B. 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 основанном 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 B.

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

Настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, который картирован в локусе B 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 (Möhring 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 B.

Полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, можно применять также для полной характеристизации области, окружающей B-локус, включающей ген B, 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 (HMW) 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.н., 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 Таq. Последующий скрининг пулов ДНК в отношении BvPRR7-фрагментов позволил идентифицировать положительный BAC-клон, несущий соответствующий фрагмент.

Для получения полноразмерной последовательности гена BvPRR7 ранее идентифицированный BAC-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 BAC 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 домена-приемника регулятора псевдоответа (PRR) (pfam00072) вблизи NH₂-конца и CCT-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 гомологий 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 B. 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 B 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 B.

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

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 одноклекулярные 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 гетерогенной 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 McCleland, 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 осуществляющую 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-мишней (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. Тремя 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. Анализы 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 РСТ 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 нукleinовой 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 нукleinовой 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, ассоцииированного 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 одноклеточном 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, обусловливающим 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 (гибридизующихся) 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 κ ДНК 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 синтезии, 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 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 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 свекольных, это может приводить к загрязнению их пыльцой 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 выращиваются в регионах, таких как Аргентина, в которых сорные виды свекольных не вырастают непосредственно после сбора семян. Растения являются неяровизированными 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 *B* как моногенный доминантный признак; таким образом, потребность в яровизации 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 фосфоманнозоизомеразы (PMI) в качестве селектируемого 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 нетрасгенных 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 яровизации. 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 независящим от яровизации цветением у сахарной свеклы.

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

Затем РНКи-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 яровизации. Согласно принятым методам трансгенные растения подвергают 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 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 яровизации. 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 (ацилпереносящий 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 индуцильных промоторов, являются анаэробные условия, повышенная температура или присутствие света. Такие промоторы в контексте настоящего описания обозначены как "индуцильные" 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 экспрессия в других тканях.

Примерами промоторов, действие которых зависит от стадии развития, являются промоторы, которые инициируют 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 выводят 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 запасающего 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 запасающий белок 2S, из *Brassica napus* (Dasgupta и др., *Gene* 133, 1993, с. 301-302), гены, кодирующие олеозин A (GenBank NO: U09118) и олеозин B (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 полиаденилирование мРНК. 3'-нетраслируемая 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 нопалинсингтазы, терминатор E9 rbcS гороха, терминатор для транскрипта T7 из гена октопинсингтазы *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 нопалинсингтазы *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan и др., 1983), терминатор для транскрипта T7 из гена октопинсингтазы *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 инtronные последовательности (например, из генов Adhl, bronzel, actin 1, actin 2 (WO 00/760067), или инtron сингтазы сахарозы) 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) (Macejak 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 инtron 1 Adh (Callis и др., 1987), инtron сингтазы сахарозы (Vasil и др., 1989) или элемент TMV-омега (Gallie и др., 1989).

Примерами энхансеров являются элементы промотора 35S CaMV, генов октопинсингтазы (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 внекромосомно 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, содержащий 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 внекромосомно 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.R. 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, изменения 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 олигонуклеотидом, 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, 1988, 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 известным 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 нейtronами 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 M2-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, индуциальная, тканеспецифическая или регулируемая стадией развития экспрессия, и они приводят к конститутивному, индуцильному, 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 антисмыловые 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 РНК, 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 РНК, 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. Необходимо 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. Curcurbitaceae (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. 383-389; 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 полизиленгликолем (ПЭГ) трансформация; трансформация с помощью вирусов; микропункция растительных клеток; бомбардировка микроснарядами растительных клеток; вакуумная инфильтрация; 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 полинуклеотидным 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 протопласти 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; Buitne и др., 1987; Sukhapinda и др., 1987; Lorz и др., 1985; Potrykus, 1985; Park и др., 1985; Hiei и др., 1994). Применение Т-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 (Paszkowski 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 (хлоропласти 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, чесок, 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 генетически 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, обусловливающая 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, анеоплацию. 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 пыльцой другой линии гарантирует, что геном обладающего мужской стерильность, но женской fertильностью 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, действующим 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 многочленные 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 характеризации 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 системе (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 инtronных областей (фиг. 3). Праймеры PRR7-F и -R (SEQ ID NO: 2 и 3), flankирующие предполагаемую 3-ю инtronную область, обеспечивали получение продукта амплификации размером примерно 0,5 т.п.н. при применении геномной ДНК свеклы в качестве матрицы. Для амплификации с помощью ПЦР 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. ПЦР-эксперименты осуществляли в устройстве GeneAmp PCR System 9600 фирмы Applied Biosystems Inc., используя меченнную платиной ДНК-полимеразу Taq и соответствующую реакционную смесь фирмы Invitrogen Corporation, согласно рекомендациям поставщика. Анализ последовательности ПЦР-продукта позволил реконструировать геномную последовательность вокруг интрана 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 двухлетних и 1 однолетнюю линию. Все двухлетние линии оказались мономорфными по BvPRR7, поскольку обнаружено только два различных гаплотипа: один аллель, ассоциированный с двухлетним 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 Taq-Man®. 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 ПЦР (TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG) (2×) фирмы Applied Biosystems Inc. согласно рекомендациям производителя. ПЦР-

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 BvPRR7 был картирован в F2-популяции, включающей 198 растений, которые получали скрещиванием однолетней линии и двулетней линии, полиморфной по SNP в положении № 160. BvPRR7 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 BvPRR7. 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 BvPRR7 наиболее перспективным кандидатом на роль B-гена.

Пример 1.3. Выявление полноразмерной геномной последовательности BvPRR7

Используя праймеры PRR7-F и PRR7-K, подвергали скринингу BAC-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 BvPRR7-фрагмента, проведенный согласно инструкциям поставщика, позволил осуществить положительную идентификацию клона BAC SBA079-L24.

Для получения полноразмерной последовательности гена клон BAC 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 BvPRR7 (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 BvPRR7 свеклы, включающая интроны и экзоны, которая представлена на фиг. 5. Согласно предсказанной структуре геномная последовательность включает полный ген BvPRR7, 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 BvPRR7 представлена в SEQ ID NO: 6. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности BvPRR7 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* BvPRR7 характеризуется также выраженной гомологией с PRR7 зерновых культур, что проиллюстрировано с помощью филогенетического дерева, представленного на фиг. 7. Неожиданным 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 BvPRR7

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 BvPRR7 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'-TGTCAATTGTCGACTCTCAGC-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'-AAGATCGCCAAGCTTGGTG-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 Таq 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 аллеля, 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 Таq 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 инtron 3

Положение в SEQ ID NO: 4

ID NO: 4.	87	160	406	
гаплотип № 1	T	T	G	однолетний
гаплотип № 2			A	двухлетний

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-CTGATGGAAAGCTG-MGB-NFQ

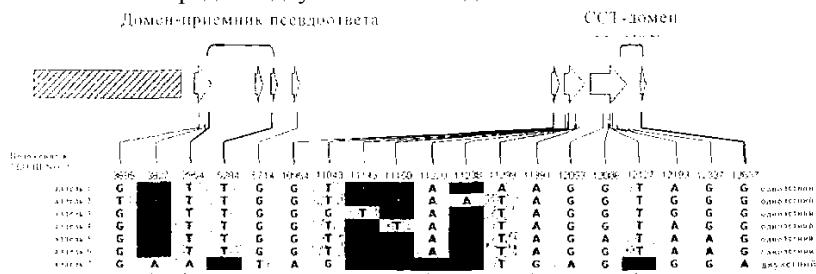
Таблица 3. Генотипы для некоторых маркеров, включающие PRR7(T1)-картирование вокруг гена B в 9 F2-растениях, характерные для случаев рекомбинации на любой стороне гена B. PRR7(T1), а также маркер 9_27(T2) характеризуются точным соответствием с предсказанным генотипом гена B. Генотип гена B оценивают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

Коды 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 инtronных и промоторных или терминирующих областей

Наименование предшественника	Последовательность (5' → 3')	Локализация	SEQ ID NO
F3766	TTTGATGCTTTTCAGGCCA	инtron 1	SEQ ID NO:17
R3767	TTTCTTATAGGCTTCACCAAGAAAGTC	экзон 3	SEQ ID NO:18
F3354	ATGTCATCTCATGATTGATGGG	экзон 3	SEQ ID NO:19
R3355	TCAGCCCTCTGCTCTATG	экзон 4	SEQ ID NO:20
		инtron 3/экзон 4	SEQ ID NO:21
F3768	TTTCCTCATTCCTTTTAAGTCTAGTGGT	инtron 4	SEQ ID NO:22
R3769	AATATGTGAGAAAAATGTTGCA	инtron 4	SEQ ID NO:23
F3782	TCYAACTGGAAAGGATTG	экзон 6	SEQ ID NO:23
R3783	AATTTCGGTGGTGCATCAG	экзон 6	SEQ ID NO:24
F3784	GCCCCCAACACAGTCATA	экзон 5	SEQ ID NO:25
R3785	GGTCATTAGCCGTAACTG	экзон 6	SEQ ID NO:26
F3806	TTTTGCACTCGAACGGGT	промотор	SEQ ID NO:27
R3807	CATTGTTGAAAGTAGGTATAAGGACAA	инtron 1	SEQ ID NO:28
F3808	TTAGATCTCTCCCTAGACTCTCTG	промотор	SEQ ID NO:29
R3809	TCACCAATTCTTATCATATCATGACA	промотор	SEQ ID NO:30
F3810	GAGAAAAGGGTTTATGATGTTAAGTTT	промотор	SEQ ID NO:31
R3811	AACTTAAACCCATCATGCTTTTCAAC	промотор	SEQ ID NO:32
F3853	AACTGGACATCTGGATTTCAGTCA	промотор	SEQ ID NO:33
R3854	TTATGGGAAAAAAACTCTCGGTATTCT	промотор	SEQ ID NO:34
F3855	GAACCCCATTTAGTATGACATTCT	промотор	SEQ ID NO:35
R3856	AATTAGATGAAATAAAAAGCAAAATGAGGAA	промотор	SEQ ID NO:36
F3857	TCCATTGAGGAGTAGGTATGATGAG	инtron 4	SEQ ID NO:37
R3858	CTTCGGACCATCTTCTGTTG	экзон 6	SEQ ID NO:38
F3859	GGAAAAACCAATTATCAGCTTACAGCT	экзон 6	SEQ ID NO:39
R3860	TCTTGAGCTGCTGATCCACGT	экзон 7	SEQ ID NO:40
F3861	CTGACATCTGTAACCGCTGGT	экзон 7	SEQ ID NO:41
R3862	CGTACCTGGCGCAAGAT	экзон 8	SEQ ID NO:42
F3863	AATTGGCCATTCTGCTTGTAT	инtron 7	SEQ ID NO:43
R3864	AATGTGACCCGTAACCGCT	терминатор	SEQ ID NO:44
F3865	GGTGTGATGATCATAATACTGTTTGG	терминатор	SEQ ID NO:45
R3866	AGCAAGCTTGGCTGG	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 SEO ID NO: 5.

Пример 2. Валидация трансгенов BvPRR7 с помощью изучения комплементарности

Пример 2. Валидация генетических BvPRR7 с помощью изучения комплементарности

Однолетний фенотип растения, обусловленный геном B, 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 экспланта и ген фосфоманнозоизомеразы (PMI) в качестве селектируемого маркера. Плазмидная карта бинарного вектора, несущего генные кассеты как для гена селектируемого 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 сергрегации 1:1 и прямой корреляцией между PMI-активностью и признаком однолетности. Эти данные должны недвусмысленно подтверждать причинную связь между BvPRR7 и независимым от яровизации цветением у сахарной свеклы.

Пример 3. Супрессия трансгенов BvPRR7 обуславливает устойчивость к стрелкованию

Поскольку BvPRR7 играет решающую роль в яровизационном ответе у сахарной свеклы, то BvPRR7 является очевидным кандидатом для создания устойчивости к стрелкованию путем подавления яровизационного ответа. Для этой цели кДНК-фрагмент BvPRR7 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 BvPRR7-фрагмента отделяли вторым инtronом 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, пред назначенную для BvPRR7, 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 BvPRR7 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, c. 129-135.
2. Barany F., Genetic Disease Detection and DNA Amplification Using Cloned Thermostable Ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, c. 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, c. 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, c. 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, c. 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 Boutreau 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, c. 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, c. 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, c. 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, c. 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, c. 69-78.
13. Felsenstein J., Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 1985, c. 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., Ikebara 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. Okamuro 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., Ingianni 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, c. 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, c. 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, c. 1-11.
47. Vos P., Hogers R., Bleeker M. и др., AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21), 1995, c. 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, c. 1077-1082.
49. Wang M.B. и Waterhouse P.M., Application of gene silencing in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 2001, c. 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, c. 388-396.
51. Welsh J. и McCleland M., Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18 (24), 1990, c. 7213-7218.
52. Wu D.Y. и Wallace R.B., *Genomics* 4, 1989, c. 560-569.
53. Ye S., Dhillon S., Ke X., Collins A.R. и Day I.N., An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 29, 2001, c. 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, c. 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, c. 97-166.

Перечень последовательностей

```

<110> Энгента Партиципейнс АГ
<120> Полинуклеотидные маркеры
<130> N1453 РСТ ВС

<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 ttatgtatgtc atctcatgtat tcgtatgggtt tagtcttaaa gtgtttatcc 60
aaggcgcgctg ttgactttctt ggtgaaggct ataaagaaaaa acgaacttaaa aacactttgg 120
cagcatgtttt ggaggagggtg tcacagttctt agtggtagtg gaagtggaaag ctgtgttaagg 180
aatggaaat ccatagaaag caagagggtt gaagatgtcg acaatgacac tgcacatcaat 240
gaggaagatg ataacacaaag cattggttta caagctcggg atggaaatgtga caatggaaatg 300
gggaccctaga gttcatggac aaaaagggtt gcagaagggtt agagccccca accacagtct 360
acatggggac aagcaactga tccacactgtat agcactttgtt ctcaggtcat ttatccaaatg 420
tctgaggcat ttgcacggcag ctggatgttgc ggtatccatgc aggaacttga tggacaggat 480
catcaatatg acaatgtccca aatggggaaat gatgtggata ttggatgttcc tggaaatcc 540
gattcacggc taaatggacc aaacaaaaacgtttaatgttgc caactactgc tgaggaaaaac 600
caatatttacatg agttagacccat caaccaggaa aatgtatgttgc gaagtttgc tggaaatcc 660
ctggatgttgc ataaatgttgc acctaaaaatgttgc gatgtggatgttgc aacaggcttgc tggaaatcc 720
ggaaaaatgttgc aagaacatgttgc tagaggatgttgc aaatgtatgttgc atgcacccacc cggaaatttca 780
aaataaaatgttgc caacatgttgc aggtatgttgc ttctcttgc ctcagttgttgc tggaaatcc 840

<210> 2
<211> 493
<212> ДНК

```

<213> Beta vulgaris

<400> 2
atgtcatctc atgattcgat gggtttagtc ttaaagtgt tatccaagg cgctgttgc 60
tttctggta agcctataag aaaaaaygaa cttaaaaacc ttggcagca tggttggagg 120
agggtcaca gtgttaatgtt ctttacattt tccagctt catcagctt gtgggtcg 180
tagcagtctt tccatatttc gaactttctt gcacatatga caaattaaac ctgcatgcta 240
atccccgatt agataatgaa ataagcttt tccatgttcc ttttacttct ttctcttctc 300
ctttatgaa aactggat gccactatgc atcttgc 360
tttcccttat tccatgttcc ttttatgtt ttaattttaa ttttattttt tccatattt 420
tttttagtc tagtggtagt ggaagtgaaa gctgtgtaa gaatggaaaa tccataggaa 480
gcaagaggc tga 493

<210> 3
<211> 493
<212> ДНК
<213> Beta vulgaris

<400> 3
atgtcatctc atgattcgat gggtttagtc ttaaagtgt tatccaagg cgctgttgc 60
tttctggta agcctataag aaaaaatgaa cttaaaaacc ttggcagca tggttggagg 120
agggtcaca gtgttaatgtt ctttacattt tccagctt catcagctt gtgggtcg 180
tagcagtctt tccatatttc gaactttctt gcacatatga caaattaaac ctgcatgcta 240
atccccgatt agataatgaa ataagcttt tccatgttcc ttttacttct ttctcttctc 300
ctttatgaa aactggat gccactatgc atcttgc 360
tttcccttat tccatgttcc ttttatgtt ttaattttaa ttttattttt tccatattt 420
tttttagtc tagtggtagt ggaagtgaaa gctgtgtaa gaatggaaaa tccataggaa 480
gcaagaggc tga 493

<210> 4
<211> 493
<212> ДНК
<213> Beta vulgaris

<400> 4
atgtcatctc atgattcgat gggtttagtc ttaaagtgt tatccaagg cgctgttgc 60
tttctggta agcctataag aaaaaatgaa cttaaaaacc ttggcagca tggttggagg 120
agggtcaca gtgttaatgtt ctttacattt tccagctt catcagctt gtgggtcg 180
tagcagtctt tccatatttc gaactttctt gcacatatga caaattaaac ctgcatgcta 240
atccccgatt agataatgaa ataagcttt tccatgttcc ttttacttct ttctcttctc 300
ctttatgaa aactggat gccactatgc atcttgc 360
tttcccttat tccatgttcc ttttatgtt ttaattttaa ttttattttt tccatattt 420
tttttagtc tagtggtagt ggaagtgaaa gctgtgtaa gaatggaaaa tccataggaa 480
gcaagaggc tga 493

<210> 5
<211> 15037
<212> ДНК
<213> Beta vulgaris

<400> 5
attattgtac atayawgacy attacgttaa ctasattaa aaaaatgttta aaaaatgcaaa 60
acagaaaata aatcaaata tcgacattt gaaatttata atagaaatgaa ataaaaataa 120
gggagaaaata aatgaagaac aaaaataatg agaaagagaa taaaatggt tcttgaaaaa 180
taaatggagag agaaaaaggag ggaatgttgc agtgtatgaga gagaagagc tggccactt 240
tcaaaaatttc tgccaaatgc ctgccaattt ttggccctcc taaaagcatc aaaaactacgt 300
agttttggcc aagggttgcgat atgttgcatttcc tacacccctcc tgccggatct aatttgcgt 360
tagaaatagg gtcttctat atttcttcttcc tagatgttgc tgccgttgc ggtgttgc 420
atttttttca agatagaaac tcgatgttgc tggacgtatg taaaatgttca aattttaaca 480
tttagacatac aaaaatgttca tggatgttgc tggacgtatg taaaatgttca aattttaaca 540
cttgatgttgc tggatgttgc tggatgttgc tggatgttgc tggatgttgc tggatgttgc 600
ctatgttgc tggatgttgc tggatgttgc tggatgttgc tggatgttgc tggatgttgc 660
acccaaaata aatgttgc tggatgttgc tggatgttgc tggatgttgc tggatgttgc 720
agggatgttgc tggatgttgc tggatgttgc tggatgttgc tggatgttgc tggatgttgc 780

ggagagaaag tagagaataa ttggtaaagg agtattaaatt gtaacatttt ggttgaataa 840
acaaaaggaaa aaacaaaattt caagaagcaa ataaatgaga attgtttoct tgaataatgc 900
aaaagtgggt ttaattccc aaaatatgcc caaaaataaa aaaattccct gtgtaccgtc 960
cacgtaaagc ggcacgacg atttttttt cctacttcaa tacaaccgtc actttaaggta 1020
gcgggttact gatttttttt ttatctact taggtaaaaac cttggcgctg agtgatataa 1080
ctcgctactt caagtagcga ttactgaaa tccccaaactc catagttga tatgtgttgc 1140
caacatttt cccaggtaaa cgcgtactca gggtacgct ttatgtgtat aaaccgtc 1200
ttaaagttagc ggtttttttt aatataaaa actattgtga tgacgggtt acgtggccaa 1260
aaacaaaaaa aaaaatagtt tctcgctgt cgttctactg ggacggtaacg caggaaattt 1320
ttaatttttt gggcatattt tgggactaa aacccactt tgcatttttc aaggaaaaaa 1380
ttcaaaataa tgatggaca cgggtttttt agacaatataa cgaaaaaatg tggactaaa 1440
tatgaaaatg gaaactataat tttgggacac ccaaaatggaa aatgggaatt atatttggg 1500
acggggggg tataattttt tagttgattt ttgaattaag tataactactt catatattgt 1560
taagaaactg gacacttggaa ttcaagtca aatttttgc agatgttattt gacgttgc 1620
tgtattgggtt gtatgttgc agttaattttt tgtttttgc aagtttactc atttgatgt 1680
tttgataataa gtaaaaattt caattttatg attttagtgc atttgtgatg gatgttata 1740
atttttttt cattttttt attgtatattt ccctttgtt tgatgtgaa ttgttataattt 1800
agaaaaggca aggggtaaaa tagtcttcc attcgggaaac accatagttc ccctccctcc 1860
cttatataat aaagatgtat algattttt ataaataatga ttgttaagt gattttttttt 1920
atgtttttgtt atgtattgc gtcctatgtt attagttttt gttttgtt gatattttttt 1980
gtttttgttta agttttccgc taattttgtt gatttttgtt attttttttcaat 2040
ttctatgtat gattttgtttaa gttttttgtt ataaatgtt tttttttttt gttttttttt 2100
tttccgggtt cttttgtttaa accccatttt agtattttt gttttgtt gatattttttt 2160
ggggaaagggg ggtaaaatg gcattttcaaa aaggacacc attgtcccccc cttttttttt 2220
tgytaatttgcg atatctttaaa agatataccgcg gatgttttttccatataaggaa gatttttttt 2280
taaaaaattttt tccatataaggaa agtatttttattt agtaccaatgtt gatgttttttccatattttt 2340
cttgcgcggaa ttgcataatggg gagatattttt gttttgtt gatgttttttccatattttt 2400
ataggatgttcc aaaaaaaaatccatccatggg ttttttttttccatatttttccatattttt 2460
cacatctca ctggtcactt ttttttttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 2520
acaatctgcg acgtgtccgcg ttttttttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 2580
cttttttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 2640
cgtgtcatcc tacgtggccct cttcttctac cccttcactcc tccacgtcaat ctttttttttccatattttt 2700
caaaaaatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 2760
atcttttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 2820
tttgcgaaaa agggaaaaaaa agcacaatctt ttttttttttccatatttttccatatttttccatattttt 2880
agcttcatcg ttttttttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 2940
taattttttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 3000
tttgcgaaaa agggaaaaaaa agcacaatctt ttttttttttccatatttttccatatttttccatattttt 3060
gttttttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 3120
cttttttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 3180
ccatgttatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 3240
gttttttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 3300
aatctatggaa ttgggggttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 3360
ttttttatgtttagaaaaaggaa aatcaatgtt gtttttttttccatatttttccatatttttccatattttt 3420
agtggtgttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 3480
ttttttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 3540
tgggtttaaaaggaa ttgcggatttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 3600
tgaatggatgttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 3660
cttaatcaac atatagttgc ttttttttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 3720
caggggcttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 3780
aggcgcttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 3840
caaccccccagg ggaggtgttccatatttttccatatttttccatatttttccatatttttccatattttt 3900

ctcgttagaaa gtgtgtactc aactcgctat attgttagtg ctttgctacg gaaatgtacg 3960
 tatgaagtg atttgatctg ttttaatccc atatatgcgg tgcgttgc ttatcaccta 4020
 cttcaacaaa tgattaagag aattgtactc ctcgttcca aaataatagc aacacttagc 4080
 ctccccgtag acctttaggg gcgttgggtt catattatgg tatgggttg gaatttagaa 4140
 tgaaaccagg gtggatggg gttggactt gatacttaat accttggatt tgggttcat 4200
 taggaatgaa aaaatttctt ttatgtata ccttagggta aggtatgago cataccacc 4260
 tccccccatg gggttctaaa cccataacct tatgggttg aggtatggg ttaaaattta 4320
 aaaataattt aaacaacac taggtatgtg tttgttcat tccaaaccca tacctcatac 4380
 cttaaaactag tgaaccaac acccccttaa ggatcttggg acaaaggaa tccactacta 4440
 gatctggtga cattaatacc taagtttaca tcagttcac taaaatctt cgttttaaaa 4500
 aaagtaaaaa aacctgttag tctgagtagt ttactaattt ttgttctaa aattcaacac 4560
 attatctaca tgcacact tactgttaca atacaactca aacaatataat gcatcatac 4620
 tggtcacat gaaccgaaaa ctaatctttt catacccttg ttgtatgtt tttcagggc 4680
 atacaaaattt cttaaaccta aattgccttc ctagtactg tccaaatttg cagttttaac 4740
 atcctcaaga ccatgtgatg tactgtttaga ttatataag accctattgt aaataaagca 4800
 tggatagtg aataaaaatgc atgttcttctt actttttttt ggggttcatg aacttattgt 4860
 ttgtatattt gcaatgttag ggggttccaa tggcatagaa gcatggaaaa ttcttagaaga 4920
 tttgagcaat cagattgacc tagtttaac tgaggtagtc acatcaggac tctctggat 4980
 aggtcttc tccaaagata tgagtccaa aagctgccag aatactctg tcatttagtga 5040
 gctttcggtt cttgtttagt tagtgtatgt tctgtatggt atttttttt tttgtgcat 5100
 tcttgccctg ttttttacaa ttattttagat tttagatgaa aatgtataact cattttatgg 5160
 tcttttagctg caacatttgc ttatttgtg tgcagtgatg tcacatctatg attcgtatgg 5220
 ttttagtcta aagtgttattt ccaagggcgc tggttactt ctggtaagc ctataagaaa 5280
 aaacgaactt aaaaacctt ggcagcatgt ttggaggagg tgcacatgt taaatgttctt 5340
 tacattttcc agctttccat cagtttagt gttcggttagt cagttttca aattttcgaa 5400
 cttttgcatac catagtacaa attaaacccctg catgtcaattt cccgatttata taatggata 5460
 agctcttc tgcgttctt tacttcttc tcttccttc ttatgaaaaa ctggtagtgc 5520
 actatgcac tttttccagg ttgttgcattt gtgtttttt cttttatcg tttttttgtt 5580
 tttattttta attttaattt taatttttcc tcattttttt tttagtcttag tggtagtgg 5640
 agtggaaatgt gtgttaaggaa tggaaaatcc attagaaagca agagggttgc agagtcggac 5700
 aatgacactg acatcaatgc ggaagatgtt aacagaagca ttgggttaca agctcgggat 5760
 ggaagtgaca atggaaatgg gaccggatgg tgcataaccctt ctgtatattt aacatttctca 5820
 tagtaggtgtt gttatgttgc acgctgtttaa ggccctttgg gtgggttgc ttatgttact 5880
 aaggataata agaaatgtt cgcattttgtt agttagggca cctcaatatac accttcttt 5940
 gtatgtttgtt tgaactacat tttagtgcac agttgtatgtt ttatcttgc agatagaac 6000
 aggtgcattt ttgggttgcgg ttgtttagtgc ttactgtttat gcaaaatgtt ttggcacat 6060
 ttcttcacac atatttaca tggaaatgtt ctaaccaccc cccaaacccaa aaaaatgggat 6120
 ggagaaatata ctggagatgg gaaagaatgtt acataaaaaa ttagtgcattt gggcatat 6180
 tggatgtgtt atttgtcaag ttagcgcgtt ctcttcgttgc atgttcaaa ataaatgtat 6240
 gcaccataaa gtaccatct tggcttcacc tggatgtgtt gaccggatca atgttccctt 6300
 gttgatctcg agatagacaa agaggaaatgtt taatcttgc ttatgttgc agatagaac 6360
 atttgttagtgc agttagtgc ttttcgttgc ctttgcatttgc acatgttgc ttatgttgc 6420
 tagtaggtgtt attgtatgttca aatttgcatttgc acatgttgc ttatgttgc ttatgttgc 6480
 aaggatttca ggttcaatatac tacaggaaatgg agcgtgttagt gatgtatgttgc ttttcgttgc 6540
 aacaaaatggaa acatcaatgc caactgttgc taatcttgc aagattggat gacaaatgtt 6600
 ggatgttgc acatgttgc ttttcgttgc acatgttgc ttatgttgc ttttcgttgc 6660
 ggatgttgc acatgttgc ttttcgttgc acatgttgc ttatgttgc ttttcgttgc 6720
 ttttcgttgc acatgttgc ttttcgttgc acatgttgc ttatgttgc ttttcgttgc 6780
 agcccttgc acatgttgc ttttcgttgc acatgttgc ttatgttgc ttttcgttgc 6840
 aggtttttttt tggatgttgc aagaataactt gatgttgc acatgttgc ttttcgttgc 6900
 gaaatgttgc ttttcgttgc acatgttgc ttttcgttgc acatgttgc ttatgttgc ttttcgttgc 6960
 ctttgcatttca gtttgcatttca gtttgcatttca gtttgcatttca gtttgcatttca gtttgcatttca 7020

agacaatgg ctgttgcatt catgactgaa attggatgtc cgtactgag cataactat 7080
tagtggttct ctctcaaggt gatataagta tggataacc caatccgtata tatttttcg 7140
aggacatcaa ttgtgtact attcttaggtc gctggagacc catacatata gaggccatg 7200
caattaacac aacttcaac cacttattt tatttcattt aagctatcaa tccctaaagaa 7260
agagcccatc caaagctccg cttaggtgc atccccccc ttttcagctg gtgcacaaaa 7320
aatgaactt cgagatagac tgctaaattt gctttgtcaa gaagacaaaa ttttgataca 7380
caactgtata tgcatttttt gacacttacg ctgtatatac tgcaagtgg gttgatatac 7440
aaaaactatg tagccctccg cgtctacgg aatagatctc cgtcaatgtg atgttgggt 7500
gccccatcaa aatgatattt ggtctttaga ctctgttact ctacagctg aggatcttag 7560
ccctggcatt tatatccccc ttatccaaaa gttaaaaaaa ggggaccgtt tgaccatgt 7620
aaggaaaaaa gaaaggatc gaaaaagaca aaggaggggg aagaagttt atctccctaa 7680
aagcttggtt tggcggtga gagaggggac gacttgaat tgccattgtat gatgatgg 7740
tcacaatgtt aatcgaaaatc aaactcactc tctctctctc tctctctt atcaccctcc 7800
tcaaaatata acatcacatg cctttaaaacg tgacttggg gggggatagt gacttggtag 7860
gatgggcaag ggtcggttgc ggttggggcc tagaccggg ccctaatttt tttttttaga 7920
ccccaaacccg gaccctaaagg gtcgaaaaaa attggaccctt gaccggacc cttagggtct 7980
gaagggtctt gagggttcagg aggggttcagg cttaaattttt ttattttgc aaatttttag 8040
cattattaaat atcataatc atttggaaat cgcataacaa aacacaaaaa aaaaatcgca 8100
tgaatcaaac acaaaaatttgc atgaaaaaaca aacactaaca tataatttgc aaaaaacgaa 8160
acaaaacacaa atttataaaac gaaaaaaaat gaaacaaca caattccaa cutataaaact 8220
gaaaaaaaac acgaaacaaa cacaatata caaaactgaaa aaaaagagaa acaaacacaa 8280
cttacataag agttcagaat ggttggggat ttatgggttt tagtcattt gaaaatcaat 8340
ttgtttttttt tttaaatggta aaatgtatata attaaataag tttaggggtt aaggttgg 8400
aacatttata gggtaatggg ttggaaatctc atatgggtt tagttagaaag aggaggaggt 8460
cttagatcga aaagggttgc gtcataacaaatgggatccgc ggcattgtt ataccaatgt 8520
cgcgagtcgc gacaggcgtc gcccccccgcc accagegccc cgcgcgccttc ttccatgtc 8580
gccccatccgc ttccatgttgc gatggcggaa aaatgcctcc gccccccctt atccgttgc 8640
atgctttgtt gatcattttt atgacttttta aggttggggat atcagtagat taaaaggccctt 8700
tgcgtatgtca ttaagatggg ggttggggatccgc ttccatgttgc tagtcaatgc aatgttgg 8760
atgctttatata aacatggggatccgc ttccatgttgc tgaggatgtt gaaagaaaaatc aaaaatttct 8820
atactctctc aaaaatgttgc ttccatgttgc taagaaaaatc cttgcataatc tctcttgcgt 8880
gttccatgttgc aacacaaaaac acaaggcttgc ttccatgttgc ttccatgttgc aatgttgg 8940
atttgcgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc aatgttgg 9000
gccccatccgc aacacaaaaac acaaggcttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 9060
cttccatgttgc acaaggcttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 9120
ccggccatccgc aaaaatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 9180
agttggggatccgc aacacaaaaac acaaggcttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 9240
ccccatccgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 9300
gggggttttttgc gaaagggggatccgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 9360
gatggatgttgc acaaggcttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 9420
ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 9480
ccaccaatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 9540
tttttttttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 9600
tataaaatata ttttttttttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 9660
cttttttttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 9720
agtttttttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 9780
tttaggtatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 9840
aatttttttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 9900
cttagtgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 9960
atttataaag tagttagatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 10020
gtccgttttttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 10080
ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc ttccatgttgc 10140

agaaggctat tttaaacaga aaagatttag gttacagaaa tcagtatgaa agcaatgagt 13320
 ttcattatag aataggtaga agtagggggtt gtttttccg tactctttag atagaaagtg 13380
 gggatagatt ctggactc gtcagaaagg aataatataat ttgtctaccc ttttcatttt 13440
 tagtctgtt aggagttta ttccacttcc atttttgtaa aattttaggag ttgttaaggac 13500
 gtgttaaagag aatctgccc ccagattta accgacggta aatttggctt ttcatgttt 13560
 totcaagtaa ctataatgtt ttcatgtat ctataggat ttctaatgtt acatctgtata 13620
 gaggcacaca gtaacaataa tataagtaca tataattttt aagaataatg acatagtaat 13680
 tataatttttta atacaataa aagatgtctt tatgtatgtaa aacaataaac tttcccttga 13740
 aggtatgccaa taattaatta ctttttttt aagatattttt atatttagtt tgggttagtgg 13800
 aactactaaa taaaatataatg gttatgtaa catgtactca tggcgaacc gaaaaaaacc 13860
 ctatgttttc tctaaaatgtt cccaaacccct tgagcttata gccccacgg cccagcgcag 13920
 gtttgcgttgc gccgcgcgtc gtcacccctg tcgcgcacga gcctgcatgt cgtatgttc 13980
 ggttttctgtt aggttttagtt ttccctgttc ctctttgtgtt tattcatgtt tcccatcccc 14040
 catgtctccc ctccccctgtt cagtggtgtt cggccctcccc ttcccttattt aatgggtgtc 14100
 ggcctccccctt ccctttccctt ctaatgtgtt ttgtgtgtt cccctccccctt tttcatgtt 14160
 tcaagttgtt cttttccctt ttctccctt tcttagtctt cttttgtgtt tttttgtgtt 14220
 gtttagtttag tggctttgtt tggtagtttc ggctgagtgc ttgcgtcgat tttttttttc 14280
 cttgttcccccc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 14340
 aaacgtggaa gggcctcagg attttagat aaaggatcatc attctcgcc ttagacgtga 14400
 ggggattaa gtgttcaggaa ataaaggctc cttttttttt cttttttttt cttttttttt 14460
 aaggatcttag gttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt 14520
 agatgacatgtt gcaatgtggg gattaatcat ttgcgtttttt tttttttttt tttttttttt 14580
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 14640
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 14700
 aaaaatgtact tactgggttc agatcaagaa tttttttttt tttttttttt tttttttttt 14760
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 14820
 catatcatgg aagcggtttc gaagcgtgtt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 14880
 cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 14940
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 15000
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 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

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 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 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

gagggtcac agtgtaaatg tct

23

<210> 8

<211> 25

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> праймер PRR7(T1)-R

<400> 8

aaagactgct acacgaaacc ctaag

25

<210> 9

<211> 14

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> зонд PRR7(T1)-FAM

<400> 9

ctgatgaaaaa 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 atgattcgtat ggg	23
<210> 12	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> праймер BvPRR7	
<400> 12	
tcagccctct tgcttcctat g	21
<210> 13	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> праймер BvBTU	
<400> 13	
ttgttgaaaa tgcagacgag 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 gaaaatc	27
<210> 19	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	

```

<220>
<221>  праймер F3354

<400> 19
atgtcatctc atgattcgat ggg          23

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

<220>
<223> праймер R3355

<400> 20
tcagccctct tgcttcctat g          21

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

<220>
<223> праймер F3768

<400> 21
tttctcatt ctttttttag tcttagtggt          29

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

<220>
<223> праймер R3769

<400> 22
aatatgtgtg agaaaaatggg ggca          24

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

<220>
<223> праймер F3782

<400> 23
tcycatggg aaaggatttg          20

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

<220>
<223> праймер R3783

<400> 24
aatttcgggt ggtgcatacg          20

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

<220>
<223> праймер F3784

<400> 25
gcccccaacc acagtctaca          20

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

<220>
<223> праймер R3785

<400> 26
ggtccatcta gccgtgaatc tg          22

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

<220>
<223> праймер F3806

<400> 27
tttttgcata cccaaaggcg          20

```

<p><210> 28 <211> 28 <212> ДНК <213> Искусственная</p> <p><220> <223> праймер VR3807</p> <p><400> 28 catttgtga agtaggtgat aaggacaa</p>	28
<p><210> 29 <211> 28 <212> ДНК <213> Искусственная</p> <p><220> <223> праймер F3808</p> <p><400> 29 ttagatcctc tcccttagac tcttctgt</p>	28
<p><210> 30 <211> 29 <212> ДНК <213> Искусственная</p> <p><220> <223> праймер R3809</p> <p><400> 30 tcaccaattc tttatatcat atcatgaca</p>	29
<p><210> 31 <211> 28 <212> ДНК <213> Искусственная</p> <p><220> <223> праймер F3810</p> <p><400> 31 gagaaaaggg ttttagatgg taagttt</p>	28
<p><210> 32 <211> 27 <212> ДНК <213> Искусственная</p> <p><220> <223> праймер R3811</p> <p><400> 32 aactttaacc catcatgtct tttcaac</p>	27
<p><210> 33 <211> 25 <212> ДНК <213> Искусственная</p> <p><220> <223> праймер F3853</p> <p><400> 33 aactggacac ttggatttca agtca</p>	25
<p><210> 34 <211> 26 <212> ДНК <213> Искусственная</p> <p><220> <223> праймер R3854</p> <p><400> 34 ttatggggaaa aaactctcggttattct</p>	26
<p><210> 35 <211> 27 <212> ДНК <213> Искусственная</p> <p><220> <223> праймер F3855</p> <p><400> 35 gaaccccat ttagtattga catttct</p>	27
<p><210> 36 <211> 30 <212> ДНК <213> Искусственная</p> <p><220> <223> праймер R3856</p>	

<pre> <400> 36 aatttagatga ataaaaaagac aaatgaggaa </pre>	30
<pre> <210> 37 <211> 26 <212> ДНК <213> Искусственная <220> <223> праймер F3857 </pre>	
<pre> <400> 37 tcacatggag gagtaggtat gagtag </pre>	
<pre> <210> 38 <211> 22 <212> ДНК <213> Искусственная <220> <223> праймер R3858 </pre>	
<pre> <400> 38 cttcgaccat cattttccctg gt </pre>	
<pre> <210> 39 <211> 27 <212> ДНК <213> Искусственная <220> <223> праймер F3859 </pre>	
<pre> <400> 39 ggaaaaaccaa tattcacagt tagacct </pre>	
<pre> <210> 40 <211> 21 <212> ДНК <213> Искусственная <220> <223> праймер R3860 </pre>	
<pre> <400> 40 tcttgagctg ctgatccacg t </pre>	
<pre> <210> 41 <211> 21 <212> ДНК <213> Искусственная <220> <223> праймер F3861 </pre>	
<pre> <400> 41 ctgcatctgg taagcctgg t </pre>	
<pre> <210> 42 <211> 18 <212> ДНК <213> Искусственная <220> <223> праймер R3862 </pre>	
<pre> <400> 42 cgtacctggc gcacgaat </pre>	
<pre> <210> 43 <211> 24 <212> ДНК <213> Искусственная <220> <223> праймер F3863 </pre>	
<pre> <400> 43 aatttggcca tttcttgctt gtat </pre>	
<pre> <210> 44 <211> 20 <212> ДНК <213> Искусственная <220> <223> праймер R3864 </pre>	
<pre> <400> 44 aatgtgaccc gtaaacgcct </pre>	
<pre> <210> 45 <211> 26 <212> ДНК <213> Искусственная </pre>	

<220>		
<223>	праймер F3865	
<400> 45	ggtgtgatgc atataatctt gtttgg	26
<210> 46		
<211> 16		
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	праймер R3866	
<400> 46	agcaaggctcg cgctgg	16
<210> 47		
<211> 13		
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	зонд PRR7 (№3827) - FAM	
<400> 47	acaggcattca gcc	13
<210> 48		
<211> 15		
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	зонд PRR7 (№3827) - VIC	
<400> 48	tcacagggct 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 cgacttctca gc	22
<210> 51		
<211> 24128		
<212>	ДНК	
<213>	Beta vulgaris	
<400> 51	maaacgttgt gatcatctaa tattattgaa tatattatct ccataactt tcctaataatt	60
atttatgtta ttacacttga tcgaggacaa aatccttcaa tctccactt gtctaaagaa	120	
aagtgtgtaa cttctaaact cttcaagtgc cttaatgtct aacttggatga catgataaca	180	
tcatatgttc atcataacaa tattcaagtgc gtcccttgc aaatcgatgtt gaaatgtcga	240	
aacaaatgtat taacttctta atccatgttgc gcacggccat gcattttcag ttctcactt	300	
tcaaggggcc aagcacaccaa tccttaactct taggaggact tatccaatct tggatgacca	360	
aagctccac tcaatttata gcagttccaa tcgctgttt tataacccctcc ttttacggca	420	
cggcggtttt cagcggtcaag aacataactaa tccttaagta agaacatgtt ctaactcatgt	480	
tcaaaaggat ccataaataa tattataag agtctcataa acctttttaga gaactccac	540	
taggtctgtcc cagcggtgtat caacttatac agccttatgc aatgactgatca catctccatgt	600	
tccctatagc ccattaaactt ggccttatcaa tcaacttgc atcttagtcca tggaaattgaa	660	
tcattttacgt tcaacttaat gatcgaaact aggactaaag gtatattata actccgttgc	720	
actggataga gttccatcg tcaatttacg tattttgacaa ttcttatcaa cgttataaaa	780	
tactttgaaac gttttatata atactaaacc aagatataat aagaacaaaa cttttattga	840	
taaaacataaa cataacatata caaaaggatgaa aattataact gtgaaactaat taaaatgtaaa	900	
tagtacacaa taaaacccac tctcttatat gcttaagccc tatagccctaa gtatgactct	960	

catgcttggg ctgtggcaa a gtttagtca aaggatcgc gacattacta tccgtatgaa 1020
 ccttgcacac tattacatcc ttctctcaa cgattctcg aatgagatga aactttctaa 1080
 gtacatgtt acatctttga t tgatcttg gttctttaga ctgagctatg gacccattgt 1140
 tatacacaatg taaaacaata ccatctccaa cactaggcac tactcctagc tccagaatga 1200
 acttcttcat ccaaacggct tctttctcg cactgtcgc ageaataatac tcagcttctg 1260
 tctgatgtt acgacatgt ctggatcttg aactttccaa gtcactgccc cttccattta 1320
 gacaaagat gaaaccatg tggatcgga aatcatctt gtcagttgg aaacttgcat 1380
 ctgtgtacc ctcacaattt aacttcttt tacctccata cactaagaaa ttatcttag 1440
 tccctctcaa gtatcttagt atatcttagt ctgcacttca gttgtcgatca cttggatttg 1500
 attggaaatct gtcacacatg ctcaaggcat atgaaacatc tggcgatgtt cttttatgg 1560
 agtacataat ggacccataa gctgacatgt aaggaacattt acttcttcgc ttatctcat 1620
 caggccatg aggacactga gtcttgcata ggcacactcc atgttgcgtt ggttaggaagc 1680
 ctctcttaga gttttccatg ttgaaatctt tgacatctt atctatataa gttcgatgg 1740
 taaatccatg catcttcttta gacccatacc tatacatctt gatccccaaa atatactgg 1800
 ctgttttgcg gttttccata gaaaaacaaat ttttttacca ttcccttactt gactcaagca 1860
 tggaaatgtt gtttccatgtt agaaatgtt catctacata caagaccaag aagatctgt 1920
 tactccactt ttcccttcttta aaaaacaaatg acttcttcgc atttttaaagaa aacccaaact 1980
 cttttgatttc ctcataaaa cgaatgttcc aactccgtga tgcttgcctt aatccataaa 2040
 tggatttttt aagcttacat accctcttagt gattttctgg atccacaaaaa ccctccggct 2100
 gtgtcatata cacatccctt ttcaagaacc cattcaagaa aacgggtttt acatccattt 2160
 gccaatctc gtaatcatag aaggccggcga tgcgttaggat tccgttgcgtt gatttaaagca 2220
 tggctaccgg tggaaatgtt tgcgtatgtt ctatccatgtt aacttgcgtt aaccctttt 2280
 caaccaactt tggatgttgc acctgtatgtt tccatccctt gtcgttgcgtt acctttggaa 2340
 cccatttgcg accaataggtt gtgtccatgtt cggggaaatcc tccaaatgtt catacttgc 2400
 ttccatccatgtt ggttccatgtt tggatgttgc accttttgcg gatgttccatgtt 2460
 tcatcaaaatc ttgtttgtaa gtagtaggtt ctcataatcc taaaatccatgtt atctcagaat 2520

 ttccatccatgtt caagaaatcc acaaaatctt tggatgttgc accttttgcg gatgttccatgtt 2580
 gagggggctgc aacaggagaa attttttgcg caacaatatg agaattttcg caccgttgc 2640
 attcgatgtt gacaataggtt gtttttttttgcg gtttttttttgcg gtttttttttgcg 2700
 ttatgggaga agatccatgtt caacatgtt gtttttttttgcg gtttttttttgcg 2760
 tgcgttgc ttcataatcc tggatgttgc accttttgcg gatgttccatgtt 2820
 gaaatccatgtt acctccactt gtcgttgc gtttttttttgcg gtttttttttgcg 2880
 gacgagacaaac aacacttttgcg gtttttttttgcg gtttttttttgcg 2940
 ttggataacc cacaagaaaa cacttccatgtt attttaggggc gatgttccatgtt 3000
 gtcgttgc gtttttttttgcg gtttttttttgcg gtttttttttgcg 3060
 tccatccatgtt atatgggttcc ttcataatcc tggatgttgc accttttgcg gtttttttttgcg 3120
 tagcgttgc gatgttccatgtt gtttttttttgcg gtttttttttgcg 3180
 accgttgc gtttttttttgcg gtttttttttgcg gtttttttttgcg 3240
 ttccatccatgtt atatgggttcc ttcataatcc tggatgttgc accttttgcg gtttttttttgcg 3300
 gggttccatgtt ttcataatcc tggatgttgc accttttgcg gtttttttttgcg 3360
 ttttttttgcg gtttttttttgcg gtttttttttgcg gtttttttttgcg 3420
 aatggatgtt gtttttttttgcg gtttttttttgcg gtttttttttgcg 3480
 cccttccatgtt ttcataatcc tggatgttgc accttttgcg gtttttttttgcg 3540
 tgcgttgc gtttttttttgcg gtttttttttgcg gtttttttttgcg 3600
 cacacacatgtt aatgggttcc ttcataatcc tggatgttgc accttttgcg gtttttttttgcg 3660
 gatgttccatgtt ttcataatcc tggatgttgc accttttgcg gtttttttttgcg 3720
 cgatgttccatgtt ttcataatcc tggatgttgc accttttgcg gtttttttttgcg 3780
 atagaccatgtt aatgggttcc ttcataatcc tggatgttgc accttttgcg gtttttttttgcg 3840
 aacccatgtt aatgggttcc ttcataatcc tggatgttgc accttttgcg gtttttttttgcg 3900
 ttttttttgcg gtttttttttgcg gtttttttttgcg gtttttttttgcg 3960
 aaggttccatgtt aatgggttcc ttcataatcc tggatgttgc accttttgcg gtttttttttgcg 4020
 gttccatgtt ttcataatcc tggatgttgc accttttgcg gtttttttttgcg 4080

cactattgtg agtagcgggt tacgtggca aaaaacaaaa aaaaaatagt ttctcgctg 10380
 tctgtcttacg tggacggtag gcaggaaattt tttaattttt tgggcatatt ttgggaaacta 10440
 aaaccactt ttgcattattt caaggaaaa attcaaataa atgatgggc acgggttttc 10500
 tagacaattt acgaaaaat gtgaaactaa atatgaaaat ggaaactata ttttggaca 10560
 cccaaaatgg aatggaaat tataatggg gacgggggg gtataattttt ttagttgatt 10620
 ttgttaattt gataactact tcatatattt ttaagaaact ggacacttgg atttcaagtc 10680
 aaatttttt gatgtatgtat tgacgttgta gtgtatttgg ttagtttattt aagtttaattt 10740
 ttgtttttgt aatgtttactt catttggatg tttttttttt ccattttttt tatttgaatc 10800
 gattttttttt gacttggtag tgattttttt aatttttttt ccattttttt tatttgaatc 10860
 tccctttttt ttgtatgtat tttttttttt tagaaaggca aagggtttaaa atagttcttt 10920
 catteggaa caccatattt cccctccctt cctttatataa taaagatgtat gatgtttttt 10980
 gataataatg atttttttt gatattttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 11040
 tattttttttt agttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 11100
 tttttttttt gatttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 11160
 tataagttgtat ttctgtatgg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 11220
 tagttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 11280
 aaaaaggacac catttgccttcc cccctccctt atgtatgtat gatatctttt tttttttttt 11340
 agagttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 11400
 tagtaccaag tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 11460
 ggtgtttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 11520
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 11580
 ctattttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 11640
 actttagatca atttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 11700
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 11760
 cccctttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 11820
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 11880
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 11940
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12000
 agttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12060
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12120
 agcttggtaga tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12180
 atttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12240
 aaaaaggatgg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12300
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12360
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12420
 aatttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12480
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12540
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12600
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12660
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12720
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12780
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12840
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12900
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 12960
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 13020
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 13080
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 13140
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 13200
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 13260
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 13320
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 13380
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 13440

taatagatct ccgtcaatgt gatgtttgtg tgccatcata aaatgatataa gggcttttag 16620
actctgttac tctacacgtg aaggatctta gccttggc ttatatccctt ttatccaaa 16680
agttaaaaaa agccggaccgt ttgaccatg taaggaaaaa gaaaggaaat cgagaaagac 16740
aaaggagggg aagaagatgt aatctcttta aaagcttgg ttgtcggtg agagaggag 16800
cgacttgaaa ttgcatttg tgatgttgg ttccaaatgt taatcgaaat caaaatcact 16860
ctctctctct ctctctctct tatcccccc ctcaaaatct aacatcacag tcccttaaac 16920
gtgactgtt cggggatag tgactgttag ggatggccaa gggtcggtc tggctggacc 16980
ctagaccgg accctaattt tttttgttag acccaaaaccc ggaccctaag ggtctgaaaa 17040
aattggacct tgacccagac ccttagggtc tgaagggtct agagggtcag gagggtccag 17100
gcttaaattt ttattttgc caaatttta gcatttataat tatcaataat catttgaaaat 17160
tcgcatgaaa caaacacaaa aaaaatcgt atgaatcaaa cacaaaaattt cgcgtatgaaa 17220
aaacactaac atataaattt aaaaaaacga aacaaacaca aacttataaa cgaaaaaaat 17280
tgaacaaac acaattccaa acatataac tgaaaaaaaaa aacgaaacaa acacaaatata 17340
acaaactgaa aaaaagaaga aacaaacaca acttacatataa gagttcgaa tgggtgttat 17400
agtttattgt ttgtcattt agaaaaatcaa ttgtttttt tttaaaatgtt aaaaatgtata 17460
tattaaataa gtttagggtc taagggtgtg gaacattttt agggtatgg gtttggaaact 17520
catatggtaa tgacttagaa gaggaggagg tctagatgc aaaaatgttag agtgcataa 17580
gtgttacaaac cgccgttgc tatataatgc tccgtggatcg cgcaggcgt cgggttcgc 17640
gaccaggcccccc tggcgaggtt cttegtatgt cgccgttgcgtt gtaatgcgaa 17700
aaaatgcctt ggcgggttttataccgtt gatgtttttt tgcattttt aatgtttttt 17760
aagggtttttt aatcgtatgaa ttaaaggccctt tgcgtatgtt attaagatgg ggggtttatgt 17820
atataacactt ctatgtatgtt aatgtttgtt tgcatttttataa ctttttttttgcgaa 17880
gtgaggagtt agaagaaaaat cagaattttc tataactctct caaaatgtt cttgttttgc 17940
ttaagagaaa ccttgcatac ttcttttttttttgc ttttttttttttgc 18000
tgcgttgcatac ctttgcatac ctttgcatac ctttgcatac ctttgcatac 18060
tatttcgtgt taacccgggtg atcccttaggg ggcgaaatataaacttgg aacgcgtatgt 18120
ttccgtgcgt tggatgtggaa tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 18180
ccgggttggg tccaaatttt aagaccggca cccggaccctt aaaaatccca ctggaccctt 18240
gaccggacc cggactctta gggctgttgc aagttggacc ctttttttttgc aatgggttc 18300
gggtccaaaca ggggtccgggtt accccatgcctt atccctgttgc tttccgttgc 18360
ccattgtcgttgc atattgtatgtt aatgttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 18420
atgttttaaag aatgttttttgc aaggtatgtt aatgttttttgc tttccgttgc tttccgttgc 18480
gtgaaatgttgc gggactgttgc ttttttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 18540
atgttttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 18600
tgcataatataa attttttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 18660
tgcataatataa attttttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 18720
tgcataatataa attttttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 18780
atgtgttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 18840
tttttttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 18900
tttttttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 18960
taatccgttgc aacgttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 19020
tcacatccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 19080
tagtgcataatataa attttttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 19140
tgcataatataa attttttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 19200
ctaaatccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 19260
tgcataatataa attttttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 19320
tgcataatataa attttttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 19380
tgcataatataa attttttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 19440
tgcataatataa attttttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 19500
tgcataatataa attttttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 19560
tgcataatataa attttttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 19620
tgcataatataa attttttttttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc tttccgttgc 19680


```

ccaaataataa gttcagaagc agcaaagcag tcccatttt atgetccaca tcaaattcg 1560
aatacgatg gtaacaataaa caaatatgggc tctactacta ataaggctt caaaaagcct 1620
gctatggaca ttgataagc acctgcaaaa tcaacagtca actgttctca tcaattcacat 1680
gtgttgagc cagtgcagaa ttccccatatg tctaataataa accttactgc atctggtaag 1740
cctgggttg gtcgcgtaaa tggtatgtcg caaagaaacg taccagtaaa tgctgttctg 1800
ccgcagaaaa ataacgtggc tcagcagctc aagattcagc accaccatca ctaccatcat 1860
tacgatgtcc atagtgtaca gcagatccaa aaggttctg ttcaacataa tatgccccaa 1920
agcaaggatg tgacagcacc cccacagtgt gggcttccaa acactttagt atcgccaaatt 1980
gaagcaaatg ttgcacattt cagtttgaat ggaagtggta gtggaaagca tcatggagc 2040
aatttcctta atggaatgt tgctgtgtg aatgttgaag gaacaaacat ggtcaatgtat 2100
agtggatag ctgcaaaaaga tggtgctgaa aatggaaatgt gtatggaaatggatgggt 2160
agtggtagtg gtgttgggtg ggtcaatgt cgtacgttc aacgagaagc tgccttgaat 2220
aaattccgtc tcaagcgtaa agaaagatgc tttgacaaaa aggtgcgtata tcaaaggcaga 2280
aagaatgtt cagatcaag acctcgtgtt cgtggcaat tgcgtgcgtca ggtacgagaa 2340
aacaaggaa 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 сахарной свеклы.

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 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 5, ассоциированный с однолетним типом развития сахарной свеклы.

жении 11143, С в положении 11150, А в положении 11220, С в положении 11238, Т в положении 11299, А в положении 11391, Г в положении 12053, А в положении 12086, Т в положении 12127, А в положении 12193, А в положении 12337 и Г 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 Г в положении 3695, С в положении 3827, Т в положении 3954, Т в положении 5284, Г в положении 5714, Г 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, Г в положении 12053, Г в положении 12086, Т в положении 12127, А в положении 12193, А в положении 12337 и Г 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 Г в положении 3695, А в положении 3827, А в положении 3954, С в положении 5284, Т в положении 5714, А в положении 10954, Г в положении 11043, С в положении 11143, С в положении 11150, С в положении 11220, С в положении 11238, Т в положении 11299, Г в положении 11391, А в положении 12053, Г в положении 12086, С в положении 12127, Г в положении 12193, Г 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) ренатуруются 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 С/Т 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 С/Т 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;

с) "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 А/Г SNP, соответствующего положению № 406 в SNP SEQ ID NO: 5; где наличие Г 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;

д) "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-

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;

1) "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 различия однолетних и двухлетних 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 миссматчем 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 различия однолетних и двулетних растений сахарной свеклы.

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

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

б) анализ в указанном образце инtronной 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, ассоцииированного 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, ассоцииированного с однолетним типом развития сахарной свеклы, включающий:

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

б) секвенирование нуклеотидной последовательности инtronной 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, ассоцииированного с двулетним типом развития сахарной свеклы, или с последовательностью SEQ ID NO: 3, которая является последовательностью аллеля, ассоцииированного 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, ассоцииированного 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 инtronная 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, ассоцииированного 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.

Фиг. 1

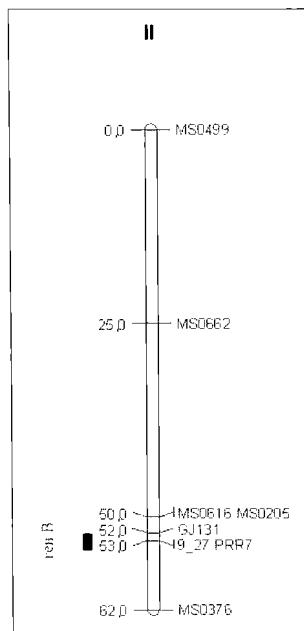
CV001106	PVIMMSSHDSMGLV PVIMMSSHDSMGLV	KCLSKGAVDFLVPIRKNELK KCLSKGAVDFLVPIRKNELK	LWQHWRRC LWQHWRRC	SSSGSGSES SSSGSGSES	CV C	1 1
AT-PKR7	PVIMMSSHDSMGLV	KCLSKGAVDFLVPIRKNELK	LWQHWRRC	SSSGSGSES	C	214
CV101306	NSKSKWNSKEA- KSF SKW- TCKSKWNSKEA	NSDNDI NSD C NSDGS	EEWNSIGL-A EEWNSIGL-A GGSQ	QSSWTKIA QSSWTKIA QSSWTKIA	PSWPSAV PSWPSAV PSWPSAV	367 367 274
AT-PKR7	NSKSKWNSKEA- TCKSKWNSKEA	NSDNDI NSD C NSDGS	EEWNSIGL-A EEWNSIGL-A GGSQ	QSSWTKIA QSSWTKIA QSSWTKIA	PSWPSAV PSWPSAV PSWPSAV	367 367 274
CV101306	STWEEATDHP S WEE- S IEEW-	DSTCAQWV DSTCAQWV DSTCAQWV	PSNDPASNS PSNDPASNS PSNDPASNS	PSNDPASNS PSNDPASNS PSNDPASNS	PSNDPASNS PSNDPASNS PSNDPASNS	581 581 389
AT-PKR7	STWEEATDHP S WEE- S IEEW-	DSTCAQWV DSTCAQWV DSTCAQWV	PSNDPASNS PSNDPASNS PSNDPASNS	PSNDPASNS PSNDPASNS PSNDPASNS	PSNDPASNS PSNDPASNS PSNDPASNS	581 581 389
CV001106	PSDPSKNSQENKTVKLA P-S-D-P-S-L-S PSKQDLE-	PSDPSKNSQENKTVKLA PSDPSKNSQENKTVKLA PSKQDLE-	PSDPSKNSQENKTVKLA PSDPSKNSQENKTVKLA PSKQDLE-	PSDPSKNSQENKTVKLA PSDPSKNSQENKTVKLA PSKQDLE-	PSDPSKNSQENKTVKLA PSDPSKNSQENKTVKLA PSKQDLE-	711 711 598
AT-PKR7	PSDPSKNSQENKTVKLA P-S-D-P-S-L-S PSKQDLE-	PSDPSKNSQENKTVKLA PSDPSKNSQENKTVKLA PSKQDLE-	PSDPSKNSQENKTVKLA PSDPSKNSQENKTVKLA PSKQDLE-	PSDPSKNSQENKTVKLA PSDPSKNSQENKTVKLA PSKQDLE-	PSDPSKNSQENKTVKLA PSDPSKNSQENKTVKLA PSKQDLE-	711 711 598
CV001106	NSPDK S-A-C-H-N LAP	VEEPV -H-N LAP	PSV -H-N LAP	PSV -H-N LAP	PSV -H-N LAP	765 765 765

Фиг. 2

Фиг. 3-1

		1001	1000
ALPERT_CDS	(1416)	AGTGGAACTGAAAGCCGAAAGCCTCATCTCAAGAAGCTGCTGAAATGAAAGAAATTGAA	1360
ALPERT_PIR	(1022)	AGTGGAACTGAAAGCCGAAAGCCTCATCTCAAGAAGCTGCTGAAATGAAAGAAATTGAA	
CV361305	(1587)	AGTGGAACTGAAAGCTCTTCTTAAAGTAAAGGAAAGCTGAAAGCTGAAAGAAATTGAA	1140
		1001	
ALPERT_CDS	(1761)	AAATCTGAACTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAA	
ALPERT_PIR	(1681)	AAATCTGAACTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAA	
CV361305	(1244)	GAGTGGGAACTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAA	1200
		1141	
ALPERT_CDS	(1761)	GCTAGTGGAACTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAA	
ALPERT_PIR	(174)	GCTAGTGGAACTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAA	
CV361305	(174)	GCTGGGAACTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAAAGCTGAA	1260
		1201	
ALPERT_CDS	(772)	
ALPERT_PIR	(1261)	AATCTAAATATACAGCAGGAAAGCTATCTCTTTAAAAATTCTTAACTGAAATTTAGG	
CV361305	(1300)	1320
		1261	
ALPERT_CDS	(772)	
ALPERT_PIR	(1261)	GTTTGATGATGAACTCTGCTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAA	
CV361305	(1300)	1360
		1261	
ALPERT_CDS	(772)	
ALPERT_PIR	(1261)	CTAACGAAATGCTAGAACTCTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAA	
CV361305	(1300)	1360
		1261	
ALPERT_CDS	(772)	
ALPERT_PIR	(1261)	CTAACGAAATGCTAGAACTCTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAA	
CV361305	(1300)	1440
		1261	
ALPERT_CDS	(772)	
ALPERT_PIR	(1261)	AAAAATTCTTCTAGCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA	
CV361305	(1300)	1520
		1261	
ALPERT_CDS	(772)	
ALPERT_PIR	(1261)	TTATTTGGACATGCTTTTCTGAGCTTTTATTTGACATGCTTTTATCTGAA	
CV361305	(1300)	1560
		1261	
ALPERT_CDS	(772)	
ALPERT_PIR	(1261)	TTATTTGGACATGCTTTTCTGAGCTTTTATTTGACATGCTTTTATCTGAA	
CV361305	(1300)	1560
		1261	
ALPERT_CDS	(894)	TGACAGTCCTACAGGCGCTGCTATCTTACAGGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	
ALPERT_PIR	(1581)	TGACAGTCCTACAGGCGCTGCTATCTTACAGGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	
CV361305	(1421)	1560
		1551	

Фиг. 3-2



Фиг. 4

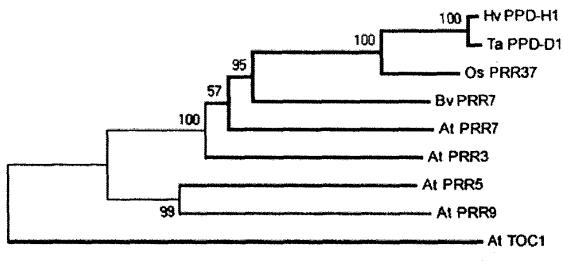


Фиг. 5

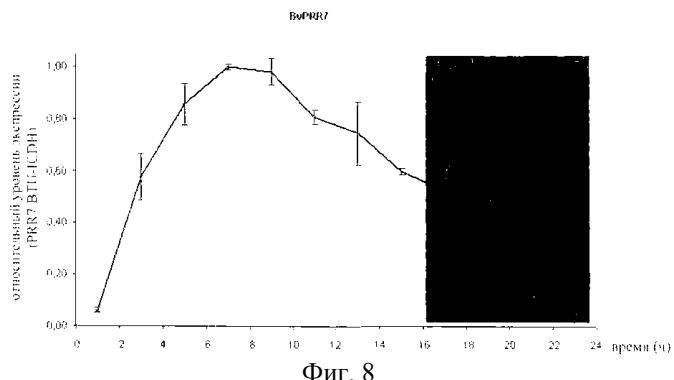
1 69
 ATPRR3
 ATPRR5
 ATPRR9
 ATTOC1
 ATPRR7
 BvPRR7
 61 120
 ATPRR3 MRCNNIETGDEVETTERQVPLS...[RE]ERVE
 ATPRR5 VLEFFALFSPFISPLTNILICPVTVSLSLEEL...[RE]EVETV
 ATPRR9 ...[RE]EVETV
 ATTOC1 ...[RE]EVETV
 ATPRR7 ...[RE]EVETV
 BvPRR7 ...[RE]EVETV
 121 180
 ATPRR3 ...[RE]EVETV
 ATPRR5 ...[RE]EVETV
 ATPRR9 ...[RE]EVETV
 ATTOC1 ...[RE]EVETV
 ATPRR7 ...[RE]EVETV
 BvPRR7 ...[RE]EVETV
 181 240
 ATPRR3 ...[RE]EVETV
 ATPRR5 ...[RE]EVETV
 ATPRR9 ...[RE]EVETV
 ATTOC1 ...[RE]EVETV
 ATPRR7 ...[RE]EVETV
 BvPRR7 ...[RE]EVETV
 241 300
 ATPRR3 ...[RE]EVETV
 ATPRR5 ...[RE]EVETV
 ATPRR9 ...[RE]EVETV
 ATTOC1 ...[RE]EVETV
 ATPRR7 ...[RE]EVETV
 BvPRR7 ...[RE]EVETV
 301 360
 ATPRR3 ...[RE]EVETV
 ATPRR5 ...[RE]EVETV
 ATPRR9 ...[RE]EVETV
 ATTOC1 ...[RE]EVETV
 ATPRR7 ...[RE]EVETV
 BvPRR7 ...[RE]EVETV
 361 420
 ATPRR3 ...[RE]EVETV
 ATPRR5 ...[RE]EVETV
 ATPRR9 ...[RE]EVETV
 ATTOC1 ...[RE]EVETV
 ATPRR7 ...[RE]EVETV
 BvPRR7 ...[RE]EVETV
 421 480
 ATPRR3 ...[RE]EVETV
 ATPRR5 ...[RE]EVETV
 ATPRR9 ...[RE]EVETV
 ATTOC1 ...[RE]EVETV
 ATPRR7 ...[RE]EVETV
 BvPRR7 ...[RE]EVETV
 481 540
 ATPRR3 ...[RE]EVETV
 ATPRR5 ...[RE]EVETV
 ATPRR9 ...[RE]EVETV
 ATTOC1 ...[RE]EVETV
 ATPRR7 ...[RE]EVETV
 BvPRR7 ...[RE]EVETV
 541 600
 ATPRR3 ...[RE]EVETV
 ATPRR5 ...[RE]EVETV
 ATPRR9 ...[RE]EVETV
 ATTOC1 ...[RE]EVETV
 ATPRR7 ...[RE]EVETV
 BvPRR7 ...[RE]EVETV
 601 660
 ATPRR3 ...[RE]EVETV
 ATPRR5 ...[RE]EVETV
 ATPRR9 ...[RE]EVETV
 ATTOC1 ...[RE]EVETV
 ATPRR7 ...[RE]EVETV
 BvPRR7 ...[RE]EVETV
 661 720
 ATPRR3 ...[RE]EVETV
 ATPRR5 ...[RE]EVETV
 ATPRR9 ...[RE]EVETV
 ATTOC1 ...[RE]EVETV
 ATPRR7 ...[RE]EVETV
 BvPRR7 ...[RE]EVETV
 721 780
 ATPRR3 ...[RE]EVETV
 ATPRR5 ...[RE]EVETV
 ATPRR9 ...[RE]EVETV
 ATTOC1 ...[RE]EVETV
 ATPRR7 ...[RE]EVETV
 BvPRR7 ...[RE]EVETV
 781 840
 ATPRR3 ...[RE]EVETV
 ATPRR5 ...[RE]EVETV
 ATPRR9 ...[RE]EVETV
 ATTOC1 ...[RE]EVETV
 ATPRR7 ...[RE]EVETV
 BvPRR7 ...[RE]EVETV
 841 900
 ATPRR3 ...[RE]EVETV
 ATPRR5 ...[RE]EVETV
 ATPRR9 ...[RE]EVETV
 ATTOC1 ...[RE]EVETV
 ATPRR7 ...[RE]EVETV
 BvPRR7 ...[RE]EVETV
 901 960
 ATPRR3 ...[RE]EVETV
 ATPRR5 ...[RE]EVETV
 ATPRR9 ...[RE]EVETV
 ATTOC1 ...[RE]EVETV
 ATPRR7 ...[RE]EVETV
 BvPRR7 ...[RE]EVETV
 961 1000

Фиг. 6-1

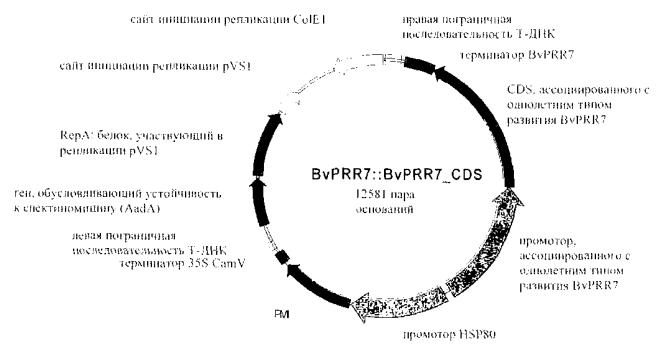
Фиг. 6-2



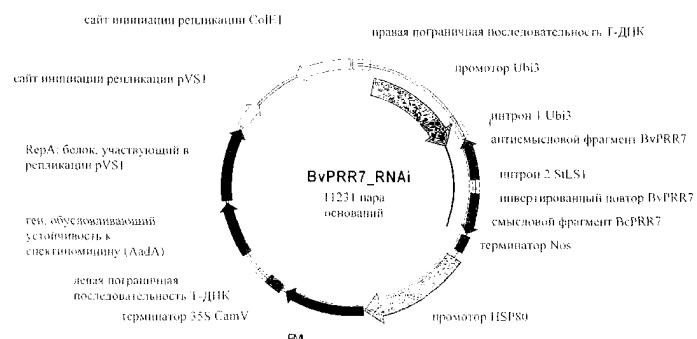
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

