



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94451 (13) C2  
(51) МПК  
C12N 15/40 (2006.01)  
C12N 15/82 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) Р15 ШПИЛЬКОВІ СТРУКТУРИ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

1

2

(21) a200812749

(22) 02.05.2007

(24) 10.05.2011

(86) PCT/EP2007/054259, 02.05.2007

(31) 11/418,384

(32) 03.05.2006

(33) US

(46) 10.05.2011, Бюл.№ 9, 2011 р.

(72) ЛОУБЕР ЕММАНЮЕЛЬ, FR, ГІЄ ХЮБЕРТ, FR,  
РІШАР КЕН, FR, ЖОНАР ЖЕРАР, FR, КЛЕН ЕЛО-  
ДІ, FR, ЖІЛЬМЕР ДАВІД, FR

(73) СЕСВАНДЕРХЕВ Н.В., BE

(56) FOSTER TOSHI M ET AL: "A surveillance  
system regulates selective entry of RNA into the  
shoot apex" PLANT CELL, vol. 14, no. 7, July 2002  
(2002-07), pages 1497-1508.

HAUPT SOPHIE ET AL: "Two plant-viral movement  
proteins traffic in the endocytic recycling pathway"  
PLANT CELL, vol. 17, no. 1, January 2005 (2005-01),  
pages 164-181.

KOENIG R ET AL: "Genome properties of beet virus  
Q, a new fero-like virus from sugarbeet, determined  
from unpurified virus" JOURNAL OF GENERAL  
VIROLOGY, vol. 79, no. 8, August 1998 (1998-08),  
pages 2027-2036.

FAGOAGA CARMEN ET AL: "Post-transcriptional  
gene silencing of the p23 silencing suppressor of  
Citrus tristeza virus confers resistance to the virus in  
transgenic Mexican lime" PLANT MOLECULAR  
BIOLOGY, vol. 60, no. 2, January 2006 (2006-01),  
pages 153-165.

MISSIOU ANASTASIA ET AL: "Generation of  
transgenic potato plants highly resistant to potato  
virus Y (PVY) through RNA silencing" MOLECULAR  
BREEDING, vol. 14, no. 2, September 2004 (2004-  
09), pages 185-197.

WO 0003025 A, 20.01.2000.

US 2002169298 A, 14.11.02.

(57) 1. Генетично модифікована вірусна послідов-  
ність TGB-3, що містить послідовність, вибрану з  
групи, що складається з

(а) нуклеотидної послідовності, що включає SEQ  
ID NO:3 і антисмислову послідовність SEQ ID NO:  
3;

(б) нуклеотидної послідовності, що включає фраг-  
мент SEQ ID NO:3 і антисмислову послідовність  
вказаного фрагменту SEQ ID NO:3;

(в) нуклеотидної послідовності, що включає моди-  
фіковану SEQ ID NO:3 і антисмислову послідов-  
ність вказаної модифікованої SEQ ID NO:3; і

(г) нуклеотидної послідовності, що включає фраг-  
мент модифікованої SEQ ID NO:3 і антисмислову  
послідовність вказаного модифікованого фрагмен-  
та SEQ ID NO:3

де вказана модифікована вірусна послідовність  
при транскрипції в клітині придатна до утворення  
дволанцюгової самокомплементарної молекули  
РНК.

2. Вірусна послідовність TGB-3 за п. 1, де смисло-  
ва і антисмислова послідовності включені в одну  
послідовність нуклеїнової кислоти.

3. Вірусна послідовність TGB-3 за п. 1 або 2, що  
додатково містить інтронний фрагмент, що розді-  
ляє смислову і антисмислову послідовності, де  
вірусна послідовність TGB-3 при транскрипції в  
клітині здатна до утворення шпилькової молекули  
РНК.

4. Вірусна послідовність TGB-3 за п. 3, де інтрон-  
ний фрагмент має походження з гена рослини.

5. Вірусна послідовність TGB-3 за п. 4, де геном  
рослини є ген буряка.

6. Вірусна послідовність TGB-3 за п. 3, де інтрон-  
ним фрагментом є інтронний фрагмент високотра-  
нскрибуючих генів.

7. Вірусна послідовність TGB-3 за п. 6, де високот-  
ранскрибуючими генами є гени рибосомної РНК.

8. Вірусна послідовність TGB-3 за п. 6, де високот-  
ранскрибуючими генами є високотранскрибуючі  
гени цукрового буряка.

9. Вірусна послідовність TGB-3 за будь-яким з пп.  
1-8, де у вказаній модифікованій послідовності  
SEQ ID NO:3 стартовий і/або стоп-кодон трансляції  
послідовності SEQ ID NO:3 модифікований(і) так,  
щоб інгібувати трансляцію.

10. Вірусна послідовність TGB-3 за будь-яким з пп.  
1-9, яка включає SEQ ID NO:9 або SEQ ID NO:13.

11. Вірусна послідовність TGB-3 за будь-яким з пп.  
1-10, яка складається з SEQ ID NO:9 або SEQ ID  
NO:13.

12. Вектор, що містить генетично модифіковану  
вірусну послідовність TGB-3 за будь-яким з пп. 1-  
11.

(19) UA (11) 94451 (13) C2

13. Вектор за п. 12, оперативно зчеплений з однією або більш ніж однією регуляторною послідовністю, активною в рослинній клітині.

14. Дволанцюгова самокомплементарна молекула РНК, експресована вектором за п. 12 або 13.

15. Спосіб індукції стійкості до вірусу в рослині або в рослинній клітині, що включає: одержання конструкції нуклеїнової кислоти, що містить генетично модифіковану вірусну послідовність TGB-3 за будь-яким з пп. 1-14, оперативно зчеплену з однією або більш ніж однією регуляторною послідовністю, активною в рослині або в рослинній клітині, і трансформацію рослинної клітини конструкцією нуклеїнової кислоти, індукування за допомогою цього стійкості до вірусу в рослині або в рослинній клітині.

16. Спосіб за п. 15, де вірус вибраний з групи, що складається з вірусу розтріскування стовбура яблуні, вірусу плямистості чорниці, вірусу картоплі М, вірусу мозаїки білої конюшини, вірусу мозаїки Cymbidium, вірусу помилкової штриховатості ячменю, вірусу кучерявості верхівки картоплі, вірусу кущуватості земляного горіха, що передається через ґрунт, вірусу буряка і вірусу ВНПЖС.

17. Спосіб індукції посттранскрипції генного сайленсингу цілою РНК2, і конкретніше перенесення білка TGB-3 в рослині або в рослинній клітині, що включає стадії: одержання конструкції нуклеїнової кислоти, що містить генетично модифіковану вірусну послідовність TGB-3 за будь-яким з пп. 1-16, оперативно зчеплену з однією або більш ніж однією регуляторною послідовністю, активною в рослині або в рослинній клітині, і трансформації рослинної клітини нуклеїново-кислотною конструкцією, експресія у вказаних рослинних клітинах молекули РНК, здатної до утворення дволанцюгової молекули РНК, запускання механізму посттранскрипції генного сайленсингу.

18. Спосіб за п. 17, де рослинна клітина є продуктивною клітиною.

19. Спосіб за п. 17 або 18, де рослина вибрана з групи, що складається з яблука, чорниці, картоплі, конюшини, орхідеї, ячменю, земляного горіха або цукрового буряка.

20. Спосіб за будь-яким з пп. 17-19, що додатково включає регенерацію трансгенної рослини з трансформованої рослинної клітини.

21. Спосіб за будь-яким з пп. 17-20, де регуляторна послідовність включає промоторну послідовність або термінаторну послідовність, активну в рослинах.

22. Спосіб за п. 21, де промоторна послідовність є конститутивною або чужорідною промоторною послідовністю.

23. Спосіб за п. 21, де промоторна послідовність вибрана з групи, що складається з промотора 35S вірусу мозаїки цвітної капусти і поліубіквітинового промотора *Arabidopsis thaliana*.

24. Спосіб за п. 21, де промоторна послідовність є промотором, активним в кореневій тканині рослин.

25. Спосіб за п. 24, де промоторна послідовність є промотором, активним в кореневій тканині рослин буряка.

26. Спосіб за п. 24, де вказаний промотор, активний в кореневій тканині рослин, є промотором гена гемоглобіну з *Peroosponia andersonii*.

27. Трансгенна рослина або трансгенна рослинна клітина, що стійка до вірусу і містить конструкцію нуклеїнової кислоти, що має генетично модифіковану вірусну послідовність TGB-3 за будь-яким з пп. 1-11, оперативно зчеплену з однією або більш ніж однією регуляторною послідовністю, активною в рослині або в рослинній клітині, містить вектор за будь-яким з пп. 12, 13 або містить дволанцюгову самокомплементарну молекулу РНК за п. 14.

28. Трансгенна рослина або трансгенна рослинна клітина за п. 27, де вірус вибраний з групи, що складається з вірусу розтріскування стебла яблуні, вірусу плямистості чорниці, вірусу картоплі М, вірусу мозаїки білої конюшини, вірусу мозаїки Cymbidium, вірусу картоплі Х, вірусу помилкової штриховатості ячменю, вірусу кучерявості верхівки картоплі, вірусу кущуватості земляного горіха, що передається через ґрунт вірусу буряка і вірусу ВНПЖС.

29. Трансгенна рослина або трансгенна рослинна клітина за п. 27 або 28, вибрані з групи, що складається з яблука, чорниці, картоплі, конюшини, орхідеї, ячменю, земляного горіха або цукрового буряка.

30. Трансгенна рослина або трансгенна рослинна клітина за будь-яким з пп. 27-29, де регуляторна послідовність включає промоторну послідовність і термінаторну послідовність, які активні в рослині.

31. Трансгенна рослина за п. 30, де вказаний промотор активний в кореневій тканині рослин.

32. Трансгенна рослина за п. 30 або 31, де вказаним промотором є промотор гена гемоглобіну з *Peroosponia andersonii*.

33. Трансгенна рослина або трансгенна рослинна клітина за будь-яким з пп. 27-32, де вказана трансгенна рослина є цукровим буряком, і вказана трансгенна рослинна клітина є клітиною цукрового буряка.

34. Трансгенна рослина або трансгенна рослинна клітина за будь-яким з пп. 27-33, де регуляторна послідовність (послідовності) включає промоторну послідовність, яка є конститутивною або чужорідною рослинною промоторною послідовністю.

35. Трансгенна рослина або трансгенна рослинна клітина за будь-яким з пп. 27-34, де промотор вибраний з групи, що складається з промотора 35S вірусу мозаїки цвітної капусти і поліубіквітинового промотора *Arabidopsis thaliana*.

36. Трансгенна рослинна тканина, одержана з трансгенної рослинної клітини за будь-яким з пп. 27-35, де вказана тканина вибрана з групи, що складається з плоду, стебла, кореня, бульби і сім'я.

37. Трансгенна репродуктивна структура, одержана з трансгенної рослинної клітини за будь-яким з пп. 27-35, де вказана репродуктивна структура вибрана з групи, що складається з калусів, бруньок і зародків.

#### Область винаходу

Даний винахід відноситься до шпилькових конструкцій ДНК і до їх застосування для індукції посттранскрипційного генного сайленсингу (ПТГС) в рослинах, і більшою мірою в рослинах цукрового буряка, з метою одержання рослин, що проявляють підвищену стійкість або толерантність до вірусу, такого як вірус некротичного пожовтіння жилок буряка (ВНПЖБ). Крім того, даний винахід відноситься до трансгенних клітин і рослин, які проявляють підвищену стійкість, наприклад, до ВНПЖБ, і до їх потомства.

#### Попередній рівень техніки

Областю глибокого інтересу є додання рослинам стійкості або толерантності до вірусів. У сільськогосподарських культур великі частини врожаю можуть бути втрачені внаслідок вірусних інфекцій.

Широко поширене вірусне захворювання рослини цукрового буряка (*Beta vulgaris*), назване ризоманією, викликане фурувірусом, вірусом некротичного пожовтіння жилок буряка (ВНПЖБ) (1, 2), який передається до коріння буряка ґрунтовим грибом *Polymyxa betae* (3).

Захворювання значно вражає посівні площі районів, де вирощують цукровий буряк для промислового використання, в Європі, США і Японії, і все ще поширено в деяких областях Західної Європи (4, 5).

З 1986 року у ряді доповідей і публікацій описано застосування ізолюваних вірусних нуклеотидних послідовностей, експресуючих в рослинах для додання високого рівня толерантності проти специфічного інфекційного вірусу або навіть для додання широкого спектру стійкості проти ряду споріднених вірусів (6, 7, 8). Однією з найширше описаних в документах стратегій вірусної стійкості, заснованих на генній інженерії у багатьох видів культурних рослин, таких як картопля, гарбуз, огірок або томат, є застосування вірусної нуклеотидної послідовності, яка під контролем регуляторних елементів рослини кодує білок оболонки вірусу-мішені (9).

Однак, навіть при стійкості, опосередкованої білком оболонки, експресія певного рівня стійкості в трансгенній рослині може бути властива різним механізмам, таким як косупресія РНК або стійкість, опосередкована білком, запускається продукцією білкової послідовності.

Як правило, вірусну послідовність слід трансформувати у відповідну клітинну або тканинну культуру видів рослин, використовуючи систему трансформації, опосередковану *Agrobacterium*, або методом прямого перенесення генів, відповідно до обмежень способу культивування тканинної культури або клітинної культури, який може бути успішно застосований у даних видах. Потрібно регенерувати цілу рослину і охарактеризувати експресію трансгена.

Хоча цукровий буряк відомий як рослина, що важко піддається культивуванню клітин, що обмежує ступінь застосування практичної генної інженерії для даного виду, в даний час все зростає кількість повідомлень про успішну трансформацію

і регенерацію цілих рослин (38). Також опубліковано декілька прикладів генно-інженерної толерантності до ВНПЖБ за допомогою трансформації і експресії послідовності білків оболонки ВНПЖБ в геномі цукрового буряка (11, WO91/13159), хоча в них рідко наводять дані про повністю функціональні трансгенні рослини цукрового буряка (12). Зокрема, в цих повідомленнях показані обмежені дані щодо рівня дійсної стійкості, що спостерігалась в умовах інфекції, коли трансгенні рослини цукрового буряка трансформовані кодуючим геном, послідовність білка оболонки ВНПЖБ (13, 14).

Повний технологічний пакет, що включає спосіб трансформації цукрового буряка і застосування експресії послідовності білка оболонки ВНПЖБ як джерело стійкості в трансгенній рослині цукрового буряка, одержані вказаним способом трансформації, описаним в патентній заявці WO91/13159.

На підставі опублікованої інформації неможливо зробити висновок, що механізм стійкості, опосередкований білком оболонки, забезпечує якінебудь можливості для додання рослині цукрового буряка загального імунітету до інфекції ВНПЖБ в результаті повного інгібування механізмів розмноження і дифузії вірусу. Ідентифікація механізму стійкості, який значно блокує розповсюдження вірусу на ранній стадії інфекційного процесу, могла б бути головним критерієм успіху розвитку такої трансгенної стійкості. Крім того, така стійкість могла б урізноманітнити існуючі механізми стійкості.

Оскільки показано, що захворювання розповсюджується в багатьох країнах або областях зі швидкістю, залежною від поєднання численних місцевих особливостей навколишнього середовища і агрономічних особливостей, основний інтерес полягає у внесенні різноманіття і удосконалення до механізмів генетичної стійкості, які можуть окремо або в комбінації, створювати стратегію стабільної і тривало діючої стійкості даних і майбутніх сортів рослин цукрового буряка, що вирощуються для промислового застосування.

Геном фурувірусу некротичного пожовтіння жилок буряка (ВНПЖБ) складається з п'яти плюс-змістовних РНК, дві з яких (РНК 1 і 2) кодують функції, істотні для інфікування всіх рослин, тоді як останні три (РНК 3, 4 і 5) залучені в опосередковане вектором інфікування коріння цукрового буряка (*Beta vulgaris*). Міжклітинне перенесення ВНПЖБ керується набором трьох послідовних вірусних генів, що трохи перекриваються, на РНК2, відомих як потрібний блок кодуючих генів (ТГВ), в наступній послідовності вірусні білки Р42, Р13 і Р15 (генні продукти позначені по їх розрахункових молекулярних масах (Mr) в кілодальтонах).

У подальшому описі гени ТГВ і відповідні ним білки визначені наступними термінами ТГВ-1, ТГВ-2, ТГВ-3, або під номерами кодованих ними вірусних білків Р42, Р13 і Р15. Аналоги ТГВ присутні в інших фурувірусах, а також в потекс-, карла- і гордеівірусах (15, 18, 19, 20, 21 і 22). У доданій таблиці 1 представлені віруси, що мають послідо-

вність TGB-3, молекулярна маса TGB-3 вказаних вірусів, їх хазяїні і посилення.

Раніше показано, що незалежна експресія P15 з реплікаційних видів вірусної РНК, відомих як "реплікон", таких, що мають походження від РНК3 ВНПЖБ, інгібує інфікування ВНПЖБ за допомогою перешкоди міжклітинному перенесенню (16).

Для введення вірусу, що містить нуклеїнову кислотну послідовність TGB-3, в рослинну клітку або в рослину, запропоновано включення нуклеїново-кислотної конструкції, що містить вказану нуклеїново-кислотну послідовність TGB-3, оперативного зчеплення з однією або більше ніж однією регуляторною послідовністю, активною у вказаній рослині (WO98/07875).

Однак, хоча експресія вірусної послідовності TGB-3 дикого типу в трансгенній рослині дає можливість блокування вказаної вірусної інфекції, присутність вказаної послідовності дикого типу може викликати шкідливі ефекти на агрономічні властивості трансформованих рослин або рослинних клітин. Даний винахід полягає у відкритті того, що деякі мутантні (генетично модифіковані) вірусні послідовності TGB-3, розкриті в даному винаході, є вельми корисними в генній інженерії рослин (цукрового) буряка, стійких до ВНПЖБ.

Цілі винаходу

Метою даного винаходу є розробка надійніших способів і засобів додання рослинам стійкості до вірусів, наприклад, стійкості до вірусу ВНПЖБ, переважно надзвичайної стійкості до ВНПЖБ, конкретніше рослинам цукрового буряка, шляхом генетичної модифікації або трансформації рослинних клітин.

Крім того, метою даного винаходу є розробка генетично модифікованих або трансформованих рослинних клітин, які можуть бути одержані таким чином, що їх можна регенерувати в рослині, що проявляють підвищену толерантність або стійкість до рослинного вірусу, наприклад, до ВНПЖБ.

Ще однією метою є розробка стійкого потомства, наприклад, потомства, стійкого до ВНПЖБ, насіння і інших репродуктивних органів або структур, що мають походження від таких трансформованих рослин і рослинних клітин.

Короткий виклад суті винаходу

Припускають, що у функцію послідовності TGB-3 дикого типу при міжклітинному перенесенні залучені, щонайменше частково, "місткові" взаємодії між елементом рослини-хазяїна (переважно компонентом плазмодесми) і елементом вірусного походження (переважно іншим вірусним білком, залученим в міжклітинне перенесення). Руйнування або домена послідовності TGB-3 дикого типу (який ймовірно взаємодіє з елементом хазяїна), або домена послідовності TGB-3 дикого типу (який ймовірно взаємодіє з вірусним елементом) дає можливість інгібування міжклітинного перенесення.

Крім того, вказані специфічні мутації в послідовності TGB-3 дикого типу дають можливість одержання мутантів, що продукуються в трансгенній рослині, які все ж таки взаємодіятимуть з вірусним елементом, але не з елементом хазяїна. Ці мутанти можуть конкурувати за сайти скріплення

на вірусному елементі послідовності TGB-3 дикого типу, продукуючі на початковій стадії вірусної інфекції, і переривати інфікування за допомогою інгібування переміщення вірусу до сусідньої клітини.

Переважаю заміну щонайменше однієї амінокислоти іншою відмінною амінокислотою вказаної послідовності, здійснюють в ділянках, багатих гідрофільними амінокислотами, зазвичай присутніх на поверхні білка в своїй нативній конфігурації.

Переважаю точкова(і) мутація(ї) дає можливість заміни однієї або двох амінокислот однією або двома різними амінокислотами.

У доданій таблиці 1 описані переважні приклади вказаних вірусів, що мають вірусну послідовність TGB-3 дикого типу, молекулярна маса відповідного пептиду TGB-3, їх хазяїні і посилення. Також вже описані специфічні нуклеотидні і амінокислотні послідовності P15 ВНПЖБ дикого типу (17, послідовності дикого типу, включено тут шляхом посилення).

Вищеописані точкові мутації здійснювали загальноприйнятими способами, відомими фахівцям в даній області техніки.

Вищезазначені мутанти, що містять точкову мутацію, тестували на їх здатність до стимуляції міжклітинного перенесення вірусного мутанту (з дисфункціональною послідовністю TGB-3, переважно мутанту ВНПЖБ з дисфункціональним геном p15) при експресії в транспозованні по відношенню до реплікону. Ці мутанти були не здатні до стимуляції такого перенесення, і вони були протестовані на їх здатність до інгібування інфекції спільно інокульованим вірусом TGB-3 дикого типу, переважно спільно інокульованим ВНПЖБ дикого типу, коли форма мутанта послідовності TGB-3, переважно гена p15, була експресована з реплікону.

Автори винаходу несподівано виявили, що спосіб генетичної модифікації за винаходом (переважно точкову мутацію) можна використовувати для одержання модифікованої вірусної послідовності TGB-3 (переважно модифікованої послідовності p15 ВНПЖБ), яка здатна блокувати вірусну інфекцію, не викликаючи шкідливих ефектів при вбудовуванні в геном рослини або рослинної клітини рослини. До цього відноситься перший аспект винаходу.

Під "здатністю до блокування вірусної інфекції в рослині або в рослинній клітині" мають на увазі можливість одержання високого ступеня толерантності рослиною або рослинною кліткою, трансформованою вказаною модифікованою вірусною послідовністю TGB-3, до вказаної вірусної інфекції, зокрема, можливість забезпечувати швидке і повне блокування механізмів розмноження і дифузії вірусу в рослині, переважне блокування механізмів розмноження і дифузії вірусу ВНПЖБ в рослині цукрового буряка (*Beta vulgaris*), включаючи кормовий буряк, листовий буряк і столовий буряк, які також можуть бути схильні до вказаної інфекції ВНПЖБ.

Вказана толерантність або стійкість можуть бути легко зміряні різними способами, добре відомими фахівцям в даній області техніки.

Переважаю генетичні модифікації у вірусній послідовності TGB-3 дикого типу є точковими мутаціями в ділянках вказаної вірусної послідовності дикого типу, залученої в механізми вірусного міжклітинного перенесення.

Даний винахід також відноситься до модифікованих вірусним нуклеотидним і амінокислотним послідовностям TGB-3, одержаних (виділеним)

вказаним способом (модифікація і відбір), переважніше до модифікованих нуклеотидних і амінокислотних послідовностей P15 ВНПЖБ, одержаних (виділених) вказаним способом.

Переважаю вказані нуклеотидні і амінокислотні послідовності P15 ВНПЖБ вибрані з групи, що складається з наведених нижче нуклеотидних або відповідних амінокислотних послідовностей:

SEQ ID NO 1 :

ATGGTGCCTTGTGGTTGCAGTAGCTTTATCTAATATTGTATTGTACATAGTTGCCGGTTGT 60

M V L V V A V A L S N I V L Y I V A G C

GTTGTTGTCAGTATGTTGTACTCACCGTTTTTCAGCAACGATGTTAAAGCGTCCAGCTAT 120

V V V S M L Y S P F F S N D V K A S S Y

GCGGGAGCAATTTTAAAGGGGAGCGGCTGTATCATGGACAGGAATTCGTTTGCTCAATTT 180

A G A I F K G S G C I M D R N S F A Q F

GGGAGTTGCGATATTCCAAAGCATGTAGCCGAGTCCATCACTAAGGTTGCCACCAAAGAG 240

G S C D I P K H V A E S I T K V A T K E

CACGATGTTGACATAATGGTAAAAAGGGGTGAAGTGACCGTTCGTGTTGTGACTCTCACC 300

H D V D I M V K R G E V T V R V V T L T

GAAACTATTTTATAATATTATCTAGATTGTTTGGTTTGGCGGTGTTTTTGTTCATGATA 360

E T I F I I L S R L F G L A V F L F M I

TGTTTAATGTCTATAGTTTGGTTTTGGTATCATAGATAA 399

C L M S I V W F W Y H R \*

SEQ ID NO 3 :

ATGGTGCTTGTGGTTAAAGTAGATTTATCTAATATTGTATTGTACATAGTTGCCGGTTGT 60  
M V L V V K V D L S N I V L Y I V A G C

GTTGTTGTCAGTATGTTGTACTCACCGTTTTTCAGCAACGATGTTAAAGCGTCCAGCTAT 120  
V V V S M L Y S P F F S N D V K A S S Y

GCGGGAGCAATTTTAAAGGGGAGCGGCTGTATCATGGCCGGAATTCGTTTGCTCAATTT 180  
A G A I F K G S G C I M A A N S F A Q F

GGGAGTTGCGATATTCCAAAGCATGTAGCCGAGTCCATCACTAAGGTTGCCACCAAAGAG 240  
G S C D I P K H V A E S I T K V A T K E

CACGATGTTGACATAATGGTAAAAAGGGGTGAAGTGACCGTTCGTGTTGTGACTCTCACC 300  
H D V D I M V K R G E V T V R V V T L T

GAACTATTTTATAATATTATCTAGATTGTTTGGTTTGGCGGTGTTTTGTTTCATGATA 360  
E T I F I I L S R L F G L A V F L F M I

TGTTTAATGTCTATAGTTTGGTTTTGGTATCATAGATAA 399  
C L M S I V W F W Y H R \*

SEQ ID NO 5 :

ATGGTGCTTGTGGTTAAAGTAGATTTATCTAATATTGTATTGTACATAGTTGCCGGTTGT 60  
M V L V V K V D L S N I V L Y I V A G C

GTTGTTGTCAGTATGTTGTACTCACCGTTTTTCAGCAACGATGTTAAAGCGTCCAGCTAT 120  
V V V S M L Y S P F F S N D V K A S S Y

GCGGGAGCAATTTTAAAGGGGAGCGGCTGTATCATGGACAGGAATTCGTTTGCTCAATTT 180  
A G A I F K G S G C I M D R N S F A Q F

GGGAGTTGCGATATTCCAAAGCATGTAGCCGAGTCCATCACTAAGGTTGCCACCAAAGAG 240  
G S C D I P K H V A E S I T K V A T K E

CACGATGTTGACATAATGGTAAAAAGGGGTGAAGTGACCGTTCGTGTTGTGACTCTCACC 300  
H D V D I M V K R G E V T V R V V T L T

GAACTATTTTATAATATTATCTAGATTGTTTGGTTTGGATGATTTTTGTTTCATGATA 360  
E T I F I I L S R L F G L D D F L F M I

TGTTTAATGTCTATAGTTTGGTTTTGGTATCATAGATAA 399  
C L M S I V W F W Y H R \*

У подальшому описі різні модифіковані послідовності TGB-3 ВНПЖБ будуть позначені як "мутанти р15", що ідентифікуються наведеним нижче посиленням: BNP15-Ala1, відповідний SEQ ID NO 1; BNP15-Ala4, відповідний SEQ ID NO 3; BNP15-Asp9, відповідний SEQ ID NO 5.

Нуклеотидні і відповідні амінокислотні послідовності SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3 і SEQ ID NO 5 можна порівнювати з SEQ ID NO 7, яка є вже описаною нуклеотидною і амінокислотною послідовністю (SEQ ID NO 8) р15 дикого типу (17).

Даний винахід також відноситься до вектора, що містить вказану модифіковану нуклеотидну послідовність або її фрагмент, можливо, оперативно зчеплену з однією або більш ніж однією регуляторною послідовністю, активною в рослині або в рослинній клітині. Переважно вказаний вектор є плазмідом, що містить вже вказані регуляторні послідовності, активні в рослині або в рослинній клітині. Вектор також може бути касетною нуклеотидною послідовністю, що складається тільки з нуклеотидної послідовності, яку потрібно вбудувати в геном рослини (в даному випадку з модифікованої послідовності TGB-3 ВНПЖБ або її фрагменту), яка зчеплена з одним або більш ніж одним промотором, кінцевими нуклеотидними послідовностями і, можливо, з регуляторною послідовністю, достатньою для одержання ефективної експресії послідовностей, які, крім того, ще (по суті) вільні від інших прокариотичних або плазмідних нуклеотидних послідовностей (див. EP 1174513).

Даний винахід також відноситься до способу індукції стійкості до вірусу, що містить послідовність TGB-3, переважно до одного з вірусів, описаних у вкладеній таблиці 1, і переважніше до вірусу ВНПЖБ, де вказаний спосіб включає наступні стадії:

- одержання нуклеїново-кислотної конструкції, що містить нуклеїново-кислотну послідовність, генетично модифіковану відповідно до способу за винаходом, або що містить фрагмент такої модифікованої послідовності, і оперативно зчеплену з однією або більш ніж однією регуляторною послідовністю, активною в рослині або в рослинній клітині

- трансформації рослинної клітини цією нуклеїново-кислотною конструкцією і

- можливо, регенерації трансгенної рослини з трансформованої рослинної клітини.

Переважно вказаний спосіб застосовують для індукції стійкості до ВНПЖБ у рослині цукрового буряка або в клітині цукрового буряка. Вказаний спосіб включає наступні стадії:

- одержання нуклеїново-кислотної конструкції, що містить модифіковану нуклеїново-кислотну послідовність, одержану способом за винаходом, або що містить фрагмент такої модифікованої послідовності, переважно одержання нуклеїново-кислотної конструкції, що містить нуклеїново-кислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3 або SEQ ID NO 5 або фрагменту будь-якого з них, оперативно зчеплену з однією або більш ніж однією регуляторною послідовністю, активною в рослині

- трансформації рослинної клітини цукрового буряка цією нуклеїново-кислотною конструкцією і

- можливо, регенерації трансгенної рослини цукрового буряка з трансформованої рослинної клітини цукрового буряка.

Даний винахід також відноситься до одержаної (регенерованої) трансгенної рослини або клітини трансгенної рослини, стійкої до інфікування вірусом, що містить послідовність TGB-3, переважно одним з вірусів, описаних у вкладеній таблиці 1, переважніше вірусом ВНПЖБ, вказаної рослини або рослинної клітини, що містить нуклеїново-кислотну конструкцію, що має модифіковану нуклеїново-кислотну послідовність TGB-3, оперативно зчеплену з однією або більш ніж однією регуляторною послідовністю, здатною бути активною в рослині або в рослинній клітині.

Переважно вказана модифікована нуклеїново-кислотна послідовність вибрана з групи, що складається з SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3 і SEQ ID NO 5, оперативно зчеплених з однією або більш ніж однією регуляторною послідовністю, активною в рослині або в рослинній клітині.

Переважно клітина є продишовою клітиною, а регуляторна послідовність включає промоторну послідовність і термінаторну послідовність, здатну бути активною в рослині. Вказана промоторна послідовність може бути конститутивною або може бути одержана з чужорідної промоторної послідовності і переважно вибрана з групи, що складається з промотора 35S вірусу мозаїки цвітної капусти і/або промотора поліубіквітину *Arabidopsis thaliana*.

Переважно промоторна послідовність є промотором, специфічним для кореню, який, в основному, здатний бути активним в кореневій тканині рослин, зокрема, рослин цукрового буряка, такий як промотор *par* або гена гемоглобіну з *Perosponia andersonii*.

Наступний аспект даного винаходу відноситься до трансгенної рослинної тканини, такої як плід, стебло, корінь, бульба, сім'ядолей трансгенної рослини за винаходом, або до репродуктивної структури (переважно вибраної з групи, що складається з каллюсів, бруньок або зародків), одержаної з трансгенної рослини або з рослинної клітини за винаходом.

Методики трансформації рослин, тканинної культури і регенерації, що використовуються в способі за винаходом, є добре відомими для фахівців в даній області техніки. Такі методики переважно є методиками, описаними в Міжнародних патентних заявках WO95/101778, WO91/13159 (відповідній Європейській патентній публікації EP-B-0517833), WO98/07875, на які здійснюються посилення. Протопласти замикаючих клітин є переважними тканинами для трансформації рослин цукрового буряка.

Ці методики переважно використовують для одержання трансгенних рослин і рослинних клітин цукрового буряка за винаходом.

Серед рослин цукрового буряка, трансформованих мутованими або генетично модифікованими послідовностями TGB-3 (р15) за винаходом (SEQ ID NOS 1, 3, 5), були виявлені рослини, які чітко проявляли сильну стійкість до ВНПЖБ в біологіч-

них аналізах, і ці відкриття були підтверджені в польових випробуваннях. Сильна стійкість до ВНПЖБ була, зокрема, виявлена серед рослин, трансформованих SEQ ID NO 3.

Виявляється, продукція мутованого білка p15 запускає стійкість. Шляхом вестерн-блот-аналізу продемонстровано, що експресія мутованого білка P15 у високо стійких рослинах, трансформованих SEQ ID NO 3, була значно понижена, але, все ж таки присутня, що вказує на те, що одержаний механізм сайленсингу все ж таки недостатньо ефективний, щоб зруйнувати кожну мРНК P15.

Кількість P15, продукованих трансгенними рослинами з надсинтезом P15, який не схильний сайленсингу ПТГС, порівнювали з кількістю P15, продукованими стійкими рослинами, де механізм ПТГС активний.

Докладніша молекулярна характеристика рослинного матеріалу продемонструвала присутність малих молекул РНК, комплементарних як смисловій, так і антисмисловій ниткам послідовності TGB-3 (p15) ДТ (дикого типу) ВНПЖБ. В цілому вважають, що присутність цих малих смислових і антисмислових РНК, поза сумнівом, пов'язано з механізмом стійкості, індукованою посттранскрипційним генним сайленсингом (ПТГС).

Шляхом нозерн-блот-аналізу стійких рослин, інфікованих вірусом ВНПЖБ, було підтверджено відсутність РНК2 ВНПЖБ в порівнянні з чутливими контролями. Внаслідок високої залежності від гомології специфічності послідовності малих молекул РНК P15, що утворюються в стійких рослинах, ці транскрипти активують процес деградації всієї (цілісної) РНК2.

У цих рослин механізм ПТГС був сформований без запуску за допомогою самої генетичної конструкції, ймовірно, як результат переміщень вставок.

Авторами винаходу було несподівано зроблено відкриття, що шпилькові конструкції з мутованими послідовностями TGB-3 (p15) за винаходом або їх фрагменти в смисловій і антисмисловій орієнтації можуть ефективно запускати ПТГС, направлений на деградацію РНК2, наприклад, ВНПЖБ. Зокрема, доведено, що мутована послідовність TGB-3 SEQ ID NO 3 (можливо, додатково модифікована, наприклад, для інгібування трансляції) і її фрагменти або ділянки вельми ефективні при запуску ПТГС з високою відтворюваністю.

Ще один наступний аспект винаходу, таким чином, відноситься до цих дволанцюгових самокомплементарних молекул РНК, до нуклеїново-кислотних конструкцій, зокрема, конструкцій або нуклеотидних послідовностей ДНК, векторів або експресійних касет для їх експресії в рослинних клітинах, до способів і застосувань, заснованих на них.

У даному винаході запропонована нуклеїново-кислотна конструкція, зокрема, конструкція ДНК, що змінює експресію білка перенесення TGB-3, де вказана нуклеїново-кислотна конструкція містить першу послідовність ДНК, здатну експресіювати в клітині смисловий фрагмент мутованого TGB-3 ВНПЖД, що має, наприклад, (модифіковану) SEQ ID NO 1, 3 або 5, або фрагмент або ділянку (вва-

зану модифікованою) SEQ ID NO 1, 3 або 5, і другу послідовність ДНК, здатну експресіювати у вказаній клітині антисмислову послідовність вказаного мутованого TGB-3 ВНПЖД, SEQ ID NO 1, що має (модифіковану), 3 або 5, або ділянку або фрагмент (вказану модифіковану) SEQ ID NO 1, 3 або 5. Під "експресією" мають на увазі перш за все "транскрипцію" або "утворення фрагменту (м) РНК" (див. наступний абзац). За транскрипцією може слідувати "трансляція". Крім того, переважно трансляція інгібована (див. нижче). Під "модифікованим" мають на увазі, що досліджувана послідовність може бути додатково модифікована, наприклад, для інгібування трансляції. Термін "SEQ ID NO 3", наприклад, розуміють як такий що відноситься до SEQ ID NO 3, а також до "модифікованих" послідовностей SEQ ID NO 3, таких як SEQ ID NO 10.

У даному винаході запропонована сама вірусна генетично модифікована послідовність TGB-3, що містить послідовність (модифіковану) SEQ ID NO 3 або її фрагмент, і що містить антисмислову послідовність вказаної (модифіковану) SEQ ID NO 3 або антисмислову послідовність вказаного (модифікованого) фрагменту SEQ ID NO 3, де вірусна послідовність TGB-3 при транскрипції в клітині здатна до утворення дволанцюгової самокомплементарної молекули РНК. Запропонована, наприклад, генетично модифікована вірусна послідовність TGB-3, що містить послідовність, вибрану з групи, що складається з (а) нуклеотидної послідовності, що включає SEQ ID NO: 3 і антисмислову послідовність SEQ ID NO: 3; (б) нуклеотидної послідовності, що включає фрагмент SEQ ID NO: 3 і антисмислову послідовність вказаного фрагменту SEQ ID NO: 3; (в) нуклеотидної послідовності, що включає модифіковану SEQ ID NO: 3 і антисмислову послідовність вказаної модифікованої SEQ ID NO: 3; і (г) нуклеотидної послідовності, що включає фрагмент модифікованої SEQ ID NO: 3 і антисмислову послідовність вказаного фрагменту модифікованої SEQ ID NO: 3, де вказана модифікована вірусна послідовність при транскрипції в клітині здатна утворювати дволанцюгову самокомплементарну молекулу РНК.

Переважно смислова і антисмислова послідовності включені в одну єдину нуклеїново-кислотну послідовність, одну єдину нитку або молекулу ДНК. Однак, вони можуть бути присутніми в двох або на двох різних нуклеїново-кислотних послідовностях, нитках або молекулах ДНК, яка здатна до спарювання основ і, таким чином, до утворення дволанцюгової самокомплементарної молекули РНК.

При транскрипції генетично модифікована вірусна послідовність TGB-3 за винаходом дозволяє одержати молекулу РНК з нуклеотидною послідовністю або нуклеїново-кислотою послідовністю, що містить

1) смислову нуклеотидну послідовність принаймні приблизно з 10 послідовних нуклеотидів (нт), переважно принаймні приблизно з 15, 20, переважніше принаймні приблизно з 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, або навіть ще переважніше приблизно з 400 послідовних нуклеотидів (нт), наприклад, послідовність (модифіковану) SEQ ID NO



3 або її фрагмент, що має ідентичність послідовності приблизно 75 і приблизно 100% щонайменше з частиною послідовності p15 ВНПЖД ДТ (SEQ ID NO 7), і

2) антисмислової нуклеотидної послідовності, яка є достатньо комплементарною цій смисловій нуклеотидній послідовності. Як така, молекула РНК, яка експресується (транскрибується і переважно не транлюється), здатна до утворення дволанцюгової самокомплементарної молекули РНК при експресії (транскрипції) в достатніх кількостях, таких як штучна шпилькова структура РНК, з утворенням стебла дволанцюгового РНК за рахунок спарювання основ між ділянками із смисловою і антисмисловою нуклеотидною послідовністю. Під "достатніми кількостями" мають на увазі кількість, яка є достатньою для індукції ПТГС, переважно для індукції повного сайленсingu.

На самокомплементарні шпилькові конструкції за винаходом також посиляються як на мутовані шпилькові конструкції p15 (ВНПЖД) (hp15).

Переважно кожна із смислової і антисмислової нуклеотидних послідовностей комплементарні один одному. Бажано, щоб між смисловим і антисмисловим фрагментом РНК в комплементарній ділянці було менш ніж приблизно 50% помилкового спарювання основ, бажаніше менш ніж приблизно 30% помилкового спарювання основ, переважно менш ніж приблизно 20% помилкового спарювання основ, переважніше менш ніж приблизно 10% помилкового спарювання основ, ще переважніше менш ніж приблизно 5, 4, 3, 2 або 1% помилкового спарювання основ.

Переважно загальна довжина смислової нуклеотидної послідовності або послідовності ДНК складає щонайменше приблизно 10 нт, 15 нт, ще переважніше щонайменше приблизно 20 нт, 25 нт, зокрема, щонайменше приблизно 50 нт, конкретніше щонайменше приблизно 100 нт, особливо щонайменше приблизно 150 нт, конкретніше щонайменше приблизно 200 нт, 250 нт, 300 нт, особливо щонайменше приблизно 350 нт або приблизно 400 нт.

Зрозуміло, що, чим більша загальна або повна довжина смислової нуклеотидної послідовності, тим менш суворими стають вимоги до ідентичності послідовності між загальною або повною смисловою нуклеотидною послідовністю (в даному випадку, зокрема, послідовністю, відповідною SEQ ID NO 3 або її частини) і відповідною послідовністю в гені-мішені (в даному випадку, наприклад, послідовністю p15 ДТ ВНПЖД). Переважно смислова нуклеотидна послідовність повинна володіти ідентичністю послідовності по всій її довжині щонайменше приблизно 75% з послідовністю p15 ВНПЖД ДТ або її частиною, зокрема, щонайменше приблизно 80%, конкретніше щонайменше приблизно 85%, особливо приблизно 90%, особливо приблизно 95%, особливо приблизно 99% або навіть більш ніж 99% (навіть переважно менш ніж 100%). Переважна мутована послідовність TGB-3, p15-ala4 (SEQ ID NO 3), має три мутовані основи в порівнянні з ДТ p15, що відповідає 99,24% гомології або ідентичності послідовностей. Інша переважна послідовність за винаходом, SEQ ID NO 10,

має п'ять мутованих основ в порівнянні з ДТ p15, що відповідає 98,74% гомології або ідентичності послідовностей (див. фіг. 8).

Однак, бажано, щоб смислова нуклеотидна послідовність завжди включала послідовність приблизно з 10 послідовних нуклеотидів, зокрема, приблизно з 20 нт, конкретніше приблизно з 50 нт, особливо приблизно з 100 нт, особливо приблизно з 150 нт з 100% ідентичністю послідовності з відповідною частиною нуклеїнової кислоти-мішені (в даному випадку, послідовності p15 ВНПЖД ДТ). Переважно для розрахунку ідентичності послідовності і дизайну відповідної смислової нуклеотидної послідовності число пропусків має бути мінімізоване, зокрема, для коротших смислових нуклеотидних послідовностей.

Переважно модифікована смислова послідовність TGB-3 містить щонайменше наступні модифікації в порівнянні з послідовністю p15 ДТ (дикого типу): ген Dtrp15 мутований в положенні 3 нуклеїнових кислоти, в якому G замінений на 3, інша специфічна заміна включає мутацію положення 158 нуклеїнової кислоти, в якому A замінений на C, додаткові специфічні заміни направлені на мутації в положеннях 160 і 161, в яких пара AG замінена на GC, з додаванням додаткової мутації в положенні 397, в якому T замінений на C (SEQ ID NO 10, див. також фіг. 8). Така модифікація в положенні 3 інгібує ініціацію трансляції, а модифікація в положенні 397 руйнує стоп-сигнал трансляції. Іншою переважною модифікованою смисловою послідовністю TGB-3 за винаходом є SEQ ID NO 3, яка містить наступні модифікації в порівнянні з геном p15 ДТ: мутацію в положенні 158 нуклеїнової кислоти, де A замінений на C, а також інші специфічні заміни, направлені на мутації в положеннях 160 і 161, де пара AG замінена на GC.

Довжина антисмислової нуклеотидної послідовності в значній мірі визначена довжиною смислової нуклеотидної послідовності і переважно повинна відповідати довжині останньої послідовності. Однак, можна використовувати антисмислову послідовність, яка відрізняється від смислової нуклеотидної послідовності по довжині приблизно на 10%, приблизно на 50%, переважніше приблизно на 10% - приблизно на 15%.

Аналогічно, нуклеотидна послідовність антисмислової ділянки в значній мірі визначена нуклеотидною послідовністю смислової ділянки і переважно ідентична комплементу нуклеотидної послідовності смислової ділянки. Зокрема, при довгих антисмислових ділянках, однак, можливе використання антисмислових послідовностей з меншою ідентичністю послідовності комплементу смислової нуклеотидної послідовності, переважно щонайменше приблизно з 75% ідентичністю послідовності, переважніше щонайменше приблизно з 80%, особливо щонайменше приблизно з 85%, конкретніше щонайменше приблизно з 90% ідентичністю послідовності, особливо щонайменше приблизно з 95% ідентичністю послідовності комплементу смислової нуклеотидної послідовності.

Однак, щоб антисмислова нуклеотидна послідовність завжди включала послідовність приблизно з 10, приблизно з 15 послідовних нуклеотидів

(нт), переважно приблизно з 20 нт, переважніше приблизно з 50 нт, особливо приблизно з 100 нт, особливо приблизно з 150 нт з 100% ідентичністю послідовності комплементу відповідної частини смислової нуклеотидної послідовності. Ясно, що довжина відрізання з послідовних нуклеотидів з 100% ідентичністю послідовності комплементу смислової нуклеотидної послідовності не може бути більша, ніж сама смислова нуклеотидна послідовність. Знову ж таки, переважно, щоб число пропусків було мінімізоване, зокрема, для коротших антисмислових послідовностей. Крім того, також бажано, щоб антисмислова послідовність мала приблизно між 75% і 100% ідентичності послідовності комплементу послідовності-мішені.

Порядок смислових і антисмислових нуклеотидних послідовностей в нуклеотидних послідовностях або конструкціях ДНК за винаходом, як вважають, не є критичним.

Переважно смислова і антисмислова послідовності модифікованої вірусної послідовності TGB-3 за винаходом розділені лінкерною або спейсерною нуклеотидною послідовністю, яка переважно є інтрон. Цей інтрон переважно є рослинним інтроном, переважніше інтрон (цукрового) буряка. Переважно використовують інтрон високо транскрибуючих генів, переважніше інтрон високо транскрибуючих генів цукрового буряка. Переважно високо транскрибуючими генами є гени рибосомної РНК (24, 25).

Переважно смисловий фрагмент TGB-3 в генетично модифікованій послідовності TGB-3 за винаходом включає (модифіковані) SEQ ID NO 1, 3 або 5, або їх ділянки або фрагменти. Наприклад, генетично модифікована вірусна послідовність TGB-3 за винаходом може включати щонайменше від нт 100 до нт 399, нт 150 до нт 399 або нт 163 до нт 399 (модифікованих) SEQ ID NO 1, 3 або 5.

Найпереважніше смисловий фрагмент TGB-3 в генетично модифікованій послідовності TGB-3 за винаходом включає (модифіковану) SEQ ID NO 3 або її ділянки або фрагменти. Наприклад, генетично модифікована вірусна послідовність TGB-3 за винаходом може включати щонайменше від нт 100 до нт 399, від нт 150 до нт 399 або від нт 163 до нт 399 (модифікованою) SEQ ID NO 3. Ще переважніше смисловий фрагмент TGB-3 в конструкції ДНК за винаходом складається з (модифікованою) SEQ ID NO 3 або її ділянок (фрагментів), наприклад, він може складатися щонайменше з нт 100 - нт 399, нт 150 - нт 399 або нт 163 - нт 399 (модифікованою) SEQ ID NO 3.

Переважно смисловий фрагмент TGB-3 в генетично модифікованій послідовності TGB-3 за винаходом додатково мутують так, щоб він містив щонайменше один стоп-кодон трансляції, з метою інгібування трансляції. Переважно стоп-кодон(и) вказаного смислового фрагменту TGB-3 в генетично модифікованій послідовності TGB-3 за винаходом зруйновані. Стартовий кодон трансляції також може бути модифікований, щоб інгібувати ініціацію трансляції. Наприклад, стартовий кодон ATG SEQ ID NO 3 модифікований до Атс, а стоп-кодон TAA модифікований до CAA (див. фіг. 8). Дана конкретна послідовність названа "модифіко-

ваною" SEQ ID NO 3. Фахівці в даній області техніки можуть обдумати безліч інших можливостей.

Переважними конструкціями за винаходом є конструкції або нуклеотидні послідовності ДНК, де смисловий фрагмент TGB-3 в генетично модифікованій вірусній послідовності TGB-3 за винаходом містить SEQ ID NO 10. Ще переважніші конструкції ДНК, де смисловий фрагмент TGB-3 в генетично модифікованій вірусній послідовності TGB-3 за винаходом складається з SEQ ID NO 10.

Переважні генетично модифіковані послідовності TGB-3 за винаходом містять SEQ ID NO 9 або 13. Ще переважніші генетично модифіковані послідовності TGB-3, які складаються з SEQ ID NO 9 або 13.

Переважно генетично модифікована вірусна послідовність TGB-3 за винаходом оперативно зчеплена з промотором, переважно з гетерологічним промотором, який активний в корінні. Переважними промоторними послідовностями, активними в кореневій тканині рослин, є промотор *rag* і промотор гена гемоглобіну з *Perostrongia andersonii*. Найбільш переважні специфічні промотори для коріння буряка, яке активне в корінні рослини буряка. Можливо, ділянка ДНК, залучена в термінацію транскрипції і/або в поліаденілірування, або інші регуляторні послідовності (наприклад, послідовності, що підсилюють транскрипцію) можуть бути оперативно зчеплені з конструкцією ДНК за винаходом.

Далі сам винахід відноситься до вектора, зокрема, до експресійного вектора або експресійної касети, що містить генетично модифіковану послідовність TGB-3 за винаходом, оперативно зчеплену з однією або більш ніж однією регуляторною послідовністю.

Даний винахід далі відноситься до дволанцюгової самокомплементарної молекули РНК, що експресується генетично модифікованою послідовністю TGB-3 за винаходом, або вектором або експресійною касетою за винаходом.

Інший аспект винаходу відноситься до клітини-хазяїна, трансформованої генетично модифікованою послідовністю TGB-3 за винаходом і/або вектором за винаходом і/або молекулою РНК за винаходом. Клітина-хазяїн переважно є рослинною клітиною, переважніше клітиною буряка і найпереважніше клітиною цукрового буряка.

Даний винахід далі відноситься до трансформованої рослини, переважно до трансформованої рослини буряка, найпереважніше до трансформованої рослини цукрового буряка, що містить в своєму геномі конструкцію ДНК і/або вектор за винаходом, і/або що містить в своїх клітинах молекулу РНК за винаходом.

Переважно конструкцію ДНК, що містить генетично модифіковану вірусну послідовність TGB-3 за винаходом і/або вектор, що містить цю послідовність, використовують для трансформації рослинного матеріалу, такого як рослинні клітини і/або рослинні тканини. Переважно модифікована послідовність TGB-3 за винаходом стабільно інтегрована в геном (рослинної) клітини. Альтернативно вона може бути присутньою в епісомній формі.

Таким чином, даний винахід також відноситься до трансформованих або генетично модифікованих рослинних клітин, що містять таку конструкцію ДНК і/або вектор і/або молекулу РНК за винаходом. Можливо також використовувати молекули РНК за винаходом самі по собі, щоб додати стійкості або толерантності до ВНПЖД (див. нижче).

Інший аспект даного винаходу відноситься до трансгенної рослини, переважно до рослини цукрового буряка, регенованої з клітини-хазяїна, переважно з рослинної клітини, трансформованої такою конструкцією ДНК, вектором і/або молекулою РНК за винаходом і що проявляє змінену експресію білка перенесення TGB-3. Переважно експресія молекули (ВНПЖД) TGB-3 (p15) значно понижена в порівнянні з контролем (не трансформованим або не трансформованим шпильковою конструкцією p15 за винаходом).

Тут наведений приклад для (сильно) пониженої експресії p15 ВНПЖД. Експресія p15 ВНПЖД у присутності шпилькової молекули РНК p15 за винаходом, таким чином, має бути нижче, ніж експресія в її відсутності, переважно складаючи тільки приблизно 25%, зокрема, тільки приблизно 10%, конкретніше складаючи тільки приблизно 5% експресій у відсутності шпилькової молекули РНК p15 за винаходом або у відсутності генетично модифікованої вірусної послідовності TGB-3, що кодує цю молекулу.

Переважає експресія p15 ВНПЖД понижена до такого рівня, що вона більш невиявлена. Присутність білка P15 може бути виявлене за допомогою вестерн-блоттингу з використанням антитіл проти P15. Альтернативно рівні цього білка можуть бути визначені за допомогою мас-спектрометрії, що добре відоме в даній області техніки. Найпереважніше, щоб білок P15 або білкові фрагменти взагалі не продукувалися, що означає, що всі його мРНК зруйновані або щонайменше інактивовані. Переважає експресія гена p15 ДТ з вірусу пригнічена в рослинних клітинах і в рослинах, трансформованих за допомогою способів або засобів за винаходом.

Переважає реплікація вірусу відсутня в рослині або в рослинній клітині, трансформованої генетично модифікованою вірусною послідовністю TGB-3, конструкцією ДНК, вектором або молекулою РНК за винаходом.

Ще один інший аспект даного винаходу відноситься до потомства трансформованих рослин за винаходом, який містить в геномі щонайменше частини своїх клітин генетично модифіковану вірусну послідовність TGB-3 і/або вектор за винаходом, і/або який містить щонайменше в частині своїх клітин молекулу РНК за винаходом. Переважає цей матеріал (модифікована вірусна послідовність, вектор і/або молекула РНК) присутній по суті у всіх клітинах рослини. Переважно потомство трансформованої рослини за винаходом проявляє змінену експресію білка перенесення TGB-3 (ВНПЖД). Така ж стратегія може бути застосована до кожного вірусу, перерахованого в таблиці 1, проте, послідовність p15, описана тут, направлена тільки на вірус ВНПЖД. Прикладами потомства є

такі рослинні тканини, як плід, стебло, корінь, бульба і сім'ядолі.

Ще один інший аспект винаходу відноситься до насіння трансформованої рослини, переважно трансформованої рослини цукрового буряка за винаходом.

Даний винахід також відноситься до (вегетативно) репродуктивних структур, таким як каллуси, бруньки, зародки, що походять від трансформованої рослини за винаходом.

Переважає це потомство, насіння, репродуктивні структури і так далі містять в геномі щонайменше частини своїх клітин, переважно по суті у всіх клітинах, генетично модифіковану вірусну послідовність TGB-3 і/або вектор за винаходом і/або молекулу РНК за винаходом. Переважає ці рослинні матеріали можуть бути регеновані до рослин або рослинних матеріалів, стійких до ВНПЖД.

Ще один інший аспект винаходу відноситься до застосування такого насіння або вегетативно репродуктивних структур для регенерації з них рослини, яка переважно є рослиною цукрового буряка, стійкою, наприклад, до ВНПЖД, і/або що проявляє значно підвищену толерантність до ВНПЖД.

Ще один інший аспект винаходу відноситься до способу зміни експресії цілісної РНК2, і конкретніше білка перенесення TGB-3 (ВНПЖД), в рослині або рослинній клітині, що включає стадії:

- введення в клітину рослини, яка переважно є рослиною цукрового буряка, генетично модифікованої вірусної послідовності TGB-3 (конструкції ДНК) і/або вектора, що містить цю послідовність, за винаходом з одержанням трансформованої рослинної клітини, де експресія у вказаних рослинних клітинах молекули РНК, здатна до утворення дволанцюгової молекули РНК, змінює експресію цілісної РНК2, і конкретніше білка перенесення TGB-3 (ВНПЖД) у вказаній рослині або рослинній клітині, і переважно експресію будь-якого іншого вірусного білка, локалізованого на тій же РНК у вказаній рослині або у вказаній клітині.

Ще один інший аспект винаходу відноситься до способу індукції транскрипції поста генного сайленсингу цілісною РНК2, і конкретніше білка перенесення TGB-3 (ВНПЖД) в рослині або в рослинній клітині, що включає стадії:

- введення в клітину рослини, яка переважно є рослиною цукрового буряка, генетично модифікованої вірусної послідовності TGB-3 (конструкції ДНК) і/або вектора, що містить цю послідовність, за винаходом з одержанням трансформованої рослинної клітини, де експресія у вказаних рослинних клітинах молекули РНК, здатна до утворення дволанцюгової молекули РНК, запускає механізм посттранскрипції генного сайленсингу.

За допомогою способу за винаходом, представленого в попередніх абзацах, цілісна РНК2 переважно руйнується.

Ще один інший аспект винаходу відноситься до способу додання рослині або рослинній клітині стійкості або більшої толерантності до вірусів рослин, перерахованих в таблиці 1, наприклад, до ВНПЖД, що включає стадії:

- введення в клітини рослини, яка переважно є рослиною цукрового буряка, генетично модифікованої вірусної послідовності TGB-3 (конструкції ДНК) і/або вектора, що містить цю послідовність, за винаходом з одержанням трансформованої рослинної клітини, де експресія у вказаних рослинних клітинах молекули РНК, здатна до утворення дволанцюгової молекули РНК, відповідальна за стійкість і/або підвищену толерантність вказаної рослини до вірусу рослин, наприклад, до ВНПЖД.

Ще один інший аспект винаходу відноситься до способу індукції надзвичайної стійкості (високих рівнів імунітету) в рослині або в рослинній клітині, що включає стадії:

- введення в клітини рослини, яка переважно є рослиною цукрового буряка, генетично модифікованої вірусної послідовності TGB-3 (конструкції ДНК) і/або вектора, що містить цю послідовність, за винаходом з одержанням трансформованої рослинної клітини, де експресія у вказаних рослинних клітинах молекули РНК, здатна до утворення дволанцюгової молекули РНК, здатна індукувати надзвичайну стійкість (високі рівні імунітету) в рослині, що містять конструкцію ДНК і/або вектор за винаходом щонайменше в частині, переважно по суті в усіх своїх клітинах.

Ще один інший аспект винаходу відноситься до способу (значного) зменшення або блокування розповсюдження вірусу [переважно одного з описаних в таблиці 1, такого як ВНПЖД] в рослині, що включає стадії:

- введення в клітини рослини, яка переважно є рослиною цукрового буряка, генетично модифікованої вірусної послідовності TGB-3 (конструкції ДНК) і/або вектора, що містить цю послідовність, за винаходом з одержанням трансформованої рослинної клітини, де експресія у вказаних рослинних клітинах молекули РНК, здатна до утворення дволанцюгової молекули РНК, здатна зменшувати або блокувати розповсюдження вірусу в трансформованій таким чином рослині або в рослинній клітині. Розповсюдження вірусу може бути зменшено/блоковано шляхом зменшення/блокування розмноження вірусу (у всіх або в деяких типах клітин), перенесення вірусу по рослині (наприклад, шляхом блокування дистанційного перенесення або міжклітинного перенесення), або шляхом обмеження розповсюдження вірусу тільки певними тканинами (наприклад, судинною паренхімою і клітинах, що не відносяться до флоєми). Переважне розповсюдження вірусу зменшено/блоковано до такого ступеню, що в корінні рослини, трансформованих шпильковою конструкцією р15 за винаходом, зміряно значення OD405 (див. приклад 7) 0,2 або менш. Переважніше це значення максимально складає 0,1. Найпреважніше це значення OD405 максимально складає 0,05, максимально 0,01 або навіть близько до нуля (рівні нижчі за межу виявлення). Альтернативно молекула РНК за винаходом може бути введена в рослинні клітини з метою зміни експресії білка перенесення TGB-3 ВНПЖД, що індукуює транскрипція поста генний сайленсинг білка перенесення TGB-3, додаючи рослині або рослинній клітині стійкість

або велику толерантність до ВНПЖД, з метою індукції надзвичайної стійкості у рослині або рослинної клітини, або з метою блокування або зменшення розповсюдження вірусу в рослині.

Спосіб за винаходом може додатково включати стадію регенерації трансгенної рослини з трансформованої рослинної клітини.

Способи за винаходом включають (щонайменше) стадію одержання відповідної конструкції і трансформації рослини (клітини) цією конструкцією для досягнення одного з вищеописаних ефектів (див. абзац 36).

Виявлено, що рослини, трансформовані відповідно до винаходу, переважно мають вищі рівні стійкості до ВНПЖД в порівнянні з природними джерелами толерантності/стійкості до вірусу (такими як джерела стійкості, добре відомі в області техніки, "Rizor", "Holly" або Beta maritime підвид, maritime, номер за каталогом WB42).

Виявляється, що трансформація рослини генетично модифікованою послідовністю TGB-3 за винаходом, переважно здатної до утворення шпилькової структури, блокує і/або значно зменшує розповсюдження вірусу через кореневу систему. Переважно таким чином можна запобігти досягненню вірусом системи дистанційного перенесення. Переважно трансформація рослини відповідно до винаходу запобігає і/або значно зменшує розмноження вірусу в корі. Способи за винаходом переважно знижують здатність вірусу до підтримки інфекційного потенціалу в ґрунті.

Стійкість патогенного походження за винаходом, крім того, виявилася відмінною від стійкості, присутньої в природних джерелах. Стійкість патогенного походження сама по собі може бути переважно сполучена з природними механізмами стійкості.

Переважне поєднання різних джерел стійкості (природного і патогенного походження) може призвести до (додатково) підвищеної стабільності сорту, стійкого до ризоманії, а також може сприяти забезпеченню довгострокової стійкості до одного або більш ніж одного патотипу (щонайменше до одного патотипу).

Короткий опис графічних матеріалів

На фіг. 1 представлена генетично модифікована вірусна послідовність TGB-3 за винаходом (фіг. 1a і б, SEQ ID NO 9) із смисловою мутованою нуклеотидною послідовністю р15 (SEQ ID NO 10, модифікації в порівнянні з ДТ тут виділені жирним підкресленим шрифтом) і антисмисловою нуклеотидною послідовністю р15 (жирний курсив, SEQ ID NO 12), розділеними інтронною послідовністю з 91 п.о. (виділені жирним підкресленим шрифтом, SEQ ID NO 11). Декілька нуклеотидів на фіг. 1b виділені курсивом (подвійне підкреслення). Вони не належать ні р15, ні інтрону, але присутні як клонування, що залишилися після стратегії, оточуючи сайти рестрикції. Конструкція, що містить SEQ ID NO 9, також названа конструкцією 2 hp15.

На фіг. 2 представлена генетично модифікована вірусна послідовність TGB-3 за винаходом (фіг. 2a і б, SEQ ID NO 13) із смисловою нуклеотидною послідовністю мутанта р15 і антисмисловою нуклеотидною послідовністю р15 (жирний курсив),

розділеними інтронною послідовністю, що складається з 550 п.о. (жирний підкреслений шрифт, SEQ ID NO 14). Декілька нуклеотидів на фіг. 26 виділені курсивом (подвійне підкреслення). Вони не належать ні р15, ні інтрону, але присутні як клонування, що залишилися після стратегії, оточуючи сайти рестрикції. Смислова і антисмислова нуклеотидні послідовності р15 є такими ж послідовностями, як ті, які продемонстровані на фіг. 16. Конструкція, що містить SEQ ID NO 13, так само названа конструкцією 3 hr15.

На фіг. 3 представлена послідовність р15 ДТ (SEQ ID NO 7 і 8).

Фіг. 4 є схематичним зображенням вектора pFGC5 941, в який був введений ген BNP15-ala4 в смисловій і антисмисловій орієнтації, розділених інтронною послідовністю гену синтази А петунії (CHSA). Промотор CAMV 35S: промотор 35S CAMV; OCS3: сигнал поліаденілювання гену октопінсинтази; MAS3: сигнал поліаденілювання гену маннопінсинтази; BAR: ген гербіцидної стійкості Basta; Km: ген стійкості до канаміцину; RB, LB: ліва і права межі Т-ДНК.

Фіг. 5 є схематичним зображенням векторів pS140 і pS142, в яких був введений ген BNP15-ala4 в смисловій і антисмисловій орієнтації, розділених інтронною послідовністю буряка з 550 нт (фіг. 5А, pS140, конструкція 3) і 91 нт (фіг. 5Б, pS142, конструкція 2) відповідно. Промотор CAMV 35S: промотор 35S CAMV; NOS 3': термінатор нопалінсинтази; Kan: ген стійкості до канаміцину; RB, LB: ліва і права межі Т-ДНК.

Фіг. 6 є статистичним аналізом даних по ПТГС, одержаних для конструкції 1 (hr15 з інтроном петунії). Кожна гістограма представляє число (Y) і розмір (-Y) пошкоджень на заражений лист.

/: відсутність пошкоджень; v: вірус St1234, tp: буфер; hr: шпилька. По осі Y: 1, 10, 20, 30, 100. По осі -Y: 4. По осі X, зліва направо: v; v + буфер MA; v + hrGF; v + hr15.

Фіг. 7 є статистичним аналізом даних по ПТГС, одержаних для конструкцій 1, 2 і 3 відповідно. Кожна гістограма представляє кількість (Y) і розмір (-Y) пошкоджень на заражений лист.

/: відсутність пошкоджень; v: вірус St1234, tp: буфер; hr: шпилька; hr15: конструкція 1; pS140: конструкція 3; pS142: конструкція 2. По осі Y: 1, 10, 20, 30, 40. По осі -Y: 4. По осі X, зліва направо: v; v + буфер MA; v + hrGF; v + hr15 (конструкція 1); v + pS140 (конструкція 3); v + pS142 (конструкція 2).

На фіг. 8 підкреслені відмінності в SEQ ID NO 10 порівняно з послідовністю р15 ВНПЖД ДТ, представленою SEQ ID NO 7.

На фіг. 9 наведені результати тесту твердофазного імуоферментного аналізу (ЕЛАЙЗА) як міра присутності вірусних частинок в корінні рослин, вирощених в ґрунті, інфікованою ВНПЖД. Biotest Rz2007-001A. THPR: трансформація, індукована поліетилен гліколем (ПЕГ).

На фіг. 10 наведені результати тесту ЕЛАЙЗА як міра присутності вірусних частинок в корінні рослин, вирощених в ґрунті, інфікованою ВНПЖД. Biotest Rz2007-002A. THPR: трансформація, індукована ПЕГ. AGHP: трансформація Agrobacterium.

На фіг. 11 представлений вектор pS138, використаний в експериментах по прямій індукованій ПЕГ трансформації гена.

На фіг. 12 представлений вектор pS143, використаний для трансформації, опосередкованою Agrobacterium.

Докладний опис винаходу

У переважному втіленні винаходу смислова і антисмислова модифікована нуклеотидна послідовність TGB-3 включені в одну молекулу, що означає, що смисловий мутований фрагмент РНК TGB-3 і антисмисловий мутований фрагмент РНК TGB-3 включені в одну єдину молекулу РНК. Переважно молекула РНК за винаходом здатна до такого укладання, що вказані фрагменти РНК, включені в неї, утворюють дволанцюгову шпилькову молекулу РНК.

Використаний тут термін "шпилькова РНК" відноситься до дволанцюгової молекули РНК, здатної до самовідпалу. У найпростішому вигляді шпилькова РНК складається з дволанцюгового стебла, утвореного відпалювальними нитками РНК, сполученими петлею одоланцюгової РНК, і її також називають "РНК у формі ручки сковорідки". Проте, в термін "шпилькова РНК" також слід включати складніші вторинні структури РНК, що містять дволанцюгові послідовності РНК, здатні до самовідпалу, а також внутрішні випинання і петлі. Конкретна адаптована вторинна структура визначається вільною енергією молекули РНК і може бути передбачена для різних ситуацій з використанням відповідного програмного забезпечення, такого FOLDRNA (23).

Альтернативно смислова і антисмислова модифіковані нуклеотидні послідовності TGB-3 можуть бути присутніми в двох або на двох окремих молекулах або нуклеотидних послідовностях, які можуть бути введені в рослинну клітину або надані рослинній клітині одночасно і/або послідовно, переважно при не дуже великому проміжку часу між наданням першій і другій нуклеотидній послідовності, так що при транскрипції може утворитися дволанцюгова молекула РНК в результаті спарювання основ.

Переважно послідовності ДНК за винаходом стабільно інтегровані в геном рослинної клітини, трансформованої генетично модифікованими вірусними послідовностями TGB-3 за винаходом і/або вектором, що їх містить.

Альтернативно трансген, що містить генетично модифіковану вірусну послідовність TGB-3 згідно даного винаходу, може бути локалізований на епісомі або самореплікуючому векторі. Прикладами самореплікуючого вектора є віруси, зокрема, гемінівіруси.

Генетично модифікована вірусна послідовність TGB-3 за даним винаходом також може бути трансформована безпосередньо в пластидний геном. Методика пластидної трансформації детально описана в патентах США №№ 5451513, 5545817 і 5545818, в заявці PCT № WO 95/16783 і в McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 73 01-73 05, на які є посилання. Основна методика трансформації хлоропластів включає введення областей клонованої пластидної ДНК, фланкую-

чих селективний маркер разом з цікавою для нас нуклеотидною послідовністю, у відповідну тканину-мішень, з використанням, наприклад біолистів або трансформації протопластів (наприклад, трансформації, опосередкованої хлоридом кальцію або поліетилен гліколем (ПЕГ)). Фланкуючі області розміром 1-1,5 кб сприяють гомологічній рекомбінації з плазмидним геномом, і, таким чином, дають можливість для заміщення або модифікації специфічних областей пластоми (генома хлоропласту).

Способи трансформації і регенерації рослин добре відомі в даній області техніки. Наприклад, Ti-плазмідні вектори використані як для доставки чужорідний ДНК, так і для прямого захоплення ДНК, ліпосом, електропорації, мікроін'єкції і мікро-часток. Крім того, для трансформації рослинних клітин можуть бути використані бактерії роду *Agrobacterium*. Різні вектори для трансформації, доступні для трансформації рослин, відомі фахівцям в даній області техніки, і ДНК або нуклеотидні конструкції за даним винаходом (що містять генетично модифіковану вірусну послідовність TGB-3) можуть бути використані у поєднанні з будь-якими такими векторами. Вибір вектора залежить від переважної методики трансформації.

Селективні маркери, зазвичай використовувані при трансформації, включають ген *nptII*, що додає стійкість до канаміцину і споріднених антибіотиків (Messing & Vierra. *Gene* 19: 259-268 (1982); Bevan et al., *Nature* '304: 184-187 (1983)), ген *bar*, що додає стійкість до гербіциду фосфінотрицину (White et al., *Nucl. Acids Res* 18: 1062 (1990), Spencer et al. *Theor. Appl. Genet* 79: 625-631 (1990)), ген *hph*, що додає стійкість до антибіотика гіроміцину (Blochinger & Diggelmann, *Mol Cell Biol* 4: 2929-2931), ген *dhfr*, що додає стійкість до Метотрексату (Bourouis et al., *EMBO J.* 2 (7) : 1099-1104 (1983)), ген *EPSP3*, що додає стійкість до гліфосату (патенти США №№ 4940935 і 5188642), ген *aac(6')*, що кодує стійкість до гентаміцину (WO 94/01560), або гени *pat* і *imi*, добре відомі в даній області техніки. Безліч векторів доступних для трансформації або генетичної модифікації рослинних клітин з використанням *Agrobacterium tumefaciens*. Ці вектори типово несуть щонайменше одну прикордонну послідовність Т-ДНК і включають вектори, такі як *pBIN19* (Bevan, *Nucl. Acids Res.* (1984)). Типові вектори, відповідні для трансформації за допомогою *Agrobacterium*, включають бінарні вектори *pCIB200* і *pCIB2001*, а також бінарний вектор *pCIB10* і його похідні для відбору за гіроміцином (див., наприклад патент США № 5639949). Перевагою використання методик з *Agrobacterium tumefaciens* для трансформації рослин є присутність низької копійності і мінімальних перебудов в порівнянні з іншими методиками.

Трансформація без застосування *Agrobacterium tumefaciens* дозволяє уникнути необхідності в послідовностях Т-ДНК у вибраному для трансформації векторі, і, отже, вектори, побавлені цих послідовностей, використовують на додаток до векторів, таких як описані вище, що містять послідовності Т-ДНК. Методики трансформації, які не засновані на *Agrobacterium*, включа-

ють трансформацію шляхом прямого перенесення генів, бомбардування частинками, захоплення протопластом (наприклад, за допомогою ПЕГ і електропорації), трансформацію, опосередковану пилком, трансформацію, опосередковану рослинними РНК вірусами, мікроін'єкцію, трансформацію порізаних і/або розщеплених ферментами ембріонних тканин і/або незрілих зародків, трансформацію, опосередковану ліпосомами і тому подібне. Вибір вектора в значній мірі залежить від переважного вибору трансформованого вигляду і використовуваного селективного маркера. Типові вектори, відповідні для трансформації без *Agrobacterium*, включають *pCIB3064*, *pSOG19* і *pSOG35* (див., наприклад патент США № 5639949, на який є посилання). Компоненти експресивної системи можуть бути модифіковані, наприклад, для посилення експресії смислового і антисмислового фрагментів РНК.

Використаний тут термін "експресивна касета" означає послідовність ДНК, здатну направляти експресію конкретної нуклеотидної послідовності у відповідній клітині-хазяїні, що містить промотор, оперативно зчеплений з нуклеотидною послідовністю, що цікаво, яка оперативно зчеплена з сигналами термінації транскрипції.

Експресивна касета, що містить цікаву нуклеотидну послідовність, в даному випадку генетично модифікована вірусна послідовність TGB-3 за винаходом, може бути химерною, що означає, що щонайменше один з її компонентів є гетерологічним по відношенню щонайменше до одного з решти компонентів. Експресивна касета також може бути послідовністю, що зустрічається в природі, але одержаною в рекомбінантній формі, корисній для гетерологічної експресії. Однак, зазвичай експресивна касета є гетерологічною по відношенню до хазяїна, тобто конкретна послідовність ДНК експресивної касети в природі не зустрічається в клітині-хазяїні і має бути введена в клітину-хазяїна або попередник клітини-хазяїна за допомогою трансформації.

Експресійні касети також можуть містити будь-які додаткові послідовності, необхідні або вибрані для експресії (і, можливо, для трансляції) трансгена. Такі послідовності, наприклад, включають, але не обмежені ними, термінатори транскрипції, чужорідні послідовності для посилення експресії, такі як інтрони, життєво важливі послідовності і послідовності, призначені для напряму генного продукту в конкретну органелу і клітинні компартменти. Потім ці експресійні касети можуть бути легко перенесені у вектори для трансформації рослин, що описані вище. Нижче представлений опис різних компонентів типових експресійних касет.

"Регуляторні елементи" відносяться до послідовностей, залучених в додання здібності до експресії нуклеотидної послідовності. Регуляторні елементи зазвичай включають промотор, оперативно зчеплений з цікавою нуклеотидною послідовністю, і сигнали термінації. Вони також можуть включати послідовності, потрібні для правильної трансляції цікавої нуклеотидної послідовності. У даному випадку трансляція смислової нуклеотидної послідовності генетично модифікованої вірус-

ної послідовності TGB-3 переважно інгібована в результаті модифікації передбаченого стартового і/або стоп-кодону трансляції (див. нижче).

Експресія нуклеотидної послідовності в експресивній касеті може знаходитися під контролем конститутивного промотора або індукцибельного промотора, який ініціює транскрипцію тільки тоді, коли клітина-хазяїн піддається якому-небудь конкретному зовнішньому стимулу. У разі багатоклітинного організму, такого як рослина, промотор також може бути специфічним для конкретної тканини або органу, або стадії розвитку.

Промотор, оперативно зчеплений із смисловими і/або антисмисловими нуклеотидними послідовностями за винаходом, може бути нативним промотором трансформованої клітини. Альтернативно перегляд може бути гетерологічним, наприклад, тканинспецифічний промотор, промотор регульований в процесі розвитку, конститутивний промотор або індукцибельний промотор. Відповідні промотори добре відомі фахівцям в даній області техніки. У даному винаході переважні сильні гетерологічні промотори, які активні в корневих тканинах або первинно активні в них (коли експресія в інших тканинах небажана).

Для використання в експресивних касетах є безліч термінаторів транскрипції. Вони відповідають за термінацію транскрипції за межами трансгена і його правильне поліаденилювання. Відповідними термінаторами транскрипції є ті, які відомі як функціонуючі в рослинах, і вони включають термінатор *CAMV 35S*, *tm*/термінатор, термінатор нопалінсинтази і термінатор *rbcS E9* гороху і тому подібне.

Виявлені численні послідовності, що підсилюють експресію гена в межах одиниці транскрипції, і ці послідовності можна використовувати у поєднанні з генетично модифікованими послідовностями TGB-3 за винаходом для посилення їх експресії в трансгенних рослинах. Наприклад, показано, що різні інтронні послідовності, такі як інтрони гена *Adhl* кукурудзи, підсилюють експресію. Крім того, також відомо, що ряд нетрансльованих лідерних послідовностей, виділених з вірусів, підсилює експресію.

Переважно щонайменше один "експресуючий в рослині" промотор оперативно зчеплений із смисловою нуклеотидною послідовністю і/або антисмисловою нуклеотидною послідовністю (див. вище). Переважно смислова і антисмислова нуклеотидні послідовності в генетично модифікованій послідовності TGB-3 за винаходом знаходяться під контролем одного і того ж промотора(ів).

Використаний тут термін "промотор, експресуючий в рослинах" означає послідовність ДНК, яка здатна регулювати (ініціювати) транскрипцію в рослинній клітині. Він включає будь-який промотор рослинного походження, а також будь-який промотор не рослинного походження, який здатний направляти транскрипцію в рослинній клітині або тканині, тобто деякі промотори вірусного або бактерійного походження, такі як *CaMV35S*, промотор ґрунтового вірусу конюшини № 4 або № 7, або промотори генів Т-ДНК.

Нижче описані деякі можливості відносно вибору промоторів і розташування, залежні від того, чи включені генетично модифіковані смислова і антисмислова нуклеотидні послідовності TGB-3 за винаходом в єдину нуклеотидну послідовність або нитку ДНК.

Смислова і антисмислова нуклеотидні послідовності в генетично модифікованій вірусній послідовності TGB-3 за винаходом переважно знаходяться під контролем одного єдиного промотора, особливо, коли обидві включені в єдину нуклеотидну послідовність. Однак, кожна з них також може знаходитися під контролем різних промоторів (наприклад, при розташуванні на двох різних послідовностях). Або, іншими словами, смислова послідовність ДНК може бути оперативно зчеплена з першим промотором, а антисмислова послідовність ДНК оперативно зчеплена з другим промотором. Перший промотор і другий промотор можуть бути однаковими промоторами або можуть бути різними промоторами. Промотор може бути дивергентний транскрибуючим або двонаправленим промотором, здатним ініціювати транскрипцію послідовностей ДНК з кожного боку промотора.

Коли смисловий фрагмент РНК і антисмисловий фрагмент РНК включені в дві молекули або експресується у вигляді двох молекул РНК (двох окремих ниток РНК), смислова послідовність ДНК і антисмислова послідовність ДНК можуть бути, наприклад, оперативно зчеплені з двонаправленим промотором. Альтернативно смислова послідовність ДНК може бути оперативно зчеплена з першим промотором, а антисмислова послідовність ДНК оперативно зчеплена з другим промотором. Перший промотор і другий промотор можуть бути однаковими промоторами або різними промоторами.

Антисмислова послідовність може бути ниткою ДНК, комплементарна смисловій модифікованій послідовності TGB-3 у вказаній молекулі ДНК (в цьому випадку молекула ДНК має дві нитки). В цьому випадку можливо, щоб промотор був оперативно зчеплений з вказаною смисловою або вказаною антисмисловою послідовністю ДНК, де перший сайт сайт-специфічної рекомбінації знаходиться між вказаним промотором і вказаною смисловою або вказаною антисмисловою послідовністю ДНК, а другий сайт сайт-специфічної рекомбінації знаходиться на 3'-кінці вказаної смислової або вказаної антисмислової послідовності ДНК, де вказаний перший і вказаний другий сайти сайт-специфічної рекомбінації здатні інвертувати вказану першу або другу послідовність ДНК між вказаним першим і вказаним другим сайтом рекомбінації у присутності сайт-специфічної рекомбінази. В результаті вказаного інвертування вказаний перший промотор здатний експресувати вказану антисмислову (або смислову, залежно від того, яка послідовність ДНК початково була зчеплена з промотором) послідовність ДНК. Рослинна клітина переважно додатково містить сайт-специфічну рекомбіназу, здатну розпізнавати вказані сайти сайт-специфічної рекомбінації.

Конструкція або послідовність ДНК за винаходом, окрім смислової і антисмислової модифікова-

ної вірусної послідовності TGB-3, переважно додатково містить лінкерну або спейсерну нуклеотидну послідовність між послідовностями ДНК, що кодує смисловий і антисмисловий фрагменти РНК.

У відсутність такої спейсерної послідовності молекула РНК все ж таки має бути здатна до утворення дволанцюгової РНК, зокрема, якщо смислова і антисмислова нуклеотидна послідовність довша, ніж, приблизно, 10 нуклеотидів, і частина смислової і/або антисмислової нуклеотидної послідовності буде використана для утворення петлі, що дає можливість для спарювання основ між ділянками із смисловою і антисмисловою нуклеотидною послідовністю і утворення дволанцюгової РНК. Чекають, що не існує обмежень довжини або вимог до послідовності, пов'язаної із спейсерною ділянкою, до того ступеня, щоб параметри не перешкождали здатності ділянок РНК із смисловою і антисмисловою нуклеотидною послідовностями до утворення дволанцюгової РНК. У переважному втіленні довжина спейсерної ділянки варіює від 5 до приблизно 1000 п.о.

У переважному втіленні шпилькова РНК, утворена смисловою і антисмисловою ділянками, і, якщо придатно, спейсерною ділянкою, є штучною шпильковою РНК. Під "штучною шпильковою РНК" або "штучною структурою РНК стебло-петля" мають на увазі, що така шпилькова РНК природно не зустрічається в природі.

Переважна спейсерна або лінкерна нуклеотидна послідовність є інтронною послідовністю, переважно в смисловій орієнтації, що підсилює ефективність зниження експресії нуклеїнової кислоти-мішені, р15 ВНПЖД або РНК2 ВНПЖД в контексті справжнього винаходу. Посилення ефективності може бути виражене в підвищенні частоти рослин, де має місце сайленсинг, або в збільшенні рівня зниження експресії р15 або РНК2 ВНПЖД.

Переважні інтронні нуклеотидні послідовності мають походження з генів рослин, подібних до передбачених генів рибосомної РНК або високо транскрибуючих генів рослин. Такі інтрони можуть мати походження з будь-якого рослинного гену, але переважно мають походження з генів дводольних рослин, наприклад, з генів петунії, найпереважніше вони мають походження з генів (цукрового) буряка. Можливо також використовувати тільки ділянку цих (рослинних) інтронів, наприклад, щонайменше межі, що містять сигнали сплайсингу (див. нижчий). Всі ці інтрони і їх ділянки в контексті винаходу названі "фрагментами інтронів" або "інтронними послідовностями".

Переважна довжина для таких інтронних нуклеотидних послідовностей складає від, приблизно, 5 до, приблизно, 1000 п.о., переважно від, приблизно, 50 до, приблизно, 600 п.о., переважніше від, приблизно, 90 до, приблизно, 550 п.о. Переважні інтронні послідовності включають SEQ ID NO 11 або 14 або навіть переважніше складаються з SEQ ID NO 11 або 14.

Процесінг інтронів залежить від правильних послідовностей 5' і 3' меж сплайсингу, і щонайменше вони мають бути збережені в інтронній послідовності. Узгоджені послідовності для цих меж

виведені для мРНК як рослин, так і тварин, але тільки декілька нуклеотидів відомі як інваріантні.

Виявлено, що обидва інтрони буряка, описані нижче (SEQ ID NO 11 і 14), у високому ступені придатні, причому коротша послідовність функціонує дещо краще, ніж довша послідовність.

Молекула РНК, що містить смислову і антисмислову нуклеотидні послідовності, здатні до утворення, наприклад, шпилькової структури, яка утворюється в результаті транскрипції химерних генів, також може бути введена безпосередньо в рослинну клітину. Такі молекули РНК можуть одержуватися, наприклад, шляхом

- клонування під контролем промотора, придатного для розпізнавання ДНК-залежної, такої як, РНК полімеразою в реакції транскрипції *in vitro*, але не обмеженого ним, промотора, специфічного для Т7-полімерази, ділянки ДНК, здатної транскрибуватися в молекулу РНК з нуклеотидної послідовності, що містить смислову нуклеотидну послідовність щонайменше з 10 послідовних нуклеотидів, що володіє 75 і 100% ідентичністю послідовності щонайменше з частиною нуклеотидної послідовності нуклеїнової кислоти, і антисмислову нуклеотидну послідовність, що включає щонайменше 10 послідовних нуклеотидів, переважно щонайменше, 15 нт, 20 нт, зокрема, щонайменше приблизно 50 нт, конкретніше щонайменше приблизно 100 нт, особливо щонайменше приблизно 150 нт, конкретніше щонайменше приблизно 200 нт, 250 нт, 300 нт, особливо щонайменше приблизно 350 нт або приблизно 400 нт, і що володіє 75% і 100% ідентичністю послідовності з комплементом щонайменше приблизно з 10 послідовних нуклеотидів смислової нуклеотидної послідовності, за допомогою чого РНК здатна до утворення дволанцюгової РНК в результаті спарювання основ між ділянками із смисловою і антисмисловою нуклеотидними послідовностями, результатом чого є, наприклад, утворення шпилькової структури РНК;

- проведення реакції транскрипції *in vitro* шляхом додавання серед іншого відповідного ДНК-залежної РНК полімерази, а також необхідних реагентів для утворення молекул РНК; і

- виділення молекул РНК.

Способи транскрипції *in vitro*, також як і інші способи одержання РНК *in vitro*, добре відомі фахівцям в даній області техніки, в продажі доступні наявні набори. Способи прямого введення РНК в рослинні клітки також доступні для фахівців в даній області техніки, і включають, але не обмежені ними, електропорацію, мікроін'єкцію і тому подібне. Крім того, у винаході також запропонована: рослина, що володіє стійкістю або толерантністю до ВНПЖД, що містить в геномі щонайменше частини своїх клітин, переважно, по суті у всіх своїх клітинах, генетично модифіковану вірусну послідовність TGB-3 за винаходом і/або вектор, що містить цю послідовність, які при транскрипції дають молекулу РНК, яка запускає ПТГС і за допомогою цього руйнування РНК2 ВНПЖД. Також запропонована рослина, що володіє стійкістю або толерантністю до ВНПЖД, яке містить щонайменше в частині своїх клітин, переважно у всіх своїх кліти-



нах, молекулу РНК за винаходом для досягнення вищеприписаного ефекту.

"Рослина" відноситься до будь-якої рослини або частини рослини на будь-якій стадії розвитку. У цей термін також включені живці, клітинні або тканинні культури і насіння. При використанні у зв'язку із даним винаходом термін "рослинна тканина" включає, але не обмежений ними, цілі рослини, клітини рослин, органи рослин, насіння рослин, протопласти, каллус, клітинні культури, а також будь-які групи рослинних клітин, організованих в структурні і/або функціональні одиниці. Останні також відносяться до (вегетативно) репродуктивних структур, маючи на увазі, що вони можуть бути регенеровані до цілої рослини.

Одержана трансформована рослина, рослинні тканини і рослинний матеріал можуть застосовуватися в загальноприйнятному схрещуванні і розмноженні рослини або в загальноприйнятих схемах регенерації для одержання більшої кількості трансформованих рослин з такими ж властивостями (стійкості або толерантності до вірусів) або для введення конструкції ДНК за даним винаходом в інші сорти того ж виду або споріднених видів рослин.

"Стійкість або толерантність до вірусів" тут означає, що стійка або толерантна клітина або рослина несприйнятлива або володіє зниженою сприйнятливістю до одного або більш ніж одного вірусу в порівнянні з чутливою кліткою або рослиною. У даному випадку розглянута стійкість і переважно надзвичайна стійкість до інфекцій ВНПЖД. Стійкість або толерантність, наприклад, означає, що звичайні симптоми вірусної інфекції, наприклад, інфекції ВНПЖД, відсутні або зменшені, або що накопичення або реплікація вірусу в клітині відвернена або зменшена, або що перенесення вірусу, наприклад, від клітини до клітини, було відвернено або зменшено.

Даний винахід відноситься до способів регуляції, тобто зміни і переважно значного зниження або навіть повного інгібування експресії гена р15 вірусною (ВНПЖД) РНК2 в клітинах, переважно в рослинних клітинах, або в рослинах. ПТГС повинен інгібувати експресію кожного гена, розташованого на РНК2.

Було виявлено, що зазвичай доступні способи не володіють передбаченістю. Способи за даним винаходом полегшують ці проблеми і забезпечують відтворну і ефективнішу регуляцію вірусної стійкості у рослин.

Далі винахід описаний шляхом посилання на наведені нижче докладні приклади.

Ці приклади наведені тільки в цілях ілюстрації і не призначені для якого-небудь обмеження, якщо не вказане інше.

Принципи, продемонстровані тут для ВНПЖД і Р15 ВНПЖД, в рівній мірі застосовуються до вірусів, перерахованих в Таблиці 1.

Приклади

Приклад 1: Характеристика трансгенних рослин, стійких до ВНПЖД

Були створені три незалежні трансгенні лінії *Beta vulgaris*, які експресували білок BNP15-Ala4

(кодований SEQ ID NO 3). Виявлено, що дві з трьох ліній стійкі до ВНПЖД.

Було виявлено, що експресія білка Р15 значно вище в чутливій лінії, ніж в стійких лініях. Були виявлені міРНК (малі інтерферуючі РНК), але тільки в рослинах лінії, стійкої до ВНПЖД (Таблиця 2).

Таким чином, стійкість до ВНПЖД, може запускатися за допомогою ПТГС. Для подальшої перевірки цієї гіпотези по одному листку від кожної лінії інфікували вірусним інокулюмом (Stras 1234, що забезпечує РНК1, РНК2, РНК3 і РНК4). На листках стійких рослин, інфікованих таким чином, розвивалося від декількох уражень до повної їх відсутності, тоді як на листках чутливих рослин розвинулися численні ураження. У рослинах лінії, стійких до ВНПЖД, виявлені Р15-специфічні молекули міРНК, але вони не виявлені ні в одній з чутливих рослин.

Неможливо було виявити ніякої модифікації послідовності гена р15 або в послідовності термінатора транскрипції.

Приклад 2: Шпилькові конструкції Р15

Для вивчення функціональності (мутованої) послідовності Р15, індуючою ПТГС, був сконструйований бінарний вектор *Agrobacterium*, що містить генетично модифікований ген р15 (наприклад, (модифікована) SEQ ID NO 3) в смисловій і антисмисловій орієнтаціях, розділених інтроном петунії або інтроном цукрового буряка.

Нижче представлені результати, одержані з трьома конструкціями hr15 (див. фіг. 4, 5). Інtron на послідовність в конструкції 1 одержана з петунії (див. фіг. 4), тоді як інtronна послідовність в конструкціях 2 і 3 одержана з буряка. Конструкції 2 і 3 розрізняються тільки по довжині інtronів: 550 нт у разі вектора рS140 і лише 91 нт у разі вектора рS142 (фіг. 5А і Б, відповідно).

Створення конструкцій ДНК за винаходом і клонування цих конструкцій в *Agrobacterium tumefaciens* (наприклад, (знешкоджуваному) штамі GV3101) проводили відповідно до способів і методик, добре відомих в даній області техніки. Смыслові і антисмыслові фрагменти р15, а також інтрони, одержувались за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЦР), що включає специфічні сайти рестрикції на кінцях. При змішуванні з векторним каркасом можлива тільки одна рекомбінація/вставка фрагментів, заснована на сумісності цих специфічних сайтів на кінцях фрагментів. Правий сайт рестрикції першого фрагменту був таким же, як лівий сайт рестрикції другого фрагменту.

Для кожної з вище описаних конструкцій був створений шпильковий гомолог, що містить (перші 400 нт) послідовність GFP [замість генетично модифікованої послідовності р15], і використаний як контроль (шпильковий контроль, названий hrGF). Буфер МА (10 mM MgCl<sub>2</sub> 200 мкМ ацетосірінгон) додатково слугував як контроль обробки.

Приклад 3: Протоколи експериментів

Листовий матеріал *Tetragonia expanse*, *Beta macrocarpa* і *Beta vulgaris* (рослини, що витримують штучне зараження листя ВНПЖД) був інфільтрований агрономічним шляхом з подальшим інфікуванням ВНПЖД (Stras 1234 або Stras 12

(забезпечуючі РНК1 і РНК2)). Протоколи див. нижче, а конструкції див. вище.

*Agrobacterium tumefaciens*, що містить шпилькову конструкцію, вирощують протягом ночі при 28°C. Клітини обдають центрифугуванням (15 хв при 5000 g) і ресуспендують в 10 мМ буфері  $MgCl_2$ , ацетосірінгон (200 мкМ), що містить, і  $OD_{600nm}$  доводять до 1. Клітинну суспензію зберігають при кімнатній температурі протягом 3 год. до інфільтрації.

Інфільтрацію агрономічним шляхом проводять за допомогою уприскування розчину *Agrobacterium* в листя сіянів (наприклад, *Beta macrocarpa*, *Beta vulgaris*, *Tetragonia expansa*, *Nicotiana benthamina*, *Chenopodium quinoa*) на стадії 4 листя. Шприцом без голки об'ємом 2 мл натискають на верхню сторону проколеного голкою листка. Інфільтрують кожен листок за виключенням сім'ядолей.

Через чотири дні після інфільтрації агрономічним шляхом оброблене листя інфікували механічною інокуляцією шляхом втирання на заздалегідь обпилене карборундом листя 10-25 мкл розчину інокуляту (1 мкг вірусної РНК (Stras 1234 або Stras 12), 0,04% макалоїду, 50 мМ калійфосфатного буферу, pH 7,5).

<i>Beta macrocarpa</i>	10 мкл інокуляційного розчину на листку
<i>Beta vulgaris</i>	25 мкл інокуляційного розчину на листку
<i>Tetragonia expansa</i>	25 мкл інокуляційного розчину на листку
<i>Nicotiana benthaminana</i>	20 мкл інокуляційного розчину на листку

Листя від *Beta macrocarpa*, *Beta vulgaris*, *Tetragonia expansa* і *Nicotiana benthamina* обробляли таким же чином (дивися вище) і спостерігали в них наявність симптомів ризоманії протягом 10-13 дні (добі після інокуляції).

Приклад 4: Ефект експресії мРНК hr15 на розмноження ВНПЖД

А: Конструкції з інтроном петунії

У наведених нижче прикладах описані деякі результати, одержані на буряці з використанням конструкцій hr15 за винаходом.

Результати, одержані з конструкцією 1 (фіг. 4), представлені на фіг. 6. На листках *Beta vulgaris*, які були піддані агрономічній інфільтрації суспензією, експресуючою конструкцією hrGF, і на листках, інфільтрованих буфером МА, виявлені жовті хлоротичні ураження. Ці ураження були подібні до уражень, які спостерігалися на листку, який не був інфільтрованим і інокуюваним.

Такі ураження не розвивалися на листках рослин, які були інфільтровані агрономічним шляхом суспензією, експресуючою конструкцією hr15 (конструкція 1). Якщо спостерігали взагалі які-небудь ураження, вони були значно менші, і, як вважають, відповідали зонам, де інфільтрація листя не була оптимальною.

Дані попередніх результатів вказують на те, що конструкції hr 15 придатні для індукції ПТГС в рослинах *B. vulgaris* і можуть викликати стійкість до ВНПЖД.

Б: Конструкції з інтроном буряка

Вищеописані експерименти повторювали з великим числом рослин буряка і з використанням конструкцій 2 і 3, які розрізнялися тільки по довжині інтронів.

Було виявлено, що все листя, інфільтроване буфером МА або суспензією *Agrobacterium tumefaciens*, експресуючий гомолог hrGF, зазнають значних уражень приблизно 3-4 мм в діаметрі. На листі рослин, інфільтрованих агрономічним шляхом hr15 (конструкції 2 або 3) взагалі не розвивалися ураження або дуже мале число уражень з максимальним діаметром 1 мм. Результати, представлені на фіг. 7, вказують на те, що конструкція 2 (з інтроном буряка, розміром 91 нт), додає кращий захист проти ВНПЖД.

В: Захист проти інфекції ізоляту Р-типу.

Р-тип ВНПЖД, виявлений в районі Пітів'є у Франції, складається з п'яти плюс-смыслових РНК. Цей ізолят є високо патогенним для буряка. Припускають, що експресія білка Р26 погіршує симптоми ризоманії (26).

Результати, описані вище (у розділі Б), були повторені з використанням Р-типу ВНПЖД як вірусного інокуляту.

Ніяких уражень не спостерігали на листі рослин, інфільтрованих агрономічним шляхом суспензією *Agrobacterium tumefaciens*, експресуючою конструкції hr15.

Таким чином, індукція ПТГС попередником шпилькової конструкції, є добрим джерелом стійкості проти вірусної інфекції, і, зокрема, проти ВНПЖД. Стійкість у рослин була одержана навіть проти найбільш агресивних ізолятів.

Припускають, що експресія конструкції hr15 (у рослинах) призводить до утворення днРНК, яка розпізнається і розрізає на фрагменти розміром приблизно 21-23 нт (міРНК) ферментом Dicer. Р15-специфічні міРНК повинні утворити комплекс ризик (РНК-індукованим сайленсинг-комплексом), який, у свою чергу, направлений на гомолог РНК, РНК2, а також деякі види субгеномів РНК ВНПЖД, і індукуює розщеплювання цих РНК. Таким чином, вірус більше не здатний до перенесення від однієї клітини до іншої.

Приклад 5: Конструкції hr15 за винаходом блокують розмноження вірусу в клітинах кори

Присутність і розповсюдження ВНПЖД (А, В, Р-типів) вивчали в чутливій диплоїдній вирощуваній лінії цукрового буряка 4D6834 ('4D') в джерелах природної стійкості (Holly-1-4, номер по каталогу ('Ho') і *Beta vulgaris* ssp. *maritima* WB42 ('Bm')), і в рослинах буряка, трансформованих за винаходом.

У судинних тканинах білок оболонки вірусу виявлений в межах ситовидних елементів флоєми і судинної паренхіми. Ці спостереження підтверджують дистанційне перенесення по флоємі. Докладні протоколи, наприклад, по вірусній інфекції і імунологічному виявленню див. Doucet, 2006, дисертація на здобуття вченого ступеня кандидата наук, розділ 5, включений тут шляхом посилання.

Показано, що джерела природної стійкості, такі як «Ho», стійкі тільки частково. Стійкість «Ho» руйнувалася, наприклад, за наявності високих титрів вірусу.

Сстійкі рослини за винаходом і рослини генотипів 'Bm' проявляли таке ж обмеження розповсюдження вірусу. Важливою відмінністю між ними, проте, є те, що 'Bm' все ж таки дає можливість вірусу розмножуватися в клітках кори. Таким чином, вірусні частинки все ж таки доступні для *P. betae* (грибковий вектор), який, інфікує переважно кору. Розмноження вірусу і, отже, підтримка інфекційного потенціалу, навіть якщо і у меншій мірі, чим у чутливого сорту, можливо і підтримує наростання інфекційної популяції. Перевага стійкого генотипу за винаходом є наслідком його здатності запобігати розмноженню вірусу в корі. В порівнянні з 'Bm' він повинен знижувати здатність вірусу до підтримки інфекційного потенціалу в ґрунті.

#### Приклад 6: Загальні висновки

З наведених вище Прикладів автори винаходу можуть стверджувати, що стійкість до патогенів, опосередкована hr15 за винаходом, є високо ефективною навіть проти агресивніших ізолятів ВНПЖД.

Конструкції hr15 за винаходом успішно індують стійкість рослини патогенного походження. Всі протестовані конструкції hr15 індують руйнування РНК2 за допомогою ПТГС.

Гомологи hrGF ніколи не запускають механізм ПТГС (візуальне спостереження). В цьому випадку ніколи не спостерігали руйнування РНК2 ВНПЖД (аналіз шляхом нозерн-блоттингу).

Вищеописані приклади відносяться до конструкцій hr15, що містять повнорозмірну послідовність r15. Позитивні результати, однак, також були одержані, коли фрагмент (частина або ділянка) кодуючої послідовності r15 клонували у відповідному векторі в смисловій і антисмисловій орієнтаціях. Наприклад, конструкція, що містить дві третини гена r15 ВНПЖД, також була мішенню міРНК (малі інтерферуючі РНК).

Вищеописане свідчить про те, що шпилькові конструкції P15, що містять генетично модифіковану послідовність TGB-3 ВНПЖД за винаходом або її частину або фрагмент, високо придатні для індукції ПТГС, який призводить в результаті до появи рослин, стійких до ВНПЖД.

Трансформовані рослини переважно відбирають за наступними критеріями для максимального успіху. Відбирають трансформанти, що несуть однокопійну конструкцію, і рослини аналізують на стійкість до інфекції ВНПЖД. Рослини, що продукують високі рівні малих РНК, повинні проявляти дуже високі і міцні рівні стійкості. Трансформація *Agrobacterium* і/або трансформація рослини відповідно до принципів, описаних в EP 1174513, переважні як методика трансформації, оскільки ці методи мінімізують перебудови.

Приклад 7: Скринінг трансформованих рослин, вирощених в інфікованому ґрунті, за допомогою ЕЛАЙЗА

Конструкції: вектор pS138 (фіг. 11) використовували для прямої трансформації гену за допомогою ПЕГ; і вектор pS143 (фіг. 12) використовували для трансформації, опосередкованою *Agrobacterium*. Обидва плазмиди містять шпилькову конструкцію P15-4 (BNP15-Ala4) з короткою інтронною послідовністю (91 п.о.), як показано на

фіг. 1A і 1B. У вказаних конструкціях смислова послідовність r15-4 відповідає SEQ ID NO 3, антисмислова послідовність r15-4 -SEQ ID NO 12, а інтрон - SEQ ID NO 11.

Трансформація за допомогою ПЕГ: трансформацію за допомогою ПЕГ проводили на протопластах замикаючих клітинах цукрового буряка відповідно до способу, описаного в WO 95/10178. Відбір протопласта і каллюсу проводили на 0,2 нМ імазамокси; проростки і рослини відбирали на 20 нМ імазамокси. Проростки, трансформовані за допомогою ПЕГ, були відмічені як THPRxxx.

Трансформація, опосередкована *Agrobacterium*: початковий матеріал для трансформації, опосередкованих *Agrobacterium*, складався з каллюсів, одержаних з протопластів замикаючих клітин цукрового буряка, що розвиваються на альгінатних дисках, що вирощуються на твердому середовищі PG1B (як описано в WO 95/10178).

Штам *Agrobacterium* (HAT 8000) вирощували протягом ночі в середовищі LB з додаванням 25 міліграмів/л стрептоміцину і 2 міліграмів/л тетрацикліну. Перед трансформацією бактерійну культуру центрифугували при 4000 об/хв. протягом 15 хв., і осад ресуспендували в середовищі PGo з додаванням 100 мкМ ацетосірінгону з одержанням щільності інокумуму OD<sub>550</sub> 1,0.

Для інокуляції бактерійну суспензію виливають в чашку Петрі з альгінатом, що містить каллюси, що розвиваються, походять із замикаючих клітин устиць. Через 10 хв. альгінат видаляють і висушують на фільтрувальному папері, після чого поміщають в середовище для сумісного культивування (середовище PG1B з додаванням 100 мкМ ацетосірінгону і 0,9% агарози Seaplaque, рН 5,8). Культури інкубували в темряві при 27°C протягом 1-2 діб, після чого індивідуальні каллюси переносили на селективне середовище з додаванням 125 міліграмів/л цефотаксиму, 0,2 нМ імазамоксу і 0,8% агарози, рН 5,8. Через два тижні каллюси, що вирости, переносили в середовище PBN з додаванням 0,2 нМ імазамоксу і вирощували при світлі при 25°C. Проростки, що розвиваються, і рослини відбирали на 20 нМ імазамокси. Проростки, трансформовані за допомогою *Agrobacterium*, були відмічені як AgHPRxxx.

Скринінг ЕЛАЙЗА: для скринінгу ЕЛАЙЗА використовували трансформанти, що містять тільки 1 або 2 копії шпилькової конструкції. Проростки, одержані *in vitro*, переносили в середовище для вкорінення. Через 6-8 тижнів трансформанти, вкорінені *in vitro*, що володіють добре розвиненою кореневою системою, переносили в суміш ґрунту з піском, заражену *Polymyxa betae*, що містить ВНПЖД патотипу P, зібрану в районі Пітив'є (Франція).

Після чотирьох тижнів інкубації при 18-19°C і 70% відносній вологості пісок і ґрунт відмивали від коріння, і нижні частини коріння використовували для тесту ЕЛАЙЗА. Шматочки коріння висушували на фільтрувальному папері, зважували і переносили в мікропробірки, які заморожували при -60°C протягом однієї ночі з подальшою ліофілізацією протягом 2-3 діб. Після ліофілізації зразки подрібнювали (2 × 1 хв. при 30 об/сек). Відповідну кіль-

кість екстракційного буфера додавали в кожну пробірку. Пробірки струшували до тих пір, поки порошок не був ресуспендований, і центрифугували протягом 10 хв. при 3000 об/хв. У аналізі використовували 150 мкл надосадової рідини.

Вміст вірусу в корінні кожного проростку аналізували за допомогою імуноферментного сендвіч-аналізу з трьома антитілами (TAS-ELISA), використовуючи антитіла, утворені проти білка оболонки вірусу від Neogen (www.neogen.com). Значенням, що відсікається, для стійких рослин було набуто значення OD<sub>405</sub>, рівного 0,2.

Результати: Чим нижче значення ЕЛАЙЗА, тим нижче кількість вірусу, присутнього в кореневій системі аналізованих рослин. Результати двох різних біотестів (Rz2007-001A і Rz2007-002A) підсумовані на фіг. 9 і 10. Наступні рослини цукрового буряка були як позитивний і негативний контроль: 4D6834, чутливий контроль; DK1 8, стійкий контроль, виділений з комерційного селекційного матеріалу; ТМОС1867 і МОХ63MSF1, рослини, трансформовані конструкцією р15-ALA4 (смыслова конструкція, не є шпильковою конструкцією).

У рослин МОХ63MSF1 були виявлені фрагменти малих РНК. Таким чином, у цих рослин генерувався механізм ПТГС, що не запускається сам по собі генетичною конструкцією, ймовірно, в результаті перебудов вставок. Це, можливо, пояснює високий рівень стійкості, що спостерігається у цих рослин.

Сумарно 20 з 29 ліній, трансформованих шпильковою конструкцією р15 за винаходом, забезпечували стійкість до ризоманії. Було виявлено, що тільки наступні лінії є чутливими: THPR82, THPR90, AgHr150, AgHr155, THPR12, THPR15, THPR53, THPR239 і THPR270.

Вищеописані дані підтверджують ще раз, що стійкість до патогенів, опосередкована hr15 за винаходом, дійсно є високо ефективною навіть проти агресивніших ізолятів ВНПЖД. Високі рівні імунітету спостерігали, наприклад, в наступних лініях трансформованих рослин біотесту RZ2007-002A: THPR26, THPR118, THPR222 і THPR289. Рослини з високим рівнем імунітету переважно мають значення OD<sub>400</sub> нижче 0,05, переважніше, нижче 0,01 або близьке 0 (нулю).

#### Посилання

1. Tamada T. & Baba T., Annals of the Phytopathological Society of Japan 39, pp. 325-332(1973)
2. Kuszala M.& Putz C, Annals of Phytopathology 9, pp. 435-446 (1977)

3. Keskin B., Archiv fur Mikrobiology 49, pp. 348-374 (1964)
4. Asher M.J.C., Rhizomania In The sugar beet crop, ed. 10 D.A. Cooke and R.K. Scott, Chapman & Hall, London, pp. 312-338 (1993)
5. Richard-Molard M., Rhizomanie In Institut frangais de la betterave industrielle. Compte-rendu des travaux effectues en 1994, ITB, Paris pp. 225-229 (1995)
6. Powell A.P. et al., Science 232, pp. 738-743 (1986)
7. Fritchen J.H. & Beachy R.N., Ann. Rev. Microbiol. 47, pp. 739-763 (1993)
8. Wilson T.M.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, pp. 3134-3141 (1993)
9. Gonsalves D. & Slightom J.L., Seminars in Virology 4, pp. 397-405 (1993)
10. D'Halluin K. et al., Biotechnology 10, pp. 309-314 (1992)
11. Kallerhof J. et al., Plant Cell Reports 9, pp. 224-228 25 (1990)
12. Ehlers U. et al., Theoretical and Applied Genetic 81, pp. 777-782 (1991)
13. Kraus J. et al., Field performance of transgenic sugar beet plants expressing BNYW coat protein plants, Fourth International Congress of Plant Molecular Biology, Int. Soc. for Plant Molecular Biology, Amsterdam (1994)
14. Maiss E. et al., Proceedings of the Third International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms, Monterey, pp. 129-139 (1994)
15. Gilmer et al., Virology 189, pp. 40-47 (1992)
16. Bleykasten-Grosshans et al., Mol. Plant-Microbe Interact. 10, pp. 240-246 (1997)
17. Bouzoubaa et al., J. Gen. Virol. 67, pp. 1689-1700 (1986)
18. Richards & Tamada, Annu. Revendication. Phytopathol., pp. 291-313 (1992)
19. Bouzoubaa et al., J. Gen. Virol. 68, pp. 615-626 (1987)
20. Herzog et al., J. Gen. Virol. 18, pp. 3147-3155 (1994)
21. Scott et al., J. Gen. Virol. 75, pp. 3561-3568 (1994)
22. Koonin & Dolja, Crit. Revendication. Biochem. and Mol. Biol. 28, pp. 375-430(1993)
23. Zuker and Stiegler, Nucl. Acids Res. 9, pp. 133-148 (1981)
24. Higgins, Encyclopedia of Life Sciences, pp. 1-10 (2001)
25. Raska et al., Biology of the Cell 96, pp. 579-594 (2004)

Таблиця 1

Вірус	Розмір TGB-3	Хазяїн	Посилання
Вірус розтріскування стовбура яблуні	8 кДа	яблуко	Jelkman, J. Gen. Virol. 75, 1535-1542(1994)
Вірус плямистості чорниці	7 кДа	чорниця	Cavileer et al., J. Gen. Virol. 75,711-720(1994)
Вірус картоплі М	7 кДа	картопля	Zavriev et al., J. Gen. Virol. 72,9-14(1991)
Вірус мозаїки білої конюшини	8 кДа	конюшина	Forster et al., Nucl. Acids Res. 16,291-303(1988)
Вірус мозаїки Cymbidium	10 кДа	орхідея	Neo et al., Plant Mol. Biol. 18,1027-1029(1992)
Вірус картоплі Х	8 кДа	картопля	Rupasov et al., J. Gen. Virol. 70, 1861-1869(1994)
Вірус помилкової штрихової ячменю	17 кДа	ячмінь	Gustafson et al., Nucl. Acids Res. 164, 3895-3909 (1986)
Вірус курчавості верхівки картоплі	21 кДа	картопля	Scott et al., J. Gen. Virol. 75,3561-3568(1994)
Вірус кущуватості земляного горіха	17 кДа	земляний горіх	Herzog et al., J. Gen. Virol. 75,3147-3155(1994)
Вірус буряка, що передається через ґрунт	22 кДа	цукровий буряк	Koenig et al., Virillogy 216, 202-207(1996)

Таблиця 2

Виявлення експресії білка Р15 Р15-специфічних міРНК в трансгенних рослинах

Лінія, Але.	Чутливість до ВНПЖД	Експресія білка Р15	Виявлення міРНК
178	R	+	+
179	R	+	+
180	S	++	

R: лінія рослин, стійких до ВНПЖД; S: лінія рослин, чутливих до ВНПЖД +: слабе виявлення; ++: сильне виявлення; -: не виявлена

## Перелік послідовностей

&lt;110&gt; ЗЕСВАНДЕРХАВЕ Н.В.

&lt;120&gt; Конструкція-«шпильки» і застосування

&lt;130&gt; BP.SES.002C/WO

&lt;160&gt; 14

&lt;170&gt; PatentIn версія 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 399

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Генетично модифікована послідовність TGB-3: BNP15-Ala1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(399)

&lt;400&gt; 1

atg	gtg	ctt	gtg	ggt	gca	gta	gct	tta	tct	aat	att	gta	ttg	tac	ata	48
Met	Val	Leu	Val	Val	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Asn	Ile	Val	Leu	Tyr	Ile	
1			5					10					15			

ggt	gcc	ggt	tgt	ggt	gtc	agt	atg	ttg	tac	tca	ccg	ttt	ttc	agc	96	
Val	Ala	Gly	Cys	Val	Val	Val	Ser	Met	Leu	Tyr	Ser	Pro	Phe	Phe	Ser	
			20				25					30				

aac	gat	ggt	aaa	gcg	tcc	agc	tat	gcg	gga	gca	att	ttt	aag	ggg	agc	144
Asn	Asp	Val	Lys	Ala	Ser	Ser	Tyr	Ala	Gly	Ala	Ile	Phe	Lys	Gly	Ser	
		35					40					45				

ggc	tgt	atc	atg	gac	agg	aat	tcg	ttt	gct	caa	ttt	ggg	agt	tgc	gat	192
Gly	Cys	Ile	Met	Asp	Arg	Asn	Ser	Phe	Ala	Gln	Phe	Gly	Ser	Cys	Asp	
	50					55					60					

att	cca	aag	cat	gta	gcc	gag	tcc	atc	act	aag	ggt	gcc	acc	aaa	gag	240
Ile	Pro	Lys	His	Val	Ala	Glu	Ser	Ile	Thr	Lys	Val	Ala	Thr	Lys	Glu	
65				70					75					80		

cac	gat	ggt	gac	ata	atg	gta	aaa	agg	ggt	gaa	gtg	acc	ggt	cgt	ggt	288
His	Asp	Val	Asp	Ile	Met	Val	Lys	Arg	Gly	Glu	Val	Thr	Val	Arg	Val	
			85						90				95			

gtg	act	ctc	ace	gaa	act	att	ttt	ata	ata	tta	tct	aga	ttg	ttt	ggg	336
Val	Thr	Leu	Thr	Glu	Thr	Ile	Phe	Ile	Ile	Leu	Ser	Arg	Leu	Phe	Gly	
			100				105						110			

ttg	gcg	gtg	ttt	ttg	ttc	atg	ata	tgt	tta	atg	tct	ata	ggt	tgg	ttt	384
Leu	Ala	Val	Phe	Leu	Phe	Met	Ile	Cys	Leu	Met	Ser	Ile	Val	Trp	Phe	
		115				120						125				

tgg	tat	cat	aga	taa												399
Trp	Tyr	His	Arg													
		130														

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; ПРТ

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

<223> Синтетична конструкція <400> 2

Met Val Leu Val Val Ala Val Ala Leu Ser Asn Ile Val Leu Tyr Ile  
1 5 10 15

Val Ala Gly Cys Val Val Val Ser Met Leu Tyr Ser Pro Phe Phe Ser  
20 25 30

Asn Asp Val Lys Ala Ser Ser Tyr Ala Gly Ala Ile Phe Lys Gly Ser  
35 40 45

Gly Cys Ile Met Asp Arg Asn Ser Phe Ala Gln Phe Gly Ser Cys Asp  
50 55 60

Ile Pro Lys His Val Ala Glu Ser Ile Thr Lys Val Ala Thr Lys Glu  
65 70 75 80

His Asp Val Asp Ile Met Val Lys Arg Gly Glu Val Thr Val Arg Val  
85 90 95

Val Thr Leu Thr Glu Thr Ile Phe Ile Ile Leu Ser Arg Leu Phe Gly  
100 105 110

Leu Ala Val Phe Leu Phe Met Ile Cys Leu Met Ser Ile Val Trp Phe  
115 120 125

Trp Tyr His Arg  
130

<210> 3

<211> 399

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Генетично модифікована послідовність TGB-3: BNP15-Ala4

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(399)

<400> 3

atg gtg ctt gtg gtt aaa gta gat tta tct aat att gta ttg tac ata 48  
Met Val Leu Val Val Lys Val Asp Leu Ser Asn Ile Val Leu Tyr Ile  
1 5 10 15

gtt gcc ggt tgt gtt gtt gtc agt atg ttg tac tca ccg ttt ttc agc 96  
Val Ala Gly Cys Val Val Val Ser Met Leu Tyr Ser Pro Phe Phe Ser  
20 25 30

aac gat gtt aaa gcg tec agc tat gcg gga gca att ttt aag ggg agc 144  
Asn Asp Val Lys Ala Ser Ser Tyr Ala Gly Ala Ile Phe Lys Gly Ser  
35 40 45

ggc tgt atc atg gcc gcg aat tcg ttt gct caa ttt ggg agt tgc gat 192  
Gly Cys Ile Met Ala Ala Asn Ser Phe Ala Gln Phe Gly Ser Cys Asp  
50 55 60

47

94451

48

```

att cca aag cat gta gcc gag tcc atc act aag gtt gcc acc aaa gag      240
Ile Pro Lys His Val Ala Glu Ser Ile Thr Lys Val Ala Thr Lys Glu
65                               70                               75                               80

cac gat gtt gac ata atg gta aaa agg ggt gaa gtg acc gtt cgt gtt      288
His Asp Val Asp Ile Met Val Lys Arg Gly Glu Val Thr Val Arg Val
                               85                               90                               95

gtg act ctc acc gaa act att ttt ata ata tta tct aga ttg ttt ggt      336
Val Thr Leu Thr Glu Thr Ile Phe Ile Ile Leu Ser Arg Leu Phe Gly
                               100                              105                              110

ttg gcg gtg ttt ttg ttc atg ata tgt tta atg tct ata gtt tgg ttt      384
Leu Ala Val Phe Leu Phe Met Ile Cys Leu Met Ser Ile Val Trp Phe
                               115                              120                              125

tgg tat cat aga taa
Trp Tyr His Arg
130

```

```

<210> 4
<211> 132
<212> PPT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична конструкція
<400> 4

```

```

Met Val Leu Val Val Lys Val Asp Leu Ser Asn Ile Val Leu Tyr Ile
1 .                               5                               10                               15

Val Ala Gly Cys Val Val Val Ser Met Leu Tyr Ser Pro Phe Phe Ser
                               20                               25                               30

Asn Asp Val Lys Ala Ser Ser Tyr Ala Gly Ala Ile Phe Lys Gly Ser
35                               40                               45

Gly Cys Ile Met Ala Ala Asn Ser Phe Ala Gln Phe Gly Ser Cys Asp
50                               55                               60

Ile Pro Lys His Val Ala Glu Ser Ile Thr Lys Val Ala Thr Lys Glu
65                               70                               75                               80

His Asp Val Asp Ile Met Val Lys Arg Gly Glu Val Thr Val Arg Val
                               85                               90                               95

Val Thr Leu Thr Glu Thr Ile Phe Ile Ile Leu Ser Arg Leu Phe Gly
100                              105                              110

Leu Ala Val Phe Leu Phe Met Ile Cys Leu Met Ser Ile Val Trp Phe
115                              120                              125

Trp Tyr His Arg
130

```

```

<210> 5

```



<211> 399  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Генетично модифікована послідовність TGB-3: BNP15-Asp9

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(399)

<400> 5

```

atg gtg ctt gtg gtt aaa gta gat tta tct aat att gta ttg tac ata 48
Met Val Leu Val Val Lys Val Asp Leu Ser Asn Ile Val Leu Tyr Ile
1 5 10 15

gtt gcc ggt tgt gtt gtt gtc agt atg ttg tac tca ccg ttt ttc agc 96
Val Ala Gly Cys Val Val Val Ser Met Leu Tyr Ser Pro Phe Phe Ser
20 25 30

aac gat gtt aaa gcg tcc agc tat gcg gga gca att ttt aag ggg agc 144
Asn Asp Val Lys Ala Ser Ser Tyr Ala Gly Ala Ile Phe Lys Gly Ser
35 40 45

ggc tgt atc atg gac agg aat tcg ttt gct caa ttt ggg agt tgc gat 192
Gly Cys Ile Met Asp Arg Asn Ser Phe Ala Gln Phe Gly Ser Cys Asp
50 55 60

att cca aag cat gta gcc gag tcc ate act aag gtt gcc acc aaa gag 240
Ile Pro Lys His Val Ala Glu Ser Ile Thr Lys Val Ala Thr Lys Glu
65 70 75 80

cac gat gtt gac ata atg gta aaa agg ggt gaa gtg acc gtt cgt gtt 288
His Asp Val Asp Ile Met Val Lys Arg Gly Glu Val Thr Val Arg Val
85 90 95

gtg act ctc acc gaa act att ttt ata ata tta tct aga ttg ttt ggt 336
Val Thr Leu Thr Glu Thr Ile Phe Ile Ile Leu Ser Arg Leu Phe Gly
100 105 110

ttg gat gat ttt ttg ttc atg ata tgt tta atg tct ata gtt tgg ttt 384
Leu Asp Asp Phe Leu Phe Met Ile Cys Leu Met Ser Ile Val Trp Phe
115 120 125

tgg tat cat aga taa 399
Trp Tyr His Arg
130

```

<210> 6

<211> 132

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 6

```

Met Val Leu Val Val Lys Val Asp Leu Ser Asn Ile Val Leu Tyr Ile
1 5 10 15

Val Ala Gly Cys Val Val Val Ser Met Leu Tyr Ser Pro Phe Phe Ser
20 25 30

Asn Asp Val Lys Ala Ser Ser Tyr Ala Gly Ala Ile Phe Lys Gly Ser

```

51

94451

52

35

40

45

Gly Cys Ile Met Asp Arg Asn Ser Phe Ala Gln Phe Gly Ser Cys Asp  
50 55 60

Ile Pro Lys His Val Ala Glu Ser Ile Thr Lys Val Ala Thr Lys Glu  
65 70 75 80

His Asp Val Asp Ile Met Val Lys Arg Gly Glu Val Thr Val Arg Val  
85 90 95

Val Thr Leu Thr Glu Thr Ile Phe Ile Ile Leu Ser Arg Leu Phe Gly  
100 105 110

Leu Asp Asp Phe Leu Phe Met Ile Cys Leu Met Ser Ile Val Trp Phe  
115 120 125

Trp Tyr His Arg  
130

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 399

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Вірус некротичного поживіння жилок буряка

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(399)

&lt;223&gt; Послідовність дикого типу p15

&lt;400&gt; 7

atg gtg ctt gtg gtt aaa gta gat tta tct aat att gta ttg tac ata 48  
Met Val Leu Val Lys Val Asp Leu Ser Asn Ile Val Leu Tyr Ile  
1 5 10 15

gtt gcc ggt tgt gtt gtt gtc agt atg ttg tac tca ccg ttt ttc agc 96  
Val Ala Gly Cys Val Val Val Ser Met Leu Tyr Ser Pro Phe Phe Ser  
20 25 30

aac gat gtt aaa gcg tcc agc tat gcg gga gca att ttt aag ggg agc 144  
Asn Asp Val Lys Ala Ser Ser Tyr Ala Gly Ala Ile Phe Lys Gly Ser  
35 40 45

ggc tgt atc atg gac agg aat tcg ttt gct caa ttt ggg agt tgc gat 192  
Gly Cys Ile Met Asp Arg Asn Ser Phe Ala Gln Phe Gly Ser Cys Asp  
50 55 60

att cca aag cat gta gcc gag tcc atc act aag gtt gcc acc aaa gag 240  
Ile Pro Lys His Val Ala Glu Ser Ile Thr Lys Val Ala Thr Lys Glu  
65 70 75 80

cac gat gtt gac ata atg gta aaa agg ggt gaa gtg acc gtt cgt gtt 288  
His Asp Val Asp Ile Met Val Lys Arg Gly Glu Val Thr Val Arg Val  
85 90 95

gtg act ctc acc gaa act att ttt ata ata tta tct aga ttg ttt ggt 336  
Val Thr Leu Thr Glu Thr Ile Phe Ile Ile Leu Ser Arg Leu Phe Gly  
100 105 110

ttg gcg gtg ttt ttg ttc atg ata tgt tta atg tct ata gtt tgg ttt 384  
Leu Ala Val Phe Leu Phe Met Ile Cys Leu Met Ser Ile Val Trp Phe

115 120 125 399  
 tgg tat cat aga taa  
 Trp Tyr His Arg  
 130

<210> 8  
 <211> 132  
 <212> ПРТ  
 <213> Вірус некротичного пожовтіння жилок буряка  
 <400> 8

Met Val Leu Val Val Lys Val Asp Leu Ser Asn Ile Val Leu Tyr Ile  
 1 5 10 15  
 Val Ala Gly Cys Val Val Val Ser Met Leu Tyr Ser Pro Phe Phe Ser  
 20 25 30  
 Asn Asp Val Lys Ala Ser Ser Tyr Ala Gly Ala Ile Phe Lys Gly Ser  
 35 40 45  
 Gly Cys Ile Met Asp Arg Asn Ser Phe Ala Gln Phe Gly Ser Cys Asp  
 50 55 60  
 Ile Pro Lys His Val Ala Glu Ser Ile Thr Lys Val Ala Thr Lys Glu  
 65 70 75 80  
 His Asp Val Asp Ile Met Val Lys Arg Gly Glu Val Thr Val Arg Val  
 85 90 95  
 Val Thr Leu Thr Glu Thr Ile Phe Ile Ile Leu Ser Arg Leu Phe Gly  
 100 105 110  
 Leu Ala Val Phe Leu Phe Met Ile Cys Leu Met Ser Ile Val Trp Phe  
 115 120 125  
 Trp Tyr His Arg  
 130

<210> 9  
 <211> 902  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> hp15 конструкція 2: з послідовністю інтрону буряка довжиною 91 нуклеотид

<400> 9  
 atcgtgcttg tgggttaaagt agatttatct aatattgtat tgtacatagt tgccggttgt 60  
 gttgttgtca gtatgttgta ctacccgttt ttcagcaacg atgttaaagc gtccagctat 120  
 gcgaggagcaa ttttttaaagg gagcggctgt atcatggccg cgaattcggt tgctcaattt 180  
 gggagttgag atattccaaa gcatgtagcc gagtccatca ctaagggtgc caccaaagag 240  
 cacgatgttg acataatggt aaaaaggggt gaagtgaccg ttcgtgttgt gactctcacc 300

```

gaaactatTT ttataatatt atctagattg tttgggtttg cggtgttttt gttcatgata 360
tgTTtaatgt ctatagtttg gttttggtat catagacaag gtacctaaat cctggtttta 420
tatgtactac tgtttagct gaaatttagg tcttcttgct gaaatttatt tctgtttcgt 480
tttactgtt attcagtatc gatttgtcta tgataccaaa accaaactat agacattaaa 540
catatcatga acaaaaacac cgccaaacca aacaatctag ataattattat aaaaatagtt 600
tcggtgagag tcacaacacg aacggtcact tcacctttt ttaccattat gtcaacatcg 660
tgctcttttg tggcaacctt agtgatggac tcggctacat gctttggaat atcgcaactc 720
ccaaattgag caaacgaatt cgcggccatg atacagccgc tccctttaa aattgctccc 780
gcatagctgg acgctttaac atcgttgctg aaaaacggtg agtacaacat actgacaaca 840
acacaaccgg caactatgta caatacaata ttagataaat ctactttaac cacaagcacg 900
at 902

```

<210> 10  
 <211> 399  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Смысловая последовательность p15 (на основе модифицированной последовательности BNP15-Ala4)

```

<400> 10
atcgTgcttg tggTTaaagt agatttatct aatattgtat tgtacatagt tgccggttgt 60
gttGttgtca gtatgttgta ctaccggtt ttacgcaacg atgttaaagc gtccagctat 120
gcgggagcaa tttttaaagg gagcggctgt atcatggccg cgaattcgtt tgctcaattt 180
gggagttgcg atattccaaa gcatgtagcc gagtccatca ctaaggttgc caccaaagag 240
cacgatgttg acataatggt aaaaaggggt gaagtgaccg ttcgtgttgt gactctcacc 300
gaaactatTT ttataatatt atctagattg tttgggtttg cggtgttttt gttcatgata 360
tgTTtaatgt ctatagtttg gttttggtat catagacaa 399

```

<210> 11  
 <211> 91  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Последовательность интрона (происходит из бургундского): длиной 91 нуклеотид

```

<400> 11
tcctggTTTT atatgtacta ctgttgtagc tgaaatttag gtcttcttgc tgaaatttat 60
ttctgtttcg ttttactgt tattcagtat c 91

```

<210> 12  
 <211> 399  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Антисмысловая последовательность p15 (на основе последовательности BNP15-Ala4 sequence)

<400> 12  
 ttgtctatga taccaaaaacc aaactataga cattaaacat atcatgaaca aaaacaccgc 60  
 caaaccaaac aatctagata atattataaa aatagtttcg gtgagagtca caacacgaac120  
 ggtcacttca ccccttttta ccattatgtc aacatcgtgc tctttggtgg caaccttagt180  
 gatggactcg gctacatgct ttggaatatc gcaactccca aattgagcaa acgaattcgc240  
 ggccatgata cagccgctcc ctttaaaaat tgctcccgca tagctggacg ctttaacatc300  
 gttgctgaaa aacgggtgagt acaacatact gacaacaaca caaccggcaa ctatgtacaa360  
 tacaatatta gataaatcta ctttaaccac aagcacgat 399

<210> 13  
 <211> 1360  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> hpl5 конструкція 3: з послідовністю інтрону буряка довжиною 555 нуклеотидів

<400> 13  
 atcgtgcttg tggttaaagt agatttatct aatattgtat tgtacatagt tgccggttgt 60  
 gttgttgtca gtatgttgta ctaccggtt ttacgcaacg atgttaaagc gtccagctat 120  
 gcgggagcaa tttttaaagg gagcggctgt atcatggccg cgaattcgtt tgctcaattt 180  
 gggagttgag atattccaaa gcatgtagcc gagtccatca ctaaggttgc caccaaagag 240  
 cacgatgttg acataatggt aaaaaggggt gaagtgaccg ttcgtgttgt gactctcacc 300  
 gaaactatct ttataatatt atctagattg tttggtttgg cgggtgtttt gttcatgata 360  
 tgtttaatgt ctatagtttg gttttggtat catagacaag gtaccacggt tttctctctc 420  
 ctaatttttc tcactttttt ttcattctcat tctgttttat gttctgtgaa tttattagta 480  
 gatttatcta cttttctatc taattttgac gctagattaa tgattcagtt ttattattac 540  
 attttccgga aaattgggta agttttgata atttaaatga ttttttttcc gtgatcaaat 600  
 tgtagaaatt gtttaagttc gatagtttat atctttatga atttttgtgt ttgatctgat 660  
 gatagtttta gtgattattg taacttttga aagtgtgtgt ttttatgtgt gtagcgattt 720  
 gtatagtaaa taagattaat gatcatggct aaattatggc gtaggtaaat tttagaagaa 780  
 agtatttttt tgctaaattg aagtcattctg cgtcgtatta ttgcatgttc tgcaacttta 840  
 ctactgtgaat tgagtttgct gattggatat tctttatgat tgaagttgtt ttgctattga 900  
 atattcttta tgagattttt gaatgaagat ttttctgtaa ttaatatgat caggatcga 960  
 tttgtctatg ataccaaaac caaactatag acattaaaca tatcatgaac aaaaacaccg 1020  
 ccaaaccaaa caatctagat aatattataa aaatagtttc ggtgagagtc acaacacgaa 1080  
 cggtcacttc accccttttt accattatgt caacatcgtg ctctttggtg gcaaccttag 1140  
 tgatggactc ggctacatgc tttggaatat cgcaactccc aaattgagca aacgaattcg 1200  
 cggccatgat acagccgctc cctttaaaaa ttgctccgc atagctggac gctttaacat 1260  
 cgttgctgaa aaacggtgag tacaacatac tgacaacaac acaaccggca actatgtaca 1320

atacaatatt agataaatct actttaacca caagcacgat

1360

<210> 14  
<211> 550  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність інтрону (походить з буряка): довжиною 550 нуклеотидів

<400> 14

acgtttttct ctctcctaatt ttttctcact tttttttcat ctcattctgt tttatgttct 60  
gtgaatttat tagtagattt atctactttt ctacttaatt ttgacgctag attaatgatt 120  
cagttttatt attacatttt ccggaataatt ggttaagttt tgataattta aatgattttt 180  
tttccgtgat caaattgtag aaattgttta agttcgatag tttatatctt tatgaatttt 240  
tgtgtttgat ctgatgatag ttttagtgat tattgttaact ttgaaagtgt tgtgttttta 300  
tgtgtgtagc gattttgtata gtaaataaga ttaatgatca tggctaaatt atggcgtagg 360  
ttaatttttag aagaaagtat ttttttgcta aattgaagtc atctgcgtcg tattattgcg 420  
atctctgcac ttttactagc tgaattgagt ttgctgattg gatattcttt atgattgaag 480  
ttgttttgct attgaatatt ctttatgaga tttttgaatg aagatttttc tgtaattaat 540  
atgatcaggt 550

P15 смислова	P15 антисмислова
--------------	------------------

Інtron

91 п.о.

### Фиг.1А

ATCGTGCTTG TGGTTAAAGT AGATTTATCT AATATTGTAT TGTACATAGT TGCCGGTTGT  
GTTGTTGTCA GTATGTTGTA CTCACCGTTT TTCAGCAACG ATGTTAAAGC GTCCAGCTAT  
GCGGGAGCAA TTTTAAAGG GAGCGGCTGT ATCATGGCCG CGAATTCGTT TGCTCAATTT  
GGGAGTTGCG ATATTCCAAA GCATGTAGCC GAGTCCATCA CTAAGGTTGC CACCAAAGAG  
CACGATGTTG ACATAATGGT AAAAAGGGGT GAAGTGACCG TTCGTGTTGT GACTCTCACC  
GAAACTATTT TTATAATATT ATCTAGATTG TTTGGTTTGG CGGTGTTTTT GTTCATGATA  
TGTTTAATGT CTATAGTTTG GTTTTGGTAT CATAGACAAG GTACCTAAAT CCTGGTTTTA  
TATGTAATAC TGTGTAGCT GAAATTTAGG TCTTCTTGCT GAAATTTATT TCTGTTTCGT  
TTTCACTGTT ATTCAGTATC GATTGTCTA TGATACCAA ACCAACTAT AGACATTA  
CATATCATGA AAAAAACAC CGCCAAACCA AACAATCTAG ATAATATTAT AAAAATAGTT  
TCGGTGAGAG TCACAACACG AACGGTCACT TCACCCCTTT TTACCATTAT GTCAACATCG  
TGCTCTTTGG TGGCAACCTT AGTGATGGAC TCGGCTACAT GCTTTGGAAT ATCGCAACTC  
CCAAATTGAG CAAACGAATT CGCGGCCATG ATACAGCCGC TCCCTTTAAA AATTGCTCCC  
GCATAGCTGG ACGCTTTAAC ATCGTTGCTG AAAAACGGTG AGTACAACAT ACTGACAACA  
ACACAACCGG CAACTATGTA CAATACAATA TTAGATAAAT CTACTTTAAC CACAAGCACG  
AT (SEQ ID NOS 9, 10, 1: и d 12)

### Фиг.1Б

P15 смислова	Інtron 550 п.о.	P15 антисмислова
--------------	-----------------	------------------

### Фиг.2А



ATCGTGCTTG TGGTTAAAGT AGATTTATCT AATATTGTAT TGTACATAGT TGCCGGTTGT  
 GTTGTTGTCA GTATGTTGTA CTCACCGTTT TTCAGCAACG ATGTTAAAGC GTCCAGCTAT  
 GCGGGAGCAA TTTTAAAGG GAGCGGCTGT ATCATGGCCG CGAATTCGTT TGCTCAATTT  
 GGGAGTTGCG ATATTCCAAA GCATGTAGCC GAGTCCATCA CTAAGGTTGC CACCAAAGAG  
 CACGATGTTG ACATAATGGT AAAAAGGGGT GAAGTGACCG TTCGTGTTGT GACTCTCACC  
 GAAACTATTT TTATAATATT ATCTAGATTG TTTGGTTTGG CGGTGTTTTT GTTCATGATA  
 TGTTTAATGT CTATAGTTTG GTTTTGGTAT CATAGACAAG GTACCACGTT TTTCTCTCTC  
 CTAATTTTTT TCACTTTTTT TTCATCTCAT TCTGTTTTAT GTTCTGTGAA TTTATTAGTA  
 GATTTATCTA CTTTTCTATC TAATTTTGAC GCTAGATTAA TGATTCAGTT TTATTATTAC  
 ATTTTCCGGA AAATTGGTTA AGTTTTGATA ATTTAAATGA TTTTTTTTCC GTGATCAAAT  
 TGTAGAAATT GTTTAAGTTC GATAGTTTAT ATCTTTATGA ATTTTGTGT TTGATCTGAT  
 GATAGTTTTA GTGATTATTG TAACTTTTGA AAGTGTGTGT TTTTATGTGT GTAGCGATTT  
 GTATAGTAAA TAAGATTAAT GATCATGGCT AAATTATGGC GTAGGTTAAT TTTAGAAGAA  
 AGTATTTTTT TGCTAAATTG AAGTCATCTG CGTCGTATTA TTGCGATTTC TGCACTTTTA  
 CTAGCTGAAT TGAGTTTGCT GATTGGATAT TCTTTATGAT TGAAGTTGTT TGCTATTGA  
 ATATTCTTTA TGAGATTTTT GAATGAAGAT TTTTCTGTAA TTAATATGAT CAGGTATCGA  
 TTTGTCTATG ATACCAAAAC CAAACTATAG ACATTAAACA TATCATGAAC AAAACACCGG  
 CCAAACCAA CAATCTAGAT AATATTATAA AAATAGTTTC GGTGAGAGTC ACAACACGAA  
 CGGTCATTC ACCCCTTTTT ACCATTATGT CAACATCGTG CTCTTTGGTG GCAACCTTAG  
 TGATGGACTC GGCTACATGC TTTGGAATAT CGCAACTCCC AAATTGAGCA AACGAATTGCG  
 CGGCCATGAT ACAGCCGCTC CCTTTAAAAA TTGCTCCCGC ATAGCTGGAC GCTTTAACAT  
 CGTTGCTGAA AAACGGTGAG TACAACATAC TGACAACAAC ACAACCGGCA ACTATGTACA  
 ATACAATATT AGATAAATCT ACTTTAACCA CAAGCAGGAT (SEQ ID NOS 13, 9, 14  
 и 12)

### Фиг.2Б

ATGGTGCTTGTTGGTTAAAGTAGATTTATCTAATATTGTATTGTACATAGTTGCCGGTTGT 60  
 M V L V V K V D L S N I V L Y I V A G C  
 GTTGTTGTCAAGTATGTTGTACTCACCGTTTTTCAGCAACGATGTTAAAGCGTCCAGCTAT 120  
 V V V S M L Y S P F F S N D V K A S S Y  
 GCGGGAGCAATTTTAAAGGGGAGCGGCTGTATCATGGACAGGAATTCGTTTGCTCAATTT 180  
 A G A I F K G S G C I M D R N S F A Q F  
 GGGAGTTGCGATATTTCAAAGCATGTAGCCGAGTCCATCACTAAGGTTGCCACCAAAGAG 240  
 G S C D I P K H V A E S I T K V A T K E  
 CACGATGTTGACATAATGGTAAAAAGGGGTGAAGTGACCGTTCGTGTTGTGACTCTCACC 300  
 H D V D I M V K R G E V T V R V V T L T  
 GAAACTATTTTTATAATATTATCTAGATTGTTTGGTTTGGCGGTGTTTTTGTTCATGATA 360  
 E T I F I I L S R L F G L A V F L F M I  
 TGTTTAATGTCTATAGTTTGGTTTGGTATCATAGATAA 399 (SEQ ID NO 7)  
 C L M S I V W F W Y H R \* (SEQ ID NO 8)

### Фиг.3

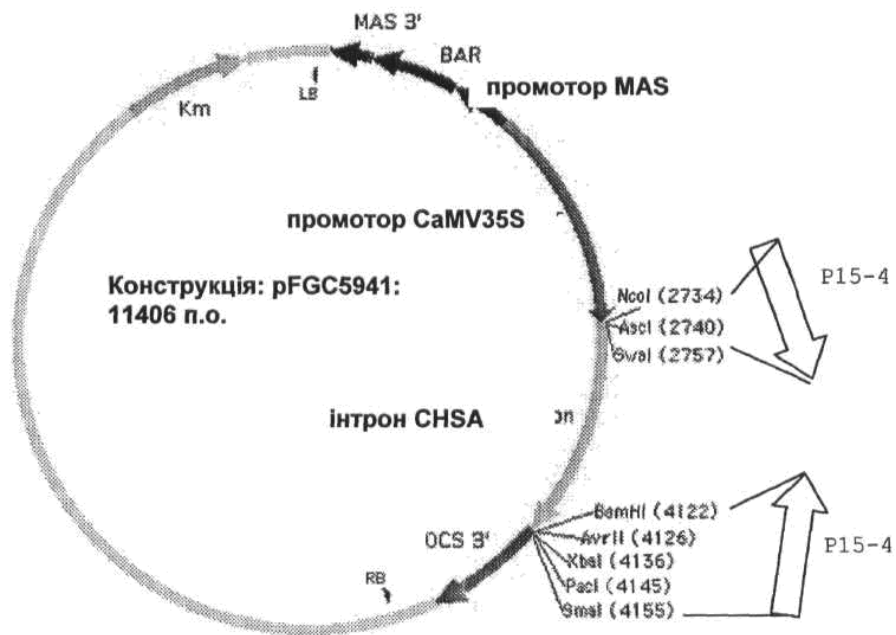


Fig.4

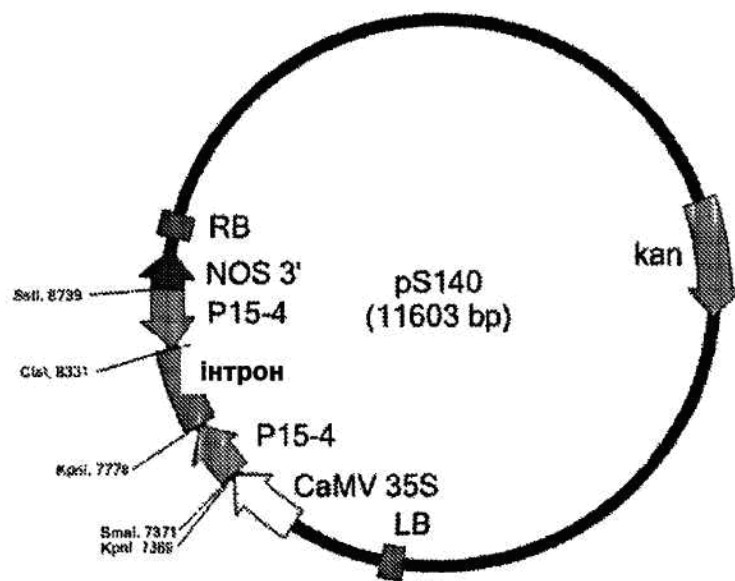
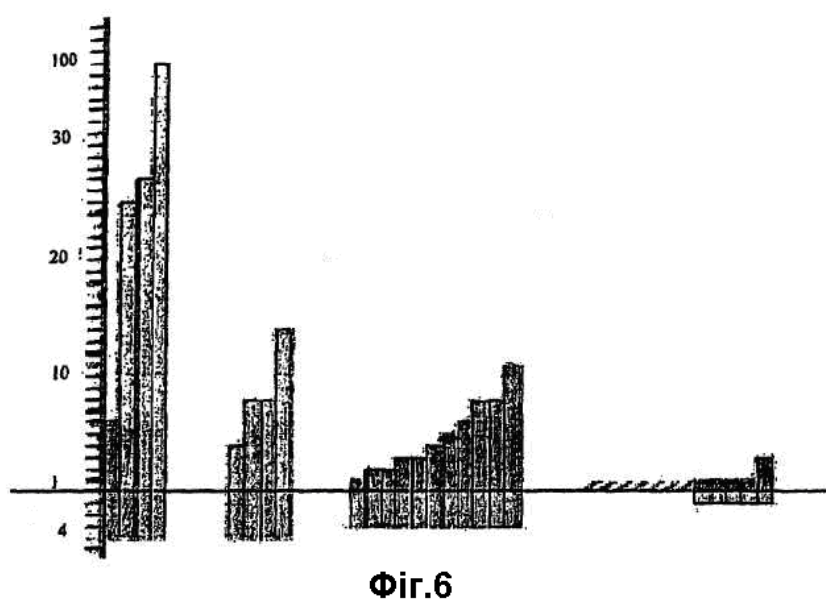
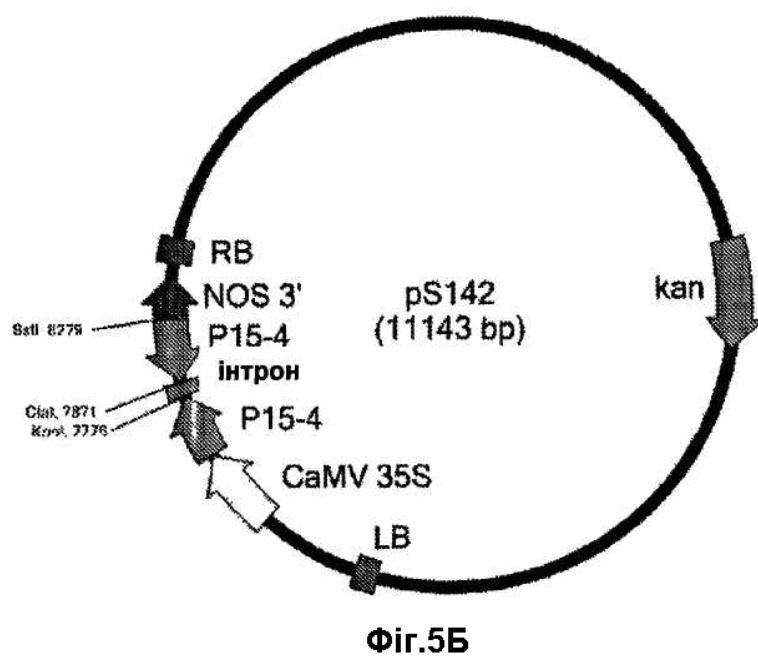
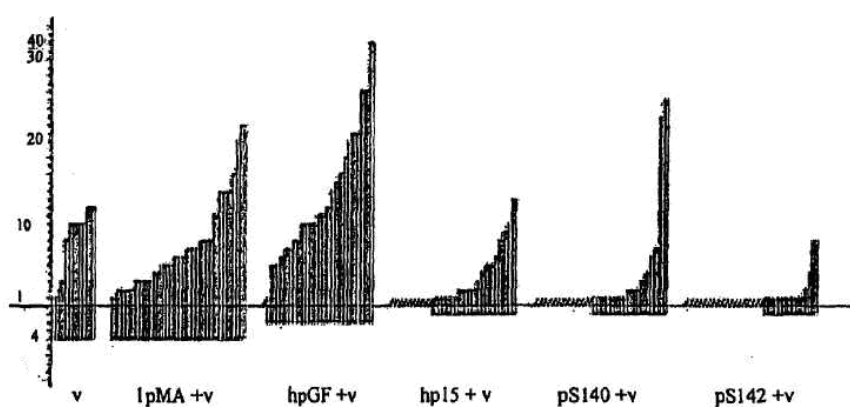


Fig.5A





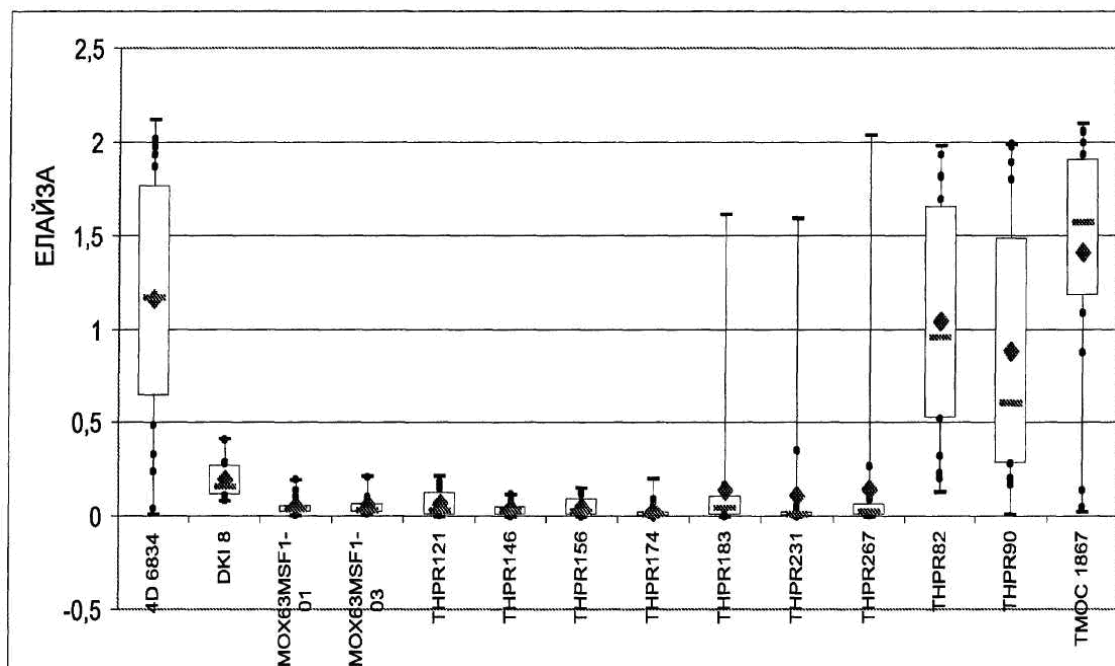


Фир.7

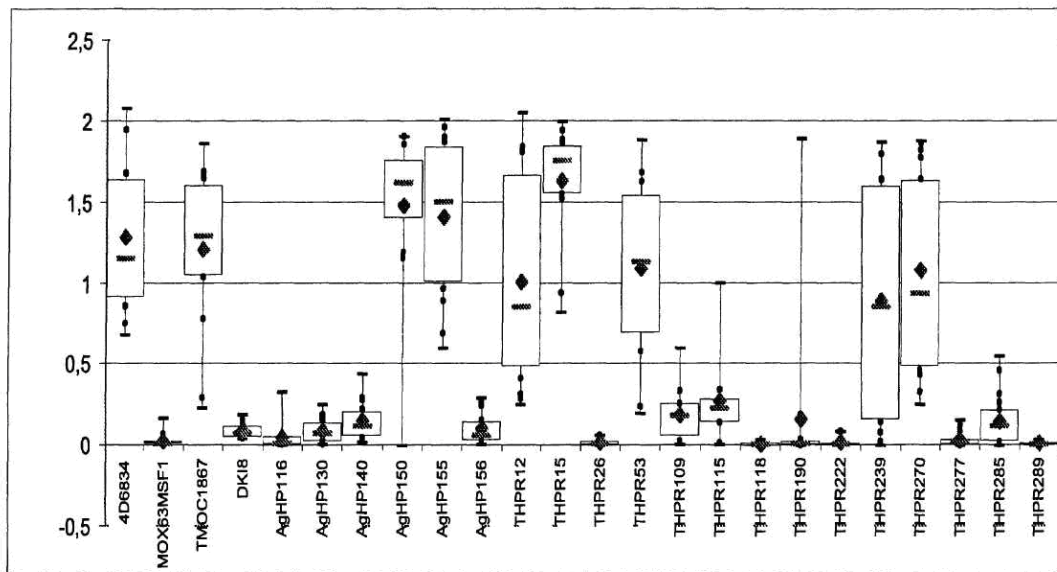
ATCGTGCTTGTGGTTAAAGTAGATTTATCTAATATTGTATTGTACATAGTTGCCGGTTGT 60  
 GTTGTGTGTCAGTATGTTGTACTCACCGTTTTTCAGCAACGATGTTAAAGCGTCCAGCTAT 120  
 GCGGGAGCAATTTTAAAGGGGAGCGGCTGTATCATGGCCGCGAATTCGTTTGCTCAATTT 180  
 GGGAGTTGCGATATTCCAAAGCATGTAGCCGAGTCCATCACTAAGGTTGCCACCAAAGAG 240  
 CACGATGTTGACATAATGGTAAAAAGGGGTGAAGTGACCGTTCGTGTTGTGACTCTCACC 300  
 GAAACTATTTTTATAATATTATCTAGATTGTTTGGTTTGGCGGTGTTTTTGTTCATGATA 360  
 TGTTTAATGTCTATAGTTTGGTTTGGTATCATAGACAA 399

(SEQ ID NO 10)

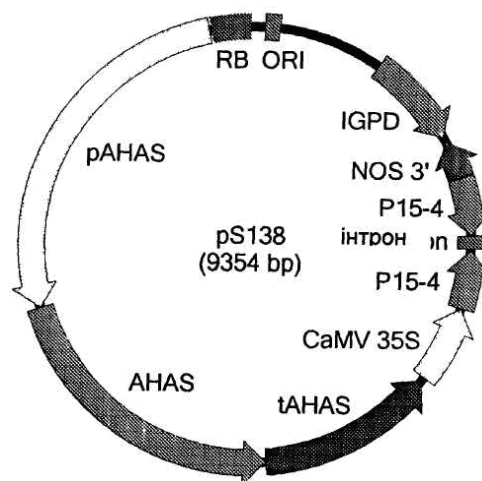
Фир.8



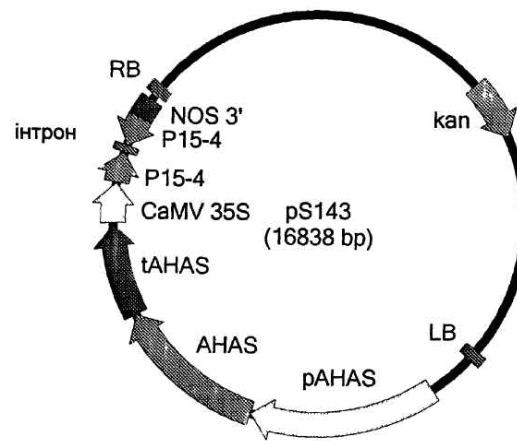
Фир.9



Φir.10



Φir.11



Φir.12

