



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **126564** (13) **C2**
(51) МПК
A01H 1/04 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2019 01152</p> <p>(22) Дата подання заявки: 26.06.2017</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 03.11.2022</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/360,585</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 11.07.2016</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.03.2019, Бюл.№ 6</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 02.11.2022, Бюл.№ 44</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2017/039249, 26.06.2017</p>	<p>(72) Винахідник(и): Юнг Марк Тімоті (US), Перуджині Леандро Даніель (US), Уолтерс Петра Дж. (US)</p> <p>(73) Володілець (володільці): ПІОНІР ХАЙ-БРЕД ІНТЕРНЕТНЛ, ІНК., 7100 N.W. 62nd Avenue, P.O. Box 1014, Johnston, IA 50131-1014, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Олішевич Людмила Анатоліївна, реєстр. №194</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2010223293 A1, 02.09.2010 DATABASE Geneseq. Zea mays SNP marker sequence, SEQ ID 19366, 14.10.2010, [online], Database accession no. AYN66696, retrieved from IBI, URL: EBI US 2009172845 A1, 02.07.2009 US 2004034888 A1, 19.02.2004 US 2014109257 A1, 17.04.2014 US 2016024519 A1, 28.01.2016 US 2015322536 A1, 12.11.2015 WO 2015095777 A1, 25.06.2015 Benson et al. Resistance to Gray Leaf Spot of Maize: Genetic Architecture and Mechanisms Elucidated through Nested Association Mapping and Near-Isogenic Line Analysis. PLoS Genetics, 12.03.2015, Vol. 11, No. 3, P. 1005045</p>
---	--

(54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА/АБО ВІДБОРУ РОСЛИНИ МАЇСУ, ЯКА ВИЯВЛЯЄ ПІДВИЩЕНУ СТІЙКІСТЬ ДО СІРОЇ ПЛЯМИСТОСТІ ЛИСТЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу ідентифікації та/або відбору рослини маїсу, яка виявляє підвищену стійкість до сірої плямистості листя, де вказаний спосіб включає виявлення в рослині маїсу алеля QTL та відбір вказаної рослини маїсу, яка має алель QTL. У способі застосовуються молекулярні генетичні маркери в межах ділянки QTL, розташованої на хромосомі 4, для ідентифікації та відбору рослин із підвищеною стійкістю до сірої плямистості листя.

UA 126564 C2

Галузь техніки, до якої належить даний винахід

Даний винахід стосується композицій і способів, застосованих для підвищення стійкості до сірої плямистості листя у рослин маїсу.

Перехресне посилання на споріднені заявки

5 Дана заявка є продовженням попередньої заявки на патент США № 62/360585, поданої 11 липня 2016 року, уміст якої включено в даний документ за допомогою посилання в усій своїй повноті.

Посилання на перелік послідовностей, наданий у вигляді текстового файлу за допомогою EFS-Web

10 Офіційна копія переліку послідовностей подана одночасно з описом за допомогою EFS-Web у вигляді текстового файлу відповідно до Американського стандартного коду обміну інформацією (ASCII), що має назву файлу, BB2457WOPCT_Sequencelisting_ST25.txt, дату створення 22 травня 2017 року і розмір 14,1 кбайт. Перелік послідовностей, поданий за допомогою EFS-Web, є частиною опису і таким чином включений у даний документ за
15 допомогою посилання в усій своїй повноті.

Передумови винаходу

Маїс є одним із найважливіших харчових джерел для людей і тварин. Багато стрес-факторів навколишнього середовища впливають на рослини маїсу, здійснюючи вплив на одержання й доступність маїсу. Наприклад, культури маїсу часто сильно уражені сірою плямистістю листя (GLS), спричиненою грибним патогеном *Cercospora zeae-maydis* або *Cercospora zeina* (що називаються в даному документі як *Cercospora* spp.).

20 GLS являє собою глобальну проблему, яка розповсюджена в Африці, Північній, Центральній і Південній Америці й Азії. *Cercospora* spp. зимує в залишках рослин на полях і для розповсюдження своїх спор і зараження маїсу потребує вологи зазвичай у вигляді сильного туману, роси або дощу. Зараження маїсу *Cercospora* spp. спричиняє збільшення виділення ресурсів рослини для захисту від ушкодженої тканини листя, що призводить до підвищення ризику виникнення кореневої і стеблової гнилі та до зниження виділення ресурсів на
25 наповнення зерна, що в кінцевому підсумку призводить до ще більших утрат врожаю. Зазвичай симптоми включають подовжені осередки ушкодження сірого кольору, ширина яких становить
30 приблизно 1-3 мм, а довжина від 5 до 70 мм, що виникають на матеріалі листя. Також було відзначено, що в разі випадків сильного зараження осередки ушкодження виникають на стеблах. Крім того, зараження *Cercospora* spp. знижує врожай зерна й якість силосу. GLS може призводити аж до 68 % утрати врожаю. Отже, ясна річ, важливе значення має зниження сприйнятливості маїсу до GLS.

35 Деякими загальнозживаними способами контролю GLS є фунгіциди, сівозміна, підготовка ґрунту і санітарна обробка полів. Деякі недоліки даних способів полягають у тому, що вони відносно дорогі, неефективні або шкідливі для навколишнього середовища. У той же час найбільш ефективним і найбільш переважним способом контролю GLS є розведення стійких гібридів.

40 Застосування відбору за фенотипом для інтрогресії ознаки стійкості до GLS зі стійкого сорту у сприйнятливий сорт може бути тривалим і трудомістким. GLS чутлива до умов навколишнього середовища й потребує високої вологості та підвищеної зволоженості листя. Ця чутливість ускладнює достовірний відбір на стійкість до GLS щороку виключно на основі фенотипу (Lehmensiek et al, Theor. Appl. Genet. 103:797-803 (2001)). Спеціалізовані ділянки для
45 проведення скринінгу щодо захворювань можуть бути дорогими в експлуатації, і рослини повинні бути вирощені до зрілості, щоб класифікувати рівень стійкості

Відбір із застосуванням молекулярних маркерів, асоційованих зі стійкістю до GLS, має перевагу, яка дозволяє проводити щонайменше певний відбір виключно на основі набору генів потомків. Таким чином, стійкість до GLS можна вимірювати в життєвому циклі рослини дуже
50 рано, навіть на стадії насінини. Підвищена швидкість відбору, якої можна досягти завдяки застосуванню молекулярних маркерів, асоційованих з ознакою стійкості до GLS, означає, що селекція рослин на стійкість до GLS може відбуватися з більшою швидкістю і що комерційно прийнятні рослини, стійкі до GLS, можна розробити швидше.

55 Існує потреба в комерційно прийнятних гібридних та інбредних лініях, що виявляють відносно високий рівень стійкості до GLS, асоційованої з *Cercospora zeina*.

Таким чином, становлять інтерес способи ідентифікації рослин маїсу зі стійкістю до GLS, за допомогою яких можна подолати або щонайменше звести до мінімуму вищевказані недоліки. Також становлять інтерес молекулярні генетичні маркери для скринінгу рослин маїсу, які виявляють рівні стійкості до GLS, що варіюють.

60 Короткий опис винаходу

У даному документі представлено композиції та способи ідентифікації й/або відбору (тобто одержання) рослин маїсу, які характеризуються підвищеною стійкістю до сірої плямистості листя.

В одному варіанті здійснення в даному документі представлено спосіб ідентифікації та/або відбору рослини маїсу з підвищеною стійкістю до сірої плямистості листя, причому спосіб передбачає стадії: (а) проведення скринінгу популяції за допомогою маркера, розташованого на хромосомі 4 у межах інтервалу, що містить і фланкований PHM6764-7 і PHM289-1, для визначення того, чи містять одна або декілька рослин маїсу з популяції алель QTL, асоційований із підвищеною стійкістю до сірої плямистості листя, де алель QTL містить "C" у PHM1963-15 і одне або декілька з наступного: "T" у PHM521-8; "G" у PHM12024-9; "T" у PHM199-23; "T" у PHMGLS_01; "C" у PHMGLS_07; "G" у PHMGLS_14; "C" у PHMGLS_19; "C" у PHMGLS_21; "C" у PHMGLS_45; "A" у PHMC001YAR; "C" у PHM5013-12; "T" у PHM586-10; "A" у PHM15534-13; "G" у PHM18451-2 і "C" у PHM289-20; і (b) відбору з указаної популяції щонайменше однієї рослини маїсу, яка містить алель QTL. Маркер може розташовуватися на хромосомі 4 у межах інтервалу, що містить і фланкований PHM521-8 і PHM18451-2. Спосіб може додатково передбачати: (c) схрещування рослини маїсу із другою рослиною маїсу і (d) одержання рослини-потомка, яка має сприятливий алель QTL. Спосіб може включати проведення відбору рослини маїсу з програми селекції, якщо алель QTL виявлено, або проведення негативного відбору рослини маїсу, якщо алель QTL не виявлено. В одному аспекті алель QTL, асоційований із підвищеною стійкістю до сірої плямистості листя, містить: "T" у PHM521-8; "G" у PHM12024-9; "T" у PHM199-23; "T" у PHMGLS_01; "C" у PHMGLS_07; "G" у PHMGLS_14; "C" у PHMGLS_19; "C" у PHMGLS_21; "C" у PHMGLS_45; "A" у PHMC001YAR; "C" у PHM5013-12; "T" у PHM586-10; "C" у PHM1963-15; "A" у PHM15534-13; "G" у PHM18451-2 і "C" у PHM289-20.

В іншому варіанті здійснення в даному документі представлено спосіб ідентифікації та/або відбору рослини маїсу, яка виявляє підвищену стійкість до сірої плямистості листя. Спосіб передбачає стадії (а) виявлення в рослині маїсу алеля маркерного локусу, де вказаний маркерний локус розташований на хромосомі 4 у межах хромосомного інтервалу, що містить і фланкований PHM6764-7 і PHM289-1, і при цьому вказаний алель асоційований із гаплотипом, що містить: "T" у PHM521-8; "G" у PHM12024-9; "T" у PHM199-23; "T" у PHMGLS_01; "C" у PHMGLS_07; "G" у PHMGLS_14; "C" у PHMGLS_19; "C" у PHMGLS_21; "C" у PHMGLS_45; "A" у PHMC001YAR; "C" у PHM5013-12; "T" у PHM586-10; "C" у PHM1963-15; "A" у PHM15534-13; "G" у PHM18451-2 і "C" у PHM289-20; і (b) відбору рослини маїсу, яка має алель маркерного локусу, асоційований із гаплотипом, що містить: "T" у PHM521-8; "G" у PHM12024-9; "T" у PHM199-23; "T" у PHMGLS_01; "C" у PHMGLS_07; "G" у PHMGLS_14; "C" у PHMGLS_19; "C" у PHMGLS_21; "C" у PHMGLS_45; "A" у PHMC001YAR; "C" у PHM5013-12; "T" у PHM586-10; "C" у PHM1963-15; "A" у PHM15534-13; "G" у PHM18451-2 і "C" у PHM289-20. Положення маркерного локусу на хромосомі 4 можна додатково уточнити щодо хромосомного інтервалу, який містить і фланкований PHM521-8 і PHM18451-2. Спосіб може додатково передбачати: (c) схрещування рослини маїсу з другою рослиною маїсу і (d) одержання рослини-потомка, яка має алель, асоційований із гаплотипом, що містить: "T" у PHM521-8; "G" у PHM12024-9; "T" у PHM199-23; "T" у PHMGLS_01; "C" у PHMGLS_07; "G" у PHMGLS_14; "C" у PHMGLS_19; "C" у PHMGLS_21; "C" у PHMGLS_45; "A" у PHMC001YAR; "C" у PHM5013-12; "T" у PHM586-10; "C" у PHM1963-15; "A" у PHM15534-13; "G" у PHM18451-2 і "C" у PHM289-20.

В іншому варіанті здійснення в даному документі представлено спосіб ідентифікації та/або відбору рослини маїсу, яка виявляє підвищену стійкість до сірої плямистості листя. Спосіб передбачає стадії (а) виявлення в рослині маїсу алеля QTL, що містить "C" у PHM1963-15 і одне або декілька з наступного: "T" у PHM521-8; "G" у PHM12024-9; "T" у PHM199-23; "T" у PHMGLS_01; "C" у PHMGLS_07; "G" у PHMGLS_14; "C" у PHMGLS_19; "C" у PHMGLS_21; "C" у PHMGLS_45; "A" у PHMC001YAR; "C" у PHM5013-12; "T" у PHM586-10; "A" у PHM15534-13; "G" у PHM18451-2 і "C" у PHM289-20; де вказаний алель QTL розташований на хромосомі 4 в інтервалі, що є заданим і включає PHM6764-7 і PHM289-1; і (b) відбору рослини маїсу, яка має алель QTL. Алель QTL може бути розташований на хромосомі 4 в інтервалі, що є заданим і включає PHM521-8 і PHM18451-2. Спосіб може додатково передбачати: (c) схрещування рослини маїсу з другою рослиною маїсу і (d) одержання рослини-потомка, яка має алель QTL. Алель QTL може додатково містити "T" у PHM521-8; "G" у PHM12024-9; "T" у PHM199-23; "T" у PHMGLS_01; "C" у PHMGLS_07; "G" у PHMGLS_14; "C" у PHMGLS_19; "C" у PHMGLS_21; "C" у PHMGLS_45; "A" у PHMC001YAR; "C" у PHM5013-12; "T" у PHM586-10; "C" у PHM1963-15; "A" у PHM15534-13; "G" у PHM18451-2 і "C" у PHM289-20.

В іншому варіанті здійснення в даному документі представлено спосіб ідентифікації та/або відбору рослини маїсу, яка виявляє підвищену стійкість до сірої плямистості листя. Спосіб передбачає стадії (а) виявлення в рослині маїсу "Т" у PHM521-8; "G" у PHM12024-9; "Т" у PHM199-23; "Т" у PHMGLS_01; "C" у PHMGLS_07; "G" у PHMGLS_14; "C" у PHMGLS_19; "C" у PHMGLS_21; "C" у PHMGLS_45; "A" у PHMC001YAR; "C" у PHM5013-12; "Т" у PHM586-10; "C" у PHM1963-15; "A" у PHM15534-13; "G" у PHM18451-2 і "C" у PHM289-20 і (b) відбору рослини маїсу, яка має "Т" у PHM521-8; "G" у PHM12024-9; "Т" у PHM199-23; "Т" у PHMGLS_01; "C" у PHMGLS_07; "G" у PHMGLS_14; "C" у PHMGLS_19; "C" у PHMGLS_21; "C" у PHMGLS_45; "A" у PHMC001YAR; "C" у PHM5013-12; "Т" у PHM586-10; "C" у PHM1963-15; "A" у PHM15534-13; "G" у PHM18451-2 і "C" у PHM289-20, де вказана рослина маїсу характеризується підвищеною стійкістю до сірої плямистості листя. Спосіб може додатково передбачати: (c) схрещування рослини маїсу з другою рослиною маїсу і (d) одержання рослини-потомка, яка має "Т" у PHM521-8; "G" у PHM12024-9; "Т" у PHM199-23; "Т" у PHMGLS_01; "C" у PHMGLS_07; "G" у PHMGLS_14; "C" у PHMGLS_19; "C" у PHMGLS_21; "C" у PHMGLS_45; "A" у PHMC001YAR; "C" у PHM5013-12; "Т" у PHM586-10; "C" у PHM1963-15; "A" у PHM15534-13; "G" у PHM18451-2 і "C" у PHM289-20.

Також представлено рослини, ідентифіковані та/або відібрані із застосуванням способів, описаних у даному документі.

Короткий опис переліку послідовностей

Даний винахід можна більш повно зрозуміти з наступного докладного опису й переліку послідовностей, який становить частину даної заявки.

Описи послідовностей і перелік послідовностей, включені в даний документ у вигляді додатку, відповідають правилам, що регулюють розкриття нуклеотидних і/або амінокислотних послідовностей у патентних заявках, як викладено в § 1.821 1.825 розділу 37 C.F.R. У переліку послідовностей передбачено однобуквений код для позначень нуклеотидних послідовностей і трибуквенні коди для амінокислот, як визначено відповідно до стандартів IUPAC-IUBMB, описаних у Nucleic Acids Res. 13:3021-3030 (1985) і в Biochemical J. 219 (2):345-373 (1984), які включено в даний документ за допомогою посилання. Символи й формат, застосовувані для цих нуклеотидних і амінокислотних послідовностей, відповідають правилам, викладеним у §1.822 розділу 37 C.F.R.

SEQ ID NO: 1 являє собою еталонну послідовність для маркера PHM6764-7.
 SEQ ID NO: 2 являє собою еталонну послідовність для маркера PHM16360-9.
 SEQ ID NO: 3 являє собою еталонну послідовність для маркера PHM521-8.
 SEQ ID NO: 4 являє собою еталонну послідовність для маркера PHM586-10.
 SEQ ID NO: 5 являє собою еталонну послідовність для маркера PHM289-20.
 SEQ ID NO: 6 являє собою еталонну послідовність для маркера PHM 12024-9.
 SEQ ID NO: 7 являє собою еталонну послідовність для маркера PHM 199-23.
 SEQ ID NO: 8 являє собою еталонну послідовність для маркера PHM1963-15.
 SEQ ID NO: 9 являє собою еталонну послідовність для маркера PHM18451-2.
 SEQ ID NO: 10 являє собою еталонну послідовність для маркера PZE-104068674.
 SEQ ID NO: 11 являє собою еталонну послідовність для маркера SYN25809.
 SEQ ID NO: 12 являє собою еталонну послідовність для маркера PZE-104069351.
 SEQ ID NO: 13 являє собою еталонну послідовність для маркера PZE-104069548.
 SEQ ID NO: 14 являє собою еталонну послідовність для маркера PZE-104069570.
 SEQ ID NO: 15 являє собою еталонну послідовність для маркера PZE-104069652.
 SEQ ID NO: 16 являє собою еталонну послідовність для маркера SYN21168.
 SEQ ID NO: 17 являє собою еталонну послідовність для маркера SYN4720.
 SEQ ID NO: 18 являє собою еталонну послідовність для маркера SYN4714.
 SEQ ID NO: 19 являє собою еталонну послідовність для маркера PZE-104070450.
 SEQ ID NO: 20 являє собою еталонну послідовність для маркера PHMGLS_01.
 SEQ ID NO: 21 являє собою еталонну послідовність для маркера PHMGLS_07.
 SEQ ID NO: 22 являє собою еталонну послідовність для маркера PHMGLS_14.
 SEQ ID NO: 23 являє собою еталонну послідовність для маркера PHMGLS_19.
 SEQ ID NO: 24 являє собою еталонну послідовність для маркера PHMGLS_21.
 SEQ ID NO: 25 являє собою еталонну послідовність для маркера PHMGLS_45.
 SEQ ID NO: 26 являє собою еталонну послідовність для маркера PHMC001YAR.
 SEQ ID NO: 27 являє собою еталонну послідовність для маркера PHM5013-12.
 SEQ ID NO: 28 являє собою еталонну послідовність для маркера PHM15534-13.

Докладний опис винаходу

У даному документі представлені маркерні локуси маїсу, які демонструють статистично значущу косяgregation з ознакою стійкості до сірої плямистості листя. Виявлення цих локусів або додаткових зчеплених локусів можна застосовувати під час відбору за допомогою маркерів у рамках програми селекції маїсу для одержання рослин маїсу, які характеризуються стійкістю до

5

сірої плямистості листя. Наступні визначення представлено для сприяння розумінню даного винаходу.

Слід розуміти, що даний винахід не обмежується конкретними варіантами здійснення, які звичайно можна змінювати. Також слід розуміти, що термінологія, яка застосовується в даному документі, призначена лише для опису конкретних варіантів здійснення й не передбачається як обмежувальна. Використовувані в даному описі та в доданій формулі винаходу терміни в однині та форми однини, наприклад, включають об'єкти в множині, якщо тільки значення явно не передбачає інше. Таким чином, наприклад, посилання на "рослину", "певну рослину" або "деяку рослину" також включає декілька рослин; також у залежності від контексту застосування терміну "рослина" може також включати генетично подібних або ідентичних потомків такої рослини; застосування терміну "нуклеїнова кислота" необов'язково на практиці включає багато копій такої молекули нуклеїнової кислоти; аналогічним чином термін "зонд" необов'язково (і, як правило) охоплює багато подібних або ідентичних молекул зондів.

10

15

Якщо не зазначено інше, нуклеїнові кислоти записані зліва направо в орієнтації від 5'- до 3'- кінця. Числові діапазони, перелічені в описі, охоплюють числа, що задають діапазон і включають кожне ціле число або будь-яке дробове число в межах заданого діапазону. Якщо не зазначено інше, усі технічні й наукові терміни, що застосовуються в даному документі, мають таке саме значення, яке звичайно зрозуміло фахівцю в галузі техніки, до якої належить даний винахід. Хоча під час тестуванні об'єкта, який згадується в даному винаході, можна застосовувати будь-які способи й матеріали, подібні або еквівалентні описаним у даному документі, переважні матеріали та способи описані в даному документі. При описі й заявлянні об'єкта даного винаходу буде застосовуватися нижченаведена термінологія відповідно до викладених нижче визначень.

20

25

Термін "алель" стосується однієї з двох або більше різних нуклеотидних послідовностей, які розташовані в певному локусі.

30

"Частота алеля" стосується частоти (частки або відсоткової частки), за якої алель наявний у локусі в межах особини, у межах лінії або в межах популяції ліній. Наприклад, у випадку алеля "A" диплоїдні особини з генотипом "AA", "Aa" або "aa" характеризуються значеннями частоти алеля, що становлять 1,0, 0,5 або 0,0 відповідно. Частоту алеля в межах лінії можна оцінювати шляхом усереднення значень частоти алеля у вибірці особин із цієї лінії. Аналогічним чином частоту алеля в межах популяції з ліній можна розраховувати шляхом усереднення значень частоти алеля в лініях, які складають цю популяцію. У випадку популяції з обмеженою кількістю особин або ліній частоту алеля можна виражати як число особин або ліній (або будь-який іншої вказаної групи), які містять даний алель.

35

"Амплікони" являє собою ампліфіковану нуклеїнову кислоту, наприклад, нуклеїнову кислоту, отриману шляхом ампліфікації матричної нуклеїнової кислоти за допомогою будь-якого доступного способу ампліфікації (наприклад, PCR, LCR, транскрипції тощо).

40

Термін "здійснення ампліфікації" у контексті ампліфікації нуклеїнової кислоти являє собою будь-який процес, за допомогою якого одержують додаткові копії вибраної нуклеїнової кислоти (або її транскрибованої форми). Типові способи ампліфікації включають способи реплікації на основі різних полімераз, зокрема полімеразну ланцюгову реакцію (PCR), лігаза-опосередковані способи, такі як лігазна ланцюгова реакція (LCR), і способи ампліфікації на основі РНК-полімерази (наприклад, за допомогою транскрипції).

45

Термін "складання" застосовується щодо ВАС та їх здатностей до об'єднання з утворенням безперервних відрізків ДНК. ВАС "складається" у контиг на підставі вирівнювання послідовності, якщо ВАС секвенують, або шляхом вирівнювання фінгерпринту даної ВАС із фінгерпринтами інших ВАС. Загальнодоступні складання можна знайти із використанням Maize Genome Browser, який наявний у відкритому доступі в мережі Інтернет.

50

Алель є "асоційованим з" ознакою, якщо він є частиною послідовності ДНК або алеля, які впливають на експресію ознаки, або зчеплений з ними. Наявність алеля є показником того, як ознака буде експресуватися.

55

"ВАС", або штучна бактеріальна хромосома, являє собою вектор клонування, одержаний із природного F-фактора *Escherichia coli*, який власне є елементом ДНК, що може існувати у вигляді кільцевої плазмиди або може бути інтегрований у бактеріальну хромосому. ВАС допускають можливість уведення великих вставок із послідовності ДНК. У випадку маїсу цілий ряд ВАС, кожна з яких містить велику вставку геномної ДНК маїсу з інбредної лінії маїсу B73,

60

був складений у контиги (безперервні генетичні фрагменти, що перекриваються, або "безперервна ДНК"), і це складання наявне у відкритому доступі в мережі Інтернет.

Фінгерпринт ВАС являє собою засіб аналізу подібності між декількома зразками ДНК, виходячи з наявності або відсутності специфічних сайтів рестрикції (сайти рестрикції являють собою нуклеотидні послідовності, що розпізнаються ферментами, які розрізують або "здійснюють рестрикцію" ДНК). Зразки двох або більше ВАС розщеплюють за допомогою одного набору рестриктаз і порівнюють розміри утворених фрагментів із застосуванням зазвичай розділення на гелі.

"Зворотне схрещування" стосується способу, під час якого гібридних потомків багаторазово схрещують з однією з батьківських форм. У схемі зворотного схрещування "донорна" батьківська форма стосується батьківської рослини з необхідними геном/генами, локусом/локусами або специфічним фенотипом, які мають бути інтрогресованими. "Реципієнтна" батьківська форма (використовується один або декілька раз) або "рекурентна" батьківська форма (використовується два або більше раз) стосується батьківської рослини, в яку інтрогресують ген або локус. Наприклад, див. Ragot, M. et al. (1995) Marker-assisted backcrossing: a practical example, in *Techniques et Utilisations des Marqueurs Moleculaires Les Colloques*, Vol. 72, pp. 45-56, і Openshaw et al., (1994) Marker-assisted Selection in Backer oss Breeding, *Analysis of Molecular Marker Data*, pp. 41-43. Первинне схрещування призводить до виникнення покоління F₁; у такому разі термін "BC₁" стосується другого застосування рекурентної батьківської форми, "BC₂" стосується третього застосування рекурентної батьківської форми тощо.

"Сантиморганида" ("сМ") являє собою одиницю вимірювання частоти рекомбінації. Одна сМ дорівнює 1 % вірогідності того, що маркер в одному генетичному локусі буде відокремлений від маркера в другому локусі внаслідок кросинговера в одному поколінні.

Використовуваний у даному документі термін "хромосомний інтервал" означає безперервну лінійну ділянку геномної ДНК, яка розташована in planta на одній хромосомі. Генетичні елементи або гени, розташовані в одному хромосомному інтервалі, є фізично зчепленими. Розмір хромосомного інтервалу особливо ніяк не обмежений. У деяких аспектах генетичні елементи, розташовані в межах одного хромосомного інтервалу, є генетично зчепленими, як правило, із відстанню генетичної рекомбінації, наприклад, меншою від або що дорівнює 20 сМ або, як альтернатива, меншою від або що дорівнює 10 сМ. Тобто два генетичні елементи в межах одного хромосомного інтервалу зазнають рекомбінації з частотою меншою від або що дорівнює 20 % або 10 %.

"Хромосома" являє собою окрему одиницю спіральної ДНК, яка містить багато генів, які виконують свою функцію й переміщуються як єдине ціле під час поділу клітини й, отже, можна сказати - є зчепленими. Її також можна назвати "групою зчеплення".

У випадку даної заявки фраза "близькозчеплені" означає, що рекомбінація між двома зчепленими локусами відбувається з частотою, що дорівнює або менша від приблизно 10 % (тобто вони розділені на генетичній карті не більше ніж 10 сМ). Інакше кажучи, близькозчеплені локуси косегрегують у щонайменше 90 % випадків. Маркерні локуси особливо застосовні щодо об'єкта даного винаходу, коли вони демонструють значну ймовірність косегрегації (зчеплення) із необхідною ознакою (наприклад, стійкістю до сірої плямистості листя). Близькозчеплені локуси, такі як маркерний локус і другий локус, можуть виявляти частоту міжлокусної рекомбінації, що становить 10 % або менше, переважно приблизно 9 % або менше, ще більш переважно приблизно 8 % або менше, навіть більш переважно приблизно 7 % або менше, ще більш переважно приблизно 6 % або менше, навіть більш переважно приблизно 5 % або менше, ще більш переважно приблизно 4 % або менше, навіть більш переважно приблизно 3 % або менше і ще більш переважно приблизно 2 % або менше. В особливо переважних варіантах здійснення відповідні локуси виявляють частоту рекомбінації, що становить приблизно 1 % або менше, наприклад, приблизно 0,75 % або менше, більш переважно приблизно 0,5 % або менше або навіть більш переважно приблизно 0,25 % або менше. Стосовно двох локусів, які локалізовані на одній і тій самій хромосомі і на такій відстані, що рекомбінація між двома цими локусами відбувається з частотою, що становить менше від 10 % (наприклад, приблизно 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,75 %, 0,5 %, 0,25 % або менше), також говорять, що вони "розташовані близько" один до одного. У деяких випадках два різні маркери можуть характеризуватися однаковими координатами на генетичній карті. У цьому разі два маркери розташовані настільки близько один до одного, що рекомбінація відбувається між ними з настільки низькою частотою, яку неможливо виявити.

Вираз "комплементарна послідовність" стосується нуклеотидної послідовності, яка комплементарна вказаній нуклеотидній послідовності, тобто послідовності відповідають одна одній згідно з правилами спарювання основ Уотсона-Кріка.

5 Термін "безперервна ДНК" стосується відрізка геномної ДНК, який не переривається, представленого одиницями, що частково перекриваються, або контигами.

У випадку посилання на взаємозв'язок між двома генетичними елементами, такими як генетичний елемент, що робить внесок у стійкість до сірої плямистості листя, і близький маркер, зчеплення у фазі "притягання" означає стан, за якого "сприятливий" алель у локусі стійкості до сірої плямистості листя фізично асоційований на одній і тій самій нитці хромосоми із "сприятливим" алелем відповідного зчепленого маркерного локусу. У фазі "притягання" обидва сприятливих алелі спільно успадковуються потомками, які успадковують таку хромосомну нитку.

10 Термін "схрещений" або "схрещування" стосується статевого схрещування і включає злиття двох гаплоїдних гамет шляхом запилення з одержанням диплоїдних потомків (наприклад, клітин, насіння або рослин). Термін охоплює як запилення однієї рослини іншою, так і самозапилення (або самозапилення, наприклад, якщо пилок і насінневий зачаток походять із тієї ж рослини).

Рослина, що називається в даному документі "диплоїдною", має два набори (геноми) хромосом.

20 Рослину, що називається в даному документі "подвоєним гаплоїдом", одержують шляхом подвоєння гаплоїдного набору хромосом (тобто половини нормальної кількості хромосом). Рослина-подвоєний гаплоїд має два ідентичні набори хромосом, і всі локуси вважаються гомозиготними.

"Елітна лінія" являє собою будь-яку лінію, яка була одержана на основі селекції й відбору за найкращим агрономічним показником.

25 "Екзотична лінія маїсу" або "екзотична зародкова плазма маїсу" являє собою лінію, одержану від рослини маїсу, яка не належить до доступної елітної лінії або лінії зародкової плазми маїсу. У контексті схрещування двох рослин або ліній зародкової плазми маїсу екзотична зародкова плазма не є близькоспорідненою за походженням з елітною зародковою плазмою, з якою її схрещують. Найчастіше екзотична зародкова плазма не походить від жодної відомої елітної лінії маїсу, а навпаки, вибрана для введення нових генетичних елементів (як правило, нових алелей) у програму селекції.

30 "Сприятливий алель" являє собою алель у конкретному локусі (маркер, QTL тощо), який забезпечує або робить внесок у необхідний для агрономії фенотип, наприклад, стійкість до сірої плямистості листя, і який забезпечує можливість ідентифікації рослин із необхідним для агрономії фенотипом. Сприятливий алель маркера являє собою маркерний алель, який сегрегує зі сприятливим фенотипом.

Мається на увазі, що "фрагмент" означає частину нуклеотидної послідовності. Фрагменти можна застосовувати як гібридизаційні зонди або праймери для PCR у разі застосування способів, розкритих у даному документі.

40 "Генетична карта", що являє собою опис взаємозв'язків генетичного зчеплення локусів на одній або декількох хромосомах (або групах зчеплення) у вказаного виду, зазвичай представлена у вигляді діаграми або таблиці. У випадку кожної генетичної карти відстані між локусами вимірюються відповідно до того, наскільки часто їх алелі з'являються разом у популяції (відповідно до їхніх частот рекомбінації). Алелі можна виявляти із застосуванням ДНК- або білкових маркерів або спостережуваних фенотипів. Генетична карта є відображенням результату картування популяції, типів застосовуваних маркерів і потенціалу поліморфізму кожного маркера в різних популяціях. Генетичні відстані між локусами на різних генетичних картах можуть відрізнятися. Однак інформацію на різних картах можна привести у відповідність із застосуванням спільних маркерів. Фахівець у даній галузі може використовувати розташування спільних маркерів для ідентифікації розташування маркерів та інших локусів, що становлять інтерес, на кожній окремій генетичній карті. Порядок розташування локусів на різних картах не повинен змінюватися, хоча часто трапляються невеликі зміни в порядку розташування маркерів, зумовлені, наприклад, маркерами, які виявляють альтернативні дуплікатні локуси в різних популяціях, відмінностями у статистичних підходах, застосовуваних для визначення порядку розташування маркерів, новою мутацією або помилкою під час лабораторних досліджень.

55 "Місцерозташування на генетичній карті" являє собою місцерозташування на генетичній карті щодо оточувальних генетичних маркерів у тій же групі зчеплення, в якій указаний маркер можна виявити в межах вказаного виду.

"Генетичне картування" являє собою спосіб визначення взаємозв'язків зчеплення локусів за рахунок застосування генетичних маркерів, популяцій, що сегрегують за маркерами, і стандартних генетичних принципів частоти рекомбінації.

5 "Генетичні маркери" являють собою нуклеїнові кислоти, які є поліморфними в популяції, і водночас їх алелі можна виявляти й розпізнавати за допомогою одного або декількох аналітичних способів, наприклад, аналізів RFLP, AFLP, ізоферментного, SNP, SSR тощо. Цей термін також стосується послідовностей нуклеїнової кислоти, комплементарних геномним послідовностям, таким як нуклеїнові кислоти, що застосовують як зонди. Маркери, що відповідають генетичним поліморфізмам серед представників популяції, можна виявляти за допомогою способів, загальноприйнятих у цій галузі. Вони включають, наприклад, способи специфічної щодо послідовності ампліфікації на основі PCR, виявлення поліморфізмів довжин рестрикційних фрагментів (RFLP), виявлення ізоферментних маркерів, виявлення полінуклеотидних поліморфізмів за допомогою алель-специфічної гібридизації (ASH), виявлення ампліфікованих варіабельних послідовностей геному рослини, виявлення самопідтримувальної реплікації послідовностей, виявлення простих повторів послідовності (SSR), виявлення одонуклеотидних поліморфізмів (SNP) або виявлення поліморфізмів довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP). Також відомі загальноприйняті способи виявлення міток експресованих послідовностей (EST) і маркерів SSR, одержаних із послідовностей EST, і довільно ампліфікованих поліморфних ДНК (RAPD).

20 "Частота генетичної рекомбінації" являє собою частоту явища кросинговера (рекомбінації) між двома генетичними локусами. Частоту рекомбінації можна визначати за наступною сегрегацією маркерів та/або ознак після мейозу.

"Геном" стосується загальної ДНК або повного набору генів, які несе хромосома або хромосомний набір.

25 Термін "генотип" являє собою генетичний склад особини (або групи особин) за одним або декількома генетичними локусам. Генотип визначає алель(алелі) одного або декількох відомих локусів, які особина успадкувала від своїх батьківських форм. Термін "генотип" можна застосовувати для позначення генетичної будови особини за окремим локусом, за декількома локусами, або в ширшому сенсі термін "генотип" можна застосовувати для позначення генетичного складу особини щодо всіх генів у її геномі.

30 "Зародкова плазма" стосується генетичного матеріалу особини (наприклад, рослини), групи особин (наприклад, лінії, сорту або родини рослин) або клону, одержаного з лінії, сорту, виду або культури, або в ширшому сенсі всіх особин у межах виду або декількох видів (наприклад, колекція зародкової плазми маїсу або колекція зародкової плазми Анд), або одержаного з них. Зародкова плазма може бути частиною організму або клітини, або може бути виділена з організму або клітини. Загалом зародкова плазма передбачає генетичний матеріал зі специфічним молекулярним складом, який забезпечує фізичну основу для деяких або всіх спадкових властивостей організму або клітинної культури. Використовувана в даному документі зародкова плазма включає клітини, насіння або тканини, з яких можна виростити нові рослини, або частини рослин, такі як листя, стебла, пилки або клітини, які можна культивувати з одержанням цілої рослини.

Рослина, що називається в даному документі "гаплоїдною", має один набір (геном) хромосом.

45 "Гаплотип" являє собою генотип особини за декількома генетичними локусами, тобто комбінацію алелей. Зазвичай генетичні локуси, описувані гаплотипом, є фізично й генетично зчепленими, тобто розташовані в одному й тому ж хромосомному сегменті.

Термін "гетерогенність" застосовують для позначення того, що особини в межах групи відрізняються генотипом за одним або декількома специфічними локусами.

50 Гетерозисну відповідь матеріалу або "гетерозис" можна визначити за показником, який перевищує середні показники батьківських форм (або батьківської форми з високим показником) у разі схрещування з іншими несхожими або неспорідненими групами.

60 "Гетерозисна група" передбачає набір генотипів, які показують відповідні результати в разі схрещування з генотипами з іншої гетерозисної групи (Hallauer et al. (1998) Corn breeding, p. 463-564. In G. F. Sprague і J. W. Dudley (ed.) Corn і corn improvement). Інбредні лінії відносять до певних гетерозисних груп і додатково підрозділяють на родини в межах гетерозисної групи на підставі декількох критеріїв, таких як родовід, асоціації на основі молекулярних маркерів і показники в гібридних комбінаціях (Smith et al. (1990) Theor. Appl. Gen. 80:833-840). Дві найбільш широко використовувані гетерозисні групи в Сполучених Штатах називаються "Iowa Stiff Stalk Synthetic" (також називана в даному документі як "Stiff Stalk") і "Lancaster" або "Lancaster Sure Crop" (іноді називана NSS або non-stiff Stalk).

Деякі гетерозисні групи мають ознаки, які необхідні жіночій батьківській формі, а інші мають ознаки для чоловічої батьківській формі. Наприклад, у випадку маїсу, врожайність загальнодоступних інбредів, виділених із популяції, названої BSSS (популяція Iowa Stiff Stalk Synthetic), призвела до того, що ці інбреди та їхні похідні стали пулом жіночих особин у центральному кукурудзяному поясі. Інбреди BSSS були схрещені з іншими інbredами, наприклад, SD 105 і Maiz Amargo, і ця загальна група матеріалів стала відомою як Stiff Stalk Synthetics (SSS), незважаючи навіть на те, що не всі інбреди походять із вихідної популяції BSSS (Mikel і Dudley (2006) Crop Sci: 46:1193-1205). За загальним принципом усі інші інбреди, які добре поєднуються з інbredами SSS, віднесли до пулу чоловічих особин, який за відсутності кращої назви позначили як NSS, тобто Non-Stiff Stalk. Ця група включає декілька головних гетерозисних груп, таких як Lancaster Surecrop, Iodent і Learning Corn.

Особина є "гетерозиготною" у тому випадку, якщо в цьому локусі наявний більше за один тип алеля (наприклад, диплоїдна особина з однієї копією кожного з двох різних алелей).

Термін "гомогенність" означає, що представники групи мають однаковий генотип за одним або декількома специфічними локусами.

Особина є "гомозиготною" у тому випадку, якщо особина має тільки один тип алеля в цьому локусі (наприклад, диплоїдна особина має копію того ж алеля в локусі для кожної з двох гомологічних хромосом).

Термін "гібрид" стосується потомків, одержаних у разі схрещування щонайменше двох генетично різнорідних батьківських форм.

"Гібридизація" або "гібридизація нуклеїнової кислоти" стосується спарювання комплементарних ниток РНК і ДНК, а також спарювання комплементарних одинарних ниток ДНК.

Термін "гібридизується" означає утворення пар основ між комплементарними ділянками ниток нуклеїнової кислоти.

Термін "генетична карта IBM" може стосуватися будь-якої з наступних карт: IBM, IBM2, IBM2 neighbors, IBM2 FPC0507, IBM2 2004 neighbors, IBM2 2005 neighbors, IBM2 2005 neighbors frame, IBM2 2008 neighbors, IBM2 2008 neighbors frame або останньої версії на веб-сайті maizegdb. Генетичні карти IBM ґрунтуються на популяції В73 x Мо17, в якій потомків первинного схрещування піддавали випадковому схрещуванню протягом декількох поколінь перед конструюванням рекомбінантних інbredних ліній для картування. Новіші версії відображають додавання генетичних і ВАС-картованих локусів, а також поліпшену деталізацію карти, обумовлену включенням інформації, отриманої з інших генетичних карт або фізичних карт, уточнених даних або застосування нових алгоритмів.

Термін "інbredний" стосується лінії, яка була виведена для забезпечення генетичної однорідності.

Термін "вставка/делеція" стосується вставки або делеції, причому одна лінія може розглядатися як така, що має вставлений нуклеотид або ділянку ДНК порівняно з другою лінією, або друга лінія може розглядатися як така, що має видалений нуклеотид або ділянку ДНК порівняно з першою лінією.

Термін "інтрогресія" стосується передачі необхідного алеля генетичного локусу з одного генетичного фону в інший. Наприклад, інтрогресія необхідного алеля за вказаним локусом може передаватися щонайменше одному потомку шляхом статевого схрещування між двома батьківськими формами одного виду, якщо принаймі одна з батьківських форм має необхідний алель у своєму геномі. Як альтернатива, наприклад, передача алеля може відбуватися шляхом рекомбінації між двома донорними геномами, наприклад, у злитому протопласті, якщо принаймі один із донорних протопластів має необхідний алель у своєму геномі. Наприклад, необхідний алель можна виявляти за допомогою маркера, що асоційований із фенотипом, QTL, трансгеном тощо. У будь-якому разі можна проводити багаторазові зворотні схрещування потомства, яке містить необхідний алель, з лінією, що має необхідний генетичний фон, і проводити відбір щодо необхідного алеля, який призводить до того, що алель закріплюється у вибраному генетичному фоні.

Спосіб "інтрогресії" часто називають "здійсненням зворотного схрещування", якщо спосіб повторюють два або більше раз.

"Лінія" або "штам" являє собою групу особин від ідентичних батьківських форм, які зазвичай до певного ступеню є інbredними, і які зазвичай є гомозиготними й гомогенними за більшістю локусів (ізогенними або майже ізогенними). "Сублінія" стосується інbredної підмножини потомків, які є генетично відмінними від інших подібних інbredних підмножин, що походять від того ж предка.

Використовуваний у даному документі термін "зчеплення" застосовується для опису ступеня, з яким один маркерний локус асоційований з іншим маркерним локусом або будь-яким іншим локусом. Взаємозв'язок зчеплення між молекулярним маркером і локусом, що впливає на фенотип, наведено як "імовірність" або "скоригована ймовірність". Зчеплення можна виражати у вигляді необхідних межі або діапазону. Наприклад, у деяких варіантах здійснення будь-який маркер зчеплений (генетично й фізично) із будь-яким іншим маркером, якщо маркери розділені менше ніж 50, 40, 30, 25, 20 або 15 одиницями картування (або сМ) на карті одноразового мейозу (генетичній карті, що ґрунтується на популяції, яка пройшла один раунд мейозу, такий як, наприклад, F₂; при цьому карти IBM2 передбачають декілька мейозів). У деяких аспектах переважним є визначення обмежувального діапазону зчеплення, наприклад, від 10 до 20 сМ, від 10 до 30 сМ або від 10 до 40 сМ. Чим ближчою є відстань, на якій маркер зчеплений із другим локусом, тим кращим індикатором для другого локусу стає цей маркер. Таким чином, "близькозчеплені локуси", такі як маркерний локус і другий локус, виявляють частоту міжлокусної рекомбінації, що становить 10 % або менше, переважно приблизно 9 % або менше, ще більш переважно приблизно 8 % або менше, навіть більш переважно приблизно 7 % або менше, ще більш переважно приблизно 6 % або менше, навіть більш переважно приблизно 5 % або менше, ще більш переважно приблизно 4 % або менше, навіть більш переважно приблизно 3 % або менше і ще більш переважно приблизно 2 % або менше. В особливо переважних варіантах здійснення відповідні локуси виявляють частоту рекомбінації, що становить приблизно 1 % або менше, наприклад, приблизно 0,75 % або менше, більш переважно приблизно 0,5 % або менше або навіть більш переважно приблизно 0,25 % або менше. Стосовно двох локусів, які локалізовані на одній і тій самій хромосомі і на такій відстані, що рекомбінація між двома цими локусами відбувається з частотою, що становить менше від 10 % (наприклад, приблизно 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,75 %, 0,5 %, 0,25 % або менше), також говорять, що вони "розташовані близько" один до одного. Оскільки одна сМ являє собою відстань між двома маркерами, для яких показана частота рекомбінації 1 %, будь-який маркер є близькозчепленим (генетично й фізично) з будь-яким іншим маркером, що знаходиться у безпосередній близькості, наприклад, віддаленим на 10 сМ або менше. Два близькозчеплених маркера на одній і тій самій хромосомі можуть розташовуватися на відстані 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,75, 0,5 або 0,25 сМ або менше один від одного.

Термін "нерівноважне зчеплення" стосується не випадкової сегрегації генетичних локусів або ознак (або їх обох). У будь-якому разі нерівноважне зчеплення означає, що відповідні локуси розташовані в межах достатньої фізичної близькості вздовж довжини хромосоми, щоб вони сегрегували разом із частотою, вищою, ніж випадкова (тобто не випадково). Маркери, які демонструють нерівноважне зчеплення, вважаються зчепленими. Зчеплені локуси косягують у більше за 50 % випадків, наприклад, від приблизно 51 % до приблизно 100 % випадків. Інакше кажучи, два маркери, які косягують, характеризуються частотою рекомбінації, що становить менше від 50 % (і, за визначенням, розділені менше за 50 сМ на одній і тій самій групі зчеплення). Використовуване в даному документі зчеплення може відбуватися між двома маркерами або альтернативно між маркером і локусом, що впливає на фенотип. Маркерний локус може бути "асоційованим з" (зчепленим із) ознакою. Ступінь зчеплення маркерного локусу й локусу, що впливає на фенотипову ознаку, вимірюється, наприклад, як статистична ймовірність косягації цього молекулярного маркера з фенотипом (наприклад, статистичний F-критерій або LOD-показник).

Нерівноважне зчеплення найчастіше оцінюють із застосуванням критерію r^2 , який розраховують із застосуванням формули, описаної в Hill, W. G. і Robertson, A, Theor. Appl. Genet. 38:226-231(1968). Якщо $r^2=1$, то між двома маркерними локусами існує повне LD, тобто це означає, що маркери не зазнали роз'єднання за рахунок рекомбінації й характеризуються однаковою алельною частотою. Значення r^2 буде залежати від використовуваної популяції. Значення r^2 вищі за 1/3 вказують на досить сильне LD, що є застосовним для картування (Ardlie et al., Nature Reviews Genetics 3:299-309 (2002)). Отже, алелі перебувають у нерівноважному зчепленні тоді, коли значення r^2 між парою маркерних локусів більші за або дорівнюють 0,33, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, або 1,0.

Використовуваний у даному документі термін "рівноважне зчеплення" описує ситуацію, у разі якої два маркери сегрегують незалежно, тобто розподіляються серед потомків випадковим чином. Маркери, які демонструють рівноважне зчеплення, вважаються незчепленими (незалежно від того, чи розташовані вони на одній і тій самій хромосомі).

"Локус" являє собою положення на хромосомі, наприклад, де локалізовані нуклеотид, ген, послідовність або маркер.

"Значення логарифма шансів (LOD)" або "LOD-показник" (Risch, Science 255:803-804 (1992)) застосовують під час картування генетичного інтервалу для опису ступеня зчеплення між двома маркерними локусами. LOD-показник для двох маркерів, що становить три, вказує на те, що зчеплення в 1000 раз більш імовірно, ніж відсутність зчеплення, водночас LOD-показник, що становить два, вказує на те, що зчеплення в 100 раз більш імовірно, ніж відсутність зчеплення. Для виявлення зчеплення можна застосовувати LOD-показники більші або рівні двом. LOD-показники також можна застосовувати для демонстрації сили асоціації між маркерними локусами й кількісними ознаками у картуванні "локусів кількісних ознак". У такому випадку величина LOD-показника залежить від наближеності маркерного локусу до локусу, що впливає на кількісну ознаку, а також від величини ефекту кількісної ознаки.

"Маїс" означає рослину *Zea mays* L. ssp. *mays*, яка також відома як "кукурудза".

Термін "рослина маїсу" включає цілі рослини маїсу, клітини рослини маїсу, протопласт рослини маїсу, клітинну або тканинну культуру рослини маїсу, з якої можуть бути регенеровані рослини маїсу, калюси рослини маїсу, скупчення клітин рослини маїсу й клітини рослини маїсу, які є інтактними в рослинах маїсу або частинах рослин маїсу, таких як насіння маїсу, стрижні качанів маїсу, квітки маїсу, сім'ядолі маїсу, листя маїсу, стебла маїсу, бруньки маїсу, корені маїсу, кореневі кінчики маїсу тощо.

"Маркер" являє собою засіб для визначення розташування на генетичній або фізичній карті або зчеплення між маркерами або локусами ознак (локусів, що впливають на ознаки). Положення, яке виявляють за допомогою маркера, можна дізнатись шляхом виявлення поліморфних алелей та їх генетичного картування, або ж шляхом гібридизації, пошуку збігу послідовностей або ампліфікації послідовності, яку піддавали фізичному картуванню. Маркер може являти собою ДНК-маркер (за допомогою якого виявляють ДНК-поліморфізми), білок (за допомогою якого виявляють варіацію в кодованому поліпептиді) або фенотип, що успадковується за моногенною системою (такий як фенотип "waxy"). ДНК-маркер також можна розробити на основі геномної нуклеотидної послідовності або на основі експресованих нуклеотидних послідовностей (наприклад, сплайсованої РНК або кДНК). Залежно від технології ДНК-маркера, маркер буде складатися з комплементарних праймерів, що фланкують локус, і/або комплементарних зондів, які гібридизуються з поліморфними алелями в локусі. ДНК-маркер або генетичний маркер також можна використовувати для опису гена, послідовності ДНК або нуклеотиду в хромосомі як таких (а не компонентів, що використовуються для виявлення гена або послідовності ДНК), і це часто використовується тоді, коли ДНК-маркер пов'язаний із певною ознакою в генетиці людини (наприклад, маркер раку молочної залози). Терміном "маркерний локус" позначають локус (ген, послідовність або нуклеотид), який виявляють за допомогою маркера.

Маркери, за допомогою яких виявляють генетичні поліморфізми у представників популяції, є загальноприйнятими в цій галузі. Маркери можна визначити за типом поліморфізму, який вони дозволяють виявити, а також за технологією маркера, використаною для виявлення поліморфізму. Типи маркерів включають без обмеження, наприклад, виявлення поліморфізмів довжин рестрикційних фрагментів (RFLP), виявлення ізоферментних маркерів, випадково ампліфікованих поліморфних ДНК (RAPD), поліморфізми довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP), виявлення простих повторів послідовностей (SSR), виявлення ампліфікованих варіабельних послідовностей генома рослини, виявлення самопідтримувальної реплікації послідовностей або виявлення одонуклеотидних поліморфізмів (SNP). SNP можна виявляти, наприклад, за допомогою секвенування ДНК, способів специфічної щодо послідовності ампліфікації на основі PCR, виявлення поліонуклеотидних поліморфізмів за допомогою алель-специфічної гібридизації (ASH), динамічної алель-специфічної гібридизації (DASH), молекулярних маяків, гібридизації на мікрочіпах, олігонуклеотид-лігазних аналізів, флєп-ендонуклеаз, 5'-ендонуклеаз, подовження праймера, одноланцюгового конформаційного поліморфізму (SSCP) або гель-електрофорезу з температурним градієнтом (TGGE). Секвенування ДНК, таке як технологія піросеквенування, має перевагу в тому, що з його допомогою можна виявляти серії зчеплених алелей SNP, які складають гаплотип. Гаплотипи, здебільшого, більш інформативні (виявляють вищий рівень поліморфізму), ніж SNP.

"Маркерний алель", як альтернатива "алель маркерного локусу", може стосуватись однієї з декількох поліморфних нуклеотидних послідовностей, виявлених у маркерному локусі в популяції.

"Відбір за допомогою маркерів" (MAS) являє собою спосіб, в якому окремі рослини відбирають на основі маркерних генотипів.

"Негативний відбір за допомогою маркера" являє собою спосіб, в якому маркерні генотипи застосовують для ідентифікації рослин, які не будуть відібрані, що дозволяє виключити їх із програми селекції або розведення.

"Маркерний гаплотип" стосується комбінації алелей у маркерному локусі.

5 "Маркерний локус" являє собою специфічне місце розташування на хромосомі в геномі виду, в якого може бути виявлений специфічний маркер. Маркерний локус можна використовувати для відстеження наявності другого зчепленого локусу, наприклад, такого, який впливає на експресію фенотипової ознаки. Наприклад, маркерний локус можна застосовувати для відстеження сегрегації алелей у генетично або фізично зчепленому локусі.

10 "Маркерний зонд" являє собою послідовність або молекулу нуклеїнової кислоти, які можна застосовувати для ідентифікації наявності маркерного локусу, наприклад, зонд на основі нуклеїнової кислоти, який є комплементарним послідовності маркерного локусу, шляхом гібридизації нуклеїнових кислот. Маркерні зонди, що містять 30 або більше суміжних нуклеотидів маркерного локусу ("усієї або частини" послідовності маркерного локусу), можна використовувати для гібридизації нуклеїнових кислот. Як альтернатива, у деяких аспектах маркерний зонд стосується зонда будь-якого типу, здатного розпізнати (тобто визначити генотип) конкретний алель, який наявний у маркерному локусі.

Термін "молекулярний маркер" можна застосовувати для позначення генетичного маркера, який визначено вище, або кодованого ним продукту (наприклад, білка), що застосовують як орієнтир під час ідентифікації зчепленого локусу. Маркер також може бути одержаний із геномних нуклеотидних послідовностей, або з експресованих нуклеотидних послідовностей (наприклад, із сплайсованої РНК, κДНК тощо), або з кодованого поліпептиду. Цей термін також стосується послідовностей нуклеїнової кислоти, комплементарних маркерним послідовностям, таким як нуклеїнові кислоти, застосовні як зонди, або пари праймерів, здатних до ампліфікації маркерної послідовності, або що фланкують їх. "Молекулярний маркерний зонд" являє собою послідовність або молекулу нуклеїнової кислоти, які можна використовувати для ідентифікації наявності маркерного локусу, наприклад, зонд на основі нуклеїнової кислоти, який є комплементарним послідовності маркерного локусу. Як альтернатива, у деяких аспектах маркерний зонд стосується зонда будь-якого типу, здатного розпізнати (тобто визначити генотип) конкретний алель, який наявний у маркерному локусі. Нуклеїнові кислоти є "комплементарними", коли вони специфічним чином гібридизуються в розчині, наприклад, згідно з правилами спарювання основ Уотсона-Кріка. Деякі маркери, описані в даному документі, також називають гібридизаційними маркерами, якщо вони розташовані на ділянці вставки/делеції, такій як неколінеарна ділянка, описана в даному документі. Це пов'язано з тим, що ділянка вставки являє собою, за визначенням, поліморфізм щодо рослини без вставки. Таким чином, маркер повинен тільки показати, чи наявна або відсутня ділянка вставки/делеції. Для ідентифікації такого гібридизаційного маркера можна застосовувати будь-яку придатну технологію виявлення маркера, зокрема у прикладах, наведених у даному документі, застосовують технологію SNP.

40 Алель "негативно" корелює з ознакою, якщо він зчеплений із нею, і якщо наявність алеля є індикатором того, що необхідна ознака або форма ознаки не буде спостерігатися в рослині, що містить даний алель.

"Нуклеотидна послідовність", "полінуклеотид", "послідовність нуклеїнової кислоти" і "фрагмент нуклеїнової кислоти" використовуються взаємозамінно і стосуються полімеру РНК або ДНК, який є одно- або двонитковим, необов'язково містить синтетичні нуклеотидні основи, що не є природними, або змінені синтетичні нуклеотидні основи. "Нуклеотид" являє собою мономерну ланку, з якої сконструйовані полімери ДНК або РНК, і вона складається з пуринової або піримідинової основи, пентози й групи фосфорної кислоти. Нуклеотиди (які зазвичай мають форму своїх 5'-монофосфатів) називають згідно з їхнім однобуквеним позначенням, як зазначено нижче: "А" для аденілату або дезоксиаденілату (для РНК або ДНК відповідно), "С" для цитидилату або дезоксицитидилату, "G" для гуанілату або дезоксигуанілату, "U" для уридилату, "T" для дезокситимідилату, "R" для пуринів (А або G), "Y" для піримідинів (С або Т), "K" для G або Т, "H" для А, або С, або Т, "I" для інозину та "N" для будь-якого нуклеотиду.

Термін "фенотип", "фенотипова ознака" або "ознака" можуть стосуватися спостережуваної експресії гена або ряду генів. Фенотип може спостерігатися неозброєним оком або за допомогою будь-яких інших способів оцінки, відомих із рівня техніки, наприклад, зважування, підрахунку, вимірювання (довжини, ширини, кутів тощо), мікроскопії, біохімічного аналізу або електромеханічного аналізу. У деяких випадках фенотип безпосередньо контролюється одним геном або генетичним локусом, тобто є "ознакою, контрольованою одним геном" або "ознакою, успадкованою за моногенною системою". У разі відсутності високих рівнів мінливості під

впливом навколишнього середовища ознаки, контрольовані одним геном, можуть сегрегувати в популяції з утворенням "якісного" або "дискретного" розподілення, тобто фенотипи розподілені за окремими класами. В інших випадках фенотип є результатом взаємодії декількох генів, і його можна вважати "ознакою, контрольованою декількома генами" або "складною ознакою". Ознаки, контрольовані декількома генами, сегрегують у популяції з утворення "кількісного" або "безперервного" розподілення, тобто фенотипи не можна розділити на окремі класи. Як ознаки, контрольовані одним геном, так і ознаки, контрольовані декількома генами, можуть зазнавати впливу навколишнього середовища, в якому вони експресуються, але ознаки, контрольовані декількома генами, здебільшого зазнають більшого впливу навколишнього середовища.

"Фізична карта" геному являє собою карту, на якій показано лінійний порядок орієнтирів, що можна ідентифікувати, (включно з генами, маркерами тощо) на хромосомній ДНК. Однак, на відміну від генетичних карт, відстані між орієнтирами є абсолютними (наприклад, вимірними в парах основ або виділених і суміжних генетичних фрагментів, що перекриваються), а не базуються на генетичній рекомбінації (яка може відрізнятися в різних популяціях).

"Рослина" може бути цілою рослиною, будь-якою її частиною або клітинною або тканинною культурою, одержаною з рослини. Таким чином, термін "рослина" може стосуватися будь-чого із цілих рослин, рослинних компонентів або органів (наприклад, листя, стебел, коріння тощо), рослинних тканин, насіння, рослинних клітин та/або їхніх потомків. Рослинна клітина являє собою клітину рослини, яку взято з рослини або одержану шляхом культивування з клітини, яку взято з рослини.

Рослина маїсу, "одержана з інбреду в популяції Stiff Stalk Synthetic", може бути гібридом.

"Поліморфізм" являє собою варіацію в ДНК між двома або більше особинами в межах популяції. Поліморфізм у популяції переважно характеризується частотою щонайменше 1 %. Застосовний поліморфізм може включати однонуклеотидний поліморфізм (SNP), простий повтор послідовності (SSR) або поліморфізм за типом вставки/делеції, який також називається в даному документі "вставка/делеція".

Алель "позитивний" корелює з ознакою, якщо він зчеплений із нею, і якщо наявність алеля є індикатором того, що необхідна ознака або форма ознаки буде спостерігатися в рослині, яка містить цей алель.

"Значення ймовірності" або "р-значення" являє собою статистичну ймовірність того, що конкретна комбінація фенотипу й наявності або відсутності конкретного маркерного алеля є випадковою. Таким чином, чим нижчий показник ймовірності, тим вища ймовірність того, що локус і фенотип асоційовані. На показник ймовірності може впливати близькість першого локусу (звичай маркерного локусу), а також локусу, що впливає на фенотип, плюс величина фенотипового ефекту (змінування фенотипу, спричинене заміщенням алеля). У деяких аспектах показник ймовірності вважається "значущим" або "незначущим". У деяких варіантах здійснення показник ймовірності 0,05 ($p=0,05$ або 5 % ймовірність) випадкового відбору вважається значущим показником наявності асоціації. Однак прийнятною ймовірністю може бути будь-яка ймовірність менше від 50 % ($p=0,5$). Наприклад, значуща ймовірність може становити менше від 0,25, менше від 0,20, менше від 0,15, менше від 0,1, менше від 0,05, менше від 0,01 або менше від 0,001.

"Маркер одержання" або "SNP-маркер одержання" являє собою маркер, який було розроблено з метою високої продуктивності. SNP-маркери одержання розробляють для виявлення специфічних поліморфізмів, і вони сконструйовані для використання в ряді хімічних аналізів і платформ. Використовувані в даному документі назви маркерів починаються з префікса PHM, що позначає "Pioneer Hi-Bred Marker", за яким іде число, яке визначається послідовністю, з якої він був розроблений, після якого йде "." або "-", а потім суфікс, що визначає поліморфізм ДНК. Потім також може йти версія маркера (A, B, C тощо), яка позначає версію маркера, сконструйованого для цього специфічного поліморфізму.

Термін "потомки" стосується потомства, одержаного за рахунок схрещування.

"Рослина-потомок" являє собою рослину, одержану за рахунок схрещування двох рослин.

Термін "локус кількісної ознаки" або "QTL" стосується ділянки ДНК, яка асоційована з диференціальною експресією кількісної фенотипової ознаки у щонайменше одному генетичному фоні, наприклад, у щонайменше одній селекційній популяції. Ділянка QTL охоплює ген або гени, які впливають на ознаку, що розглядається, або є близькозчепленим з ними.

"Еталонна послідовність" або "консенсусна послідовність" являє собою задану послідовність, що використовується як основа для порівняння послідовностей. Еталонну послідовність для PHM-маркера одержують шляхом секвенування низки ліній у локусі, вирівнювання нуклеотидних послідовностей у програмі для вирівнювання послідовностей (наприклад, Sequencher), а потім одержання найбільш загальної нуклеотидної послідовності з

вирівнювання. Поліморфізми, які виявляють в окремих послідовностях, анотуються в консенсусній послідовності. Еталонна послідовність зазвичай не є точною копією якоїсь окремої послідовності ДНК, а являє собою поєднання доступних послідовностей і застосовна для розробки праймерів і зондів для поліморфізмів у межах послідовності.

5 У разі зчеплення у фазі "відштовхування" "сприятливий" алель у локусі, що становить інтерес, фізично зчеплений із "несприятливим" алелем на близькому маркерному локусі, і два "сприятливих" алеля не успадковуються разом (тобто два локуси розташовані "у протифазі" один щодо одного).

10 Фраза "сіра плямистість листя" або "GLS" стосується захворювання злаків, що викликане грибним патогеном *Cercospora zeae-maydis*, який характеризується утворенням довгих, прямокутних, сірувато-коричневих ушкоджень на листі, що проходять паралельно жилці листка.

"Стійкість, що надається вперше", або "поліпшена стійкість", або "підвищена стійкість" у рослини маїсу щодо GLS є показником того, що рослина маїсу зазнає меншого впливу на врожайність і/або виживаність або інші відповідні агрономічні показники після проникнення збудників такого захворювання, наприклад, *Cercospora zeae-maydis*. "Підвищена стійкість" вказує на те, що заражена рослина дає кращий урожай маїсу, ніж інша більш сприйнятлива рослина, що зазнала аналогічного впливу. Іншими словами, умови викликають зменшене зниження виживаності маїсу та/або врожайності рослини маїсу за підвищеної стійкості (або толерантності) порівняно зі сприйнятливою рослиною маїсу.

20 Фахівцеві буде зрозуміло, що стійкість рослин маїсу до GLS варіюється в широких межах, тобто вона може передбачати цілий спектр із більш стійких або менш стійких фенотипів і може варіюватися в залежності від тяжкості зараження. Однак шляхом простого спостереження фахівець може визначати відносну стійкість або сприйнятливість різних рослин, ліній рослин або родин рослин до GLS і, крім того, також буде розпізнавати фенотипові градації "стійкості".
25 Наприклад, можна застосовувати візуальне ранжування від 1 до 9, що вказує на рівень стійкості до GLS. Більш високий показник вказує на більш високу стійкість. Дані слід збирати лише за існування достатнього тиску відбору в експерименті з вимірюваннями.

"Топкросний тест" являє собою тест, здійснюваний шляхом схрещування кожної особини (наприклад, відібраної особини, особини з інбредної лінії, клону або потомка) із тим самим запильником або "тестером", зазвичай гомозиготної лінії.

30 Фраза "у жорстких умовах" стосується умов, за яких зонд або полінуклеотид будуть гібридизуватися зі специфічною послідовністю нуклеїнової кислоти, що як правило, перебуває у складній суміші нуклеїнових кислот, але фактично не буде гібридизуватися з іншими послідовностями. Жорсткі умови залежать від послідовності та будуть відрізнятися за різних обставин. Довші послідовності специфічно гібридизуються за більш високих температур. Зазвичай жорсткі умови вибирають таким чином, щоб вони були на приблизно 5-10 °C нижче за температурну точку плавлення (T_m) для специфічної послідовності за певних іонної сили, рН. T_m являє собою температуру (за певних іонної сили, рН і концентрації нуклеїнової кислоти), за якої 50 % комплементарних із мішенню зондів гібридизуються із цільовою послідовністю у стані рівноваги (оскільки цільові послідовності є наявними в надлишку, при T_m 50 % зондів є зайнятими у стані рівноваги). Жорсткі умови будуть являти собою умови, за яких концентрація солі становить менше від приблизно 1,0 М іонів натрію, як правило, концентрація іонів натрію (або інших солей) становить від приблизно 0,01 до 1,0 М при рН 7,0-8,3, а температура становить щонайменше приблизно 30 °C у випадку коротких зондів (наприклад, 10-50 нуклеотидів) і щонайменше приблизно 60 °C у випадку довгих зондів (наприклад, більше 50 нуклеотидів). Жорстких умов також можна досягати за допомогою додавання дестабілізуювальних засобів, таких як формамід. У випадку селективної або специфічної гібридизації позитивний сигнал у щонайменше вдвічі перевищує фонову гібридизацію, переважно в 10 раз перевищує фонову гібридизацію. Найчастіше ілюстративні жорсткі умови гібридизації є наступними: 50 % формаміду, 5x SSC і 1 % SDS, інкубація при 42 °C, або 5x SSC, 1 % SDS, інкубація при 65 °C, із відмиванням у 0,2x SSC і 0,1 % SDS при 65 °C. У випадку PCR типова температура для ампліфікації за умов низької жорсткості становить приблизно 36 °C, хоча температури відпалу можуть варіюватися від приблизно 32 °C до 48 °C в залежності від довжини праймера. Додаткові вказівки для визначення параметрів гібридизації наведено в багатьох літературних джерелах.

55 "Несприятливий алель" маркера являє собою маркерний алель, який сегрегує з несприятливим фенотипом рослини, тобто таким чином він забезпечує перевагу в ідентифікації рослин, які можна вилучити з програми селекції або розведення.

60 Термін "урожайність" стосується продуктивності на одиницю площі для конкретного рослинного продукту з комерційною цінністю. Наприклад, урожайність маїсу зазвичай

вимірюють у бушелях насіння на акр або в метричних тоннах насіння на гектар за сезон. На врожайність впливають і генетичні фактори, і фактори навколишнього середовища. "Агрономічні параметри", "агрономічні ознаки" і "агрономічні показники" стосуються ознак (і генетичних елементів, що лежать у їхній основі) певного сорту рослин, які роблять внесок у врожайність протягом вегетаційного періоду. Окремі агрономічні ознаки включають потужність сходів, потужність вегетації, стресостійкість, стійкість або толерантність до захворювань, стійкість до гербіцидів, гілкування, цвітіння, закладення насіння, розмір насіння, щільність насіння, стійкість до вилягання, здатність до обмолочування тощо. Таким чином, урожайність є найбільш важливою з усіх агрономічних ознак.

Вирівнювання послідовностей і підрахунки відсотка ідентичності можна здійснювати із застосуванням різних способів порівняння, розроблених для виявлення гомологічних послідовностей, включаючи без обмеження програму MEGALIGN® із комплекту біоінформаційних обчислювальних програм LASERGENE® (DNASTAR® Inc., Мадісон, Вісконсин). Якщо не зазначено інше, множинне вирівнювання послідовностей, представлених у даному документі, здійснювали з використанням способу вирівнювання CLUSTAL V (Higgins і Sharp, CABIOS. 5:151 153 (1989)) зі стандартними параметрами (GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=10). Стандартні параметри для парних вирівнювань і розрахунку відсотка ідентичності білкових послідовностей із використанням способу CLUSTAL V являють собою наступні: KTUPLE=1, GAP PENALTY=3, WINDOW=5 і DIAGONALS SAVED=5. У випадку нуклеїнових кислот ці параметри являють собою наступні: KTUPLE=2, GAP PENALTY=5, WINDOW=4 і DIAGONALS SAVED=4. Після вирівнювання послідовностей із використанням програми CLUSTAL V можна одержати значення "відсотка ідентичності" і "дивергенції" за допомогою перегляду таблиці "відстані між послідовностями" у тій же програмі; якщо не зазначено інше, представлені й заявлені в даному документі показники відсотка ідентичності й дивергенції розраховані таким способом.

Застосовувані в даному документі стандартні методики рекомбінантних ДНК і молекулярного клонування добре відомі в даній галузі та більш повно описані в Sambrook, J., Fritsch, E. F. і Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989 (далі в даному документі "Sambrook").

Генетичне картування

Уже досить давно було визнано, що специфічні генетичні локуси, які корелюють із конкретними фенотипами, такими як стійкість до сірої плямистості листя, можна картувати в геномі організму. Селекціонер рослин може з успіхом застосовувати молекулярні маркери для ідентифікації необхідних особин шляхом виявлення маркерних алелей, які демонструють статистично значущу ймовірність косегрегації з необхідним фенотипом, що проявляється як нерівноважне зчеплення. Під час ідентифікації молекулярного маркера або кластерів молекулярних маркерів, які косегрегують із ознакою, що становлять інтерес, селекціонер може швидко відбрати необхідний фенотип шляхом відбору щодо належного молекулярного маркерного алеля (спосіб, який називають відбором за допомогою маркера, або MAS).

Різні способи, добре відомі з рівня техніки, доступні для виявлення молекулярних маркерів або кластерів молекулярних маркерів, які косегрегують з ознакою, що становить інтерес, такою як ознака стійкості до сірої плямистості листя. Основна ідея, що лежить в основі цих способів, полягає у виявленні маркерів, в яких альтернативні генотипи (або алелі) мають значущо відмінні усереднені фенотипи. Таким чином, для маркерних локусів здійснюють порівняння за величиною відмінності альтернативних генотипів (або алелей) або за рівнем значущості цієї відмінності. Можна дійти висновку, що гени ознаки повинні розташовуватися найближче до маркера(маркерів), який(які) характеризується(характеризуються) найбільшою асоційованою генотиповою відмінністю. Двома такими способами, застосовуваними для виявлення локусів ознак, що становлять інтерес, є наступні: 1) аналіз асоціацій на популяційній основі (тобто асоціативне картування) і 2) традиційний аналіз зчеплення.

Асоціативне картування

Розуміння ступеня й паттернів нерівноважного зчеплення (LD) у геномі є необхідною умовою для розробки ефективних асоціативних підходів для ідентифікації й картування локусів кількісних ознак (QTL). Нерівноважне зчеплення (LD) стосується не випадкової асоціації алелей у сукупності особин. Якщо LD спостерігається в алелей у зчеплених локусах, то його вимірюють як ослаблення LD у межах специфічної ділянки хромосоми. Ступінь LD є відображенням рекомбінаційної історії в даній ділянці. Середня швидкість ослаблення LD у геномі може допомогти передбачити кількість і щільність маркерів, які необхідні для проведення повногеномного пошуку асоціацій, і дає оцінку роздільної здатності, яку можна очікувати.

Метою асоціативного або LD-картування є ідентифікація значущих асоціацій генотип-фенотип. Його використовували як потужний інструмент для точного картування таких аутбредних видів, як людина (Corder et al. (1994) "Protective effect of apolipoprotein-E type-2 allele for late-onset Alzheimer-disease", *Nat Genet* 7:180-184; Hastbacka et al. (1992) "Linkage disequilibrium mapping in isolated founder populations: diastrophic dysplasia in Finli", *Nat Genet* 2:204-211; Kerem et al. (1989) "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis", *Science* 245:1073-1080) і маїс (Remington et al., (2001) "Structure of linkage disequilibrium і phenotype associations in the maize genome", *Proc Natl AcadSci USA* 98:11479-11484; Thornsberry et al. (2001) "Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time", *Nat Genet* 28:286-289; огляд у Flint-Garcia et al. (2003) "Structure of linkage disequilibrium in plants", *Annu Rev Plant Biol.* 54:357-374), в яких рекомбінація в гетерозиготах є частою та призводить до швидкого ослаблення LD. В інбредних видів, в яких рекомбінацію в гомозиготних генотипах неможливо визначити генетично, ступінь LD вища (тобто більші блоки зчеплених маркерів успадковуються разом), і це значно підвищує потужність виявлення під час асоціативного картування (Wall і Pritchard (2003) "Haplotype blocks і linkage disequilibrium in the human genome", *Nat Rev Genet* 4:587-597).

Рекомбінаційна й мутаційна історія популяції залежить від особливостей спарувальної поведінки, а також від ефективного розміру й віку популяції. Великі розміри популяції забезпечують кращі можливості для виявлення рекомбінації, у той же час вищі рівні поліморфізму зазвичай асоційовані зі старшими популяціями, обидві ці ознаки роблять внесок у помітне прискорення швидкості ослаблення LD. З іншого боку, популяції з меншим ефективним розміром, наприклад, такі, які нещодавно зазнали генетичного ефекту "пляшкової шийки", здебільшого демонструють повільнішу швидкість ослаблення LD, що призводить до збереження розширеного гаплотипу (Flint-Garcia et al (2003) "Structure of linkage disequilibrium in plants", *Annu Rev Plant Biol.* 54:357-374).

Елітні селекційні лінії забезпечують коштовну відправну точку для аналізів асоціацій. Кількісні фенотипові показники (наприклад, толерантність щодо захворювання, оцінювана від одного до дев'яти для кожної лінії маїсу) застосовуються в аналізі під час проведення аналізів асоціацій (на відміну від розгляду лише розподілення частот толерантних і стійких алелей у типах аналізу міжгрупового розподілення алелей). Наявність детальних даних щодо фенотипових характеристик, зібраних у програмах селекції протягом багатьох років і за багатьох умов навколишнього середовища для великої кількості елітних ліній, забезпечує цінний набір даних для аналізу асоціативного картування генетичних маркерів. Це прокладає шлях до ефективної інтеграції між дослідженням і застосуванням і використовує переваги накопичених у минулому наборів даних. Водночас розуміння взаємозв'язку між поліморфізмом і рекомбінацією застосовне під час розробки придатних стратегій для ефективного отримання максимальної інформації з таких ресурсів.

Цей тип аналізу асоціацій не генерує і не вимагає будь-яких даних на основі карти, а є незалежним від положення на карті. У цьому аналізі порівнюють фенотипову оцінку рослин із генотипами в різних локусах. Згодом можна необов'язково застосувати будь-яку придатну карту маїсу (наприклад, комбіновану карту) для сприяння у вивченні розподілення ідентифікованих маркерів QTL і/або кластеризації маркерів QTL із застосуванням визначених раніше місцерозташувань маркерів на карті.

Традиційний аналіз зчеплення

Ті ж самі принципи лежать в основі традиційного аналізу зчеплення; однак LD одержують за рахунок створення популяції з невеликої кількості засновників. Засновників відбирають таким чином, щоб максимально підвищити рівень поліморфізму в межах сконструйованої популяції, і при цьому поліморфні сайти оцінюють щодо рівня їх косегрегації із певним фенотипом. Ціла низка статистичних способів використовувалася для ідентифікації значущих асоціацій маркер-ознака. Одним таким способом є підхід інтервального картування (Lier і Botstein, *Genetics* 121:185-199 (1989)), відповідно до якого кожне з багатьох розташувань уздовж генетичної карти (припустимо, з інтервалами в 1 сМ) тестують щодо ймовірності того, що ген, який контролює ознаку, яка становить інтерес, розташований у цьому положенні. Дані щодо генотипу/фенотипу застосовують для розрахунку LOD-показника (логарифму відношення ймовірності) для кожного тестованого розташування. Якщо LOD-показник перевищує граничне значення, то існує значущий доказ розташування гена, що контролює ознаку, яка становить інтерес, у даному положенні на генетичній карті (яке буде розташовуватися між двома конкретними маркерними локусами).

У даному документі представлені маркерні локуси маїсу, які демонструють статистично значущу косегрегацію з ознакою стійкості до сірої плямистості листя, що визначено за

допомогою традиційного аналізу зчеплення й повногеномного аналізу асоціацій. Виявлення цих локусів або додаткових зчеплених локусів можна застосовувати в програмах селекції маїсу за допомогою маркера для одержання рослин, які характеризуються стійкістю до сірої плямистості листя.

5 Дії в програмах селекції маїсу за допомогою маркера можуть включати без обмеження: відбір з-поміж нових селекційних популяцій для ідентифікації того, яка з популяцій характеризується вищою частотою сприятливих послідовностей нуклеїнової кислоти на підставі історичного генотипу й асоціацій агрономічних ознак, відбір сприятливих послідовностей нуклеїнової кислоти серед потомства в селекційних популяціях, відбір серед батьківських ліній на підставі прогнозу характеристики потомків і просування ліній у діях, спрямованих на поліпшення зародкової плазми, на підставі наявності сприятливих послідовностей нуклеїнової кислоти.

Місцерозташування QTL

15 QTL на хромосомі 4 ідентифікували як асоційований з ознакою стійкості до сірої плямистості листя із застосуванням традиційного картування зчеплення, а потім підтвердили (приклади 1 і 2). Хоча цей QTL перебуває в тому самому місцерозташуванні, що й описаний у US 2009172845, аналіз маркерів і дослідження ідентичності за походженням показали, що алель QTL, описаний у даному документі, походить з іншого джерела.

Хромосомні інтервали

20 Представлено хромосомні інтервали, які корелюють з ознакою стійкості до сірої плямистості листя. Для ідентифікації хромосомних інтервалів доступні різноманітні способи, добре відомі з рівня техніки. Межі таких хромосомних інтервалів наносять таким чином, щоб вони охоплювали маркери, які будуть зчеплені з геном(генами), що контролюють ознаку, яка становить інтерес. Інакше кажучи, хромосомний інтервал наносять таким чином, що будь-який маркер, який розташований у межах такого інтервалу (включно з кінцевими маркерами, які задають межі інтервалу), можна застосовувати як маркер для ознаки стійкості до сірої плямистості листя. У таблицях 1 і 3 ідентифіковані маркери в межах ділянки QTL хромосоми 4, які, як показано в даному документі, асоційовані з ознакою стійкості до сірої плямистості листя, і які зчеплені з геном(генами), що контролюють стійкість до сірої плямистості листя. Еталонні послідовності для кожного з маркерів представлено під SEQ ID NO: 1-9.

35 Кожний інтервал містить щонайменше один QTL, і, крім того, у дійсності може містити більш за одного QTL. Безпосередня близькість декількох QTL на одному інтервалі може ускладнити визначення кореляції конкретного маркера з конкретним QTL, тому що один маркер може демонструвати зчеплення більш ніж з одним QTL. І навпаки, наприклад, якщо два маркери в безпосередній близькості демонструють косегрегацію з необхідною фенотиповою ознакою, то іноді незрозуміло, чи ідентифікує кожний із цих маркерів той самий QTL або два різні QTL. Незалежно від цього, розуміння того, скільки QTL розташовується у конкретному інтервалі, не є необхідним для одержання або застосування на практиці того, що представлено в даному винаході.

40 Інтервал на хромосомі 4 може охоплювати будь-який із маркерів, ідентифікованих у даному документі як асоційовані з ознакою стійкості до сірої плямистості листя, зокрема: PHM6764-7, PHM16360-9, PHM521-8, PHM586-10, PHM289-20, PHM12024-9, PHM199-23, PHMGLS_01, PHMGLS_07, PHMGLS_14, PHMGLS_19, PHMGLS_21, PHMGLS_45, PHMC001YAR, PHM5013-12, PHM1963-15 і PHM18451-2. Інтервал на хромосомі 4 може бути заданим маркерами PHM6764-7 і PHM289-1 (приклад 1), які розділені найбільшою відстанню на фізичній карті. Підінтервал цієї ділянки може додатково бути заданим маркерами PHM521-8 і PHM18451-2. Будь-який маркер, розташований у межах цих інтервалів, можна застосовувати як маркер стійкості до сірої плямистості листя і можна застосовувати в контексті способів, наведених у даному документі, для ідентифікації та/або відбору рослин маїсу, які характеризуються стійкістю до сірої плямистості листя, незалежно від того, чи є вона такою, що надається вперше або поліпшеною порівняно з контрольною рослиною.

55 Хромосомні інтервали також можуть бути задані маркерами, які зчеплені (демонструють нерівноважне зчеплення) із маркером QTL, а r^2 являє собою загальноживаний показник нерівноважного зчеплення (LD) у контексті досліджень асоціацій. Якщо значення r^2 для LD між маркерним локусом на хромосомі 4, наведеним в даному документі, та іншим маркерним локусом на хромосомі 4, що розташовані в безпосередній близькості, перевищує 1/3 (Ardlie et al., Nature Reviews Genetics 3:299-309 (2002)), то локуси перебувають у нерівноважному зчепленні один з одним.

Маркери і взаємозв'язки зчеплення

Звичайним показником зчеплення є частота, з якою ознаки косегрегують. Вона може бути виражена як відсоткова частка косегрегації (частоти рекомбінації) або у сантиморганідах (сМ). Одницею вимірювання частоти генетичної рекомбінації є сМ. Одна сМ дорівнює 1 % ймовірності того, що ознака в одному генетичному локусі буде відокремлена від ознаки в іншому локусі

5 внаслідок кросинговера в одному поколінні (це означає, що ознаки сегрегують разом у 99 % випадків). Оскільки хромосомна відстань приблизно пропорційна частоті явищ кросинговера між ознаками, то існує приблизна фізична відстань, яка корелює з частотою рекомбінації.

Власне маркерні локуси є ознаками, та їх можна оцінювати згідно зі стандартним аналізом зчеплення шляхом відстеження маркерних локусів під час сегрегації. Таким чином, одна сМ

10 дорівнює 1 % ймовірності того, що маркерний локус буде відокремлений від іншого локусу внаслідок кросинговера в одному поколінні.

Чим ближчим є розташування маркера до гена, що контролює ознаку, яка становить інтерес, тим більш ефективно і корисно цей маркер виконує функцію індикатора для необхідної ознаки. Близькозчеплені локуси виявляють частоту міжлокусного кросинговера, що становить

15 приблизно 10 % або менше, переважно приблизно 9 % або менше, ще більш переважно приблизно 8 % або менше, навіть більш переважно приблизно 7 % або менше, ще більш переважно приблизно 6 % або менше, навіть більш переважно приблизно 5 % або менше, ще більш переважно приблизно 4 % або менше, навіть більш переважно приблизно 3 % або менше і ще більш переважно приблизно 2 % або менше. В особливо переважних варіантах здійснення

20 відповідні локуси (наприклад, маркерний локус і цільовий локус) виявляють частоту рекомбінації, що становить приблизно 1 % або менше, наприклад, приблизно 0,75 % або менше, більш переважно приблизно 0,5 % або менше або навіть більш переважно приблизно 0,25 % або менше. Таким чином, локуси розташовані на відстані, що становить приблизно 10 сМ, 9 сМ, 8 сМ, 7 сМ, 6 сМ, 5 сМ, 4 сМ, 3 сМ, 2 сМ, 1 сМ, 0,75 сМ, 0,5 сМ або 0,25 сМ або менше.

25 Інакше кажучи, стосовно двох локусів, які локалізовані на одній і тій самій хромосомі й на такій відстані, що рекомбінація між цими двома локусами відбувається з частотою, яка становить менше від 10 % (наприклад, приблизно 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,75 %, 0,5 %, 0,25 % або менше), кажуть, що вони "розташовані поблизу" один від одного.

Хоча конкретні маркерні алелі можуть косегрегувати з ознакою стійкості до сірої плямистості

30 листя, важливо відзначити, що даний маркерний локус не обов'язково є відповідальним за експресію фенотипу, стійкого до сірої плямистості листя. Наприклад, те, щоб маркерна полінуклеотидна послідовність була частиною гена, який є відповідальним за фенотип, стійкий до сірої плямистості листя (наприклад, частиною відкритої рамки зчитування гена), не є необхідною умовою. Асоціація між специфічним маркерним алелем і ознакою стійкості до сірої

35 плямистості листя зумовлена вихідним зчепленням у фазі "притягання" між маркерним алелем і цим алелем у предкової лінії маїсу, з якої походить цей алель. У підсумку в разі повторюваної рекомбінації, явища кросинговера між маркером і генетичним локусом можуть змінити таку орієнтацію. Через цю причину сприятливий маркерний алель може змінюватися залежно від фази зчеплення, спостережуваної в межах батьківської форми, що характеризується стійкістю

40 до сірої плямистості листя, яку застосовують для створення популяцій, що сегрегують. Це не змінює того факту, що маркер можна застосовувати для відстеження сегрегації фенотипу. Це змінює лише те, який маркерний алель вважається сприятливим у цієї популяції, що сегрегує.

Способи, представлені в даному документі, включають виявлення наявності одного або декількох маркерних алелей, асоційованих зі стійкістю до сірої плямистості листя у рослини

45 маїсу, а потім ідентифікацію та/або відбір рослин маїсу, які мають сприятливі алелі в таких маркерних локусах. Маркери, перераховані в таблицях 1, 2 і 3, були ідентифіковані в даному документі як асоційовані з ознакою стійкості до сірої плямистості листя, отже, їх можна застосовувати для прогнозування стійкості до сірої плямистості листя у рослини маїсу. Будь-який маркер, який розташований у межах 50 сМ, 40 сМ, 30 сМ, 20 сМ, 15 сМ, 10 сМ, 9 сМ, 8 сМ,

50 7 сМ, 6 сМ, 5 сМ, 4 сМ, 3 сМ, 2 сМ, 1 сМ, 0,75 сМ, 0,5 сМ або 0,25 сМ (виходячи з генетичної карти одноразового мейозу) від будь-якого з маркерів у таблицях 1 і 3, також можна застосовувати для прогнозування стійкості до сірої плямистості листя у рослини маїсу.

Відбір за допомогою маркерів

Молекулярні маркери можна застосовувати в різноманітних напрямках селекції рослин

55 (наприклад, див. Staub et al. (1996) Hortscience 31: 729-741; Tanksley (1983) Plant Molecular Biology Reporter. 1: 3-8). Одним із головних напрямків, що становлять інтерес, є підвищення ефективності зворотного схрещування й інтрогресії генів із застосуванням відбору за допомогою маркера (MAS). Молекулярний маркер, який демонструє зчеплення з локусом, що впливає на необхідну фенотипову ознаку, забезпечує корисний інструмент для відбору ознаки в

60 популяції рослин. Це особливо актуально в тому випадку, коли фенотип складно аналізувати.

Оскільки аналізи ДНК-маркерів є менш трудомісткими й потребують менше фізичного простору, ніж фенотипування в польових умовах, можна аналізувати набагато більші популяції, що підвищує ймовірність виявлення рекомбінанту, в якого цільовий сегмент із донорної лінії перенесений у реципієнтну лінію. Чим щільніше зчеплення, тим більш застосовним є маркер, оскільки між цим маркером і геном, що зумовлює ознаку, із меншою ймовірністю відбудеться рекомбінація, яка може призводити до хибнопозитивних результатів. Наявність фланкувальних маркерів знижує ймовірність хибнопозитивного відбору, оскільки буде потрібна подія подвійної рекомбінації. Ідеальною ситуацією є наявність маркера в самому гені для того, щоб рекомбінація між маркером і геном не могла відбуватися. Такий маркер називають "ідеальним маркером".

Якщо інтрогресія гена здійснюється за допомогою MAS, то наявним є не лише ген, який уводиться, але також фланкувальні ділянки (Gepts. (2002). *Crop Sci*; 42: 1780-1790). Це називається "шлейф зчеплення". У тому випадку, коли донорна рослина має дуже низький ступінь спорідненості з реципієнтною рослиною, ці фланкувальні ділянки несуть додаткові гени, які можуть кодувати небажані з для агрономії ознаки. Такий "шлейф зчеплення" також може призводити до зниження врожайності або до інших негативних агрономічних характеристик навіть після декількох циклів зворотного схрещування з елітною лінією маїсу. Він також іноді називається "шлейф щодо врожайності". Розмір фланкувальної ділянки можна знижувати за допомогою додаткового зворотного схрещування, хоча це не завжди є успішним, оскільки селекціонери не можуть контролювати розмір ділянки або точкові розриви під час рекомбінації (Young et al. (1998) *Genetics* 120:579-585). У разі класичної селекції звичайним є те, що рекомбінації, які роблять внесок у зменшення розміру донорного сегменту, відбираються виключно випадково (Tanksley et al. (1989). *Biotechnology* 7: 257-264). Навіть після 20 зворотних схрещувань у беккросів цього типу можна очікувати виявлення того, що ділянка донорної хромосоми значних розмірів як і раніше зчеплена з геном, за яким проводять відбір. Однак за допомогою маркерів можна відбирати ті рідкі особини, у яких відбулася рекомбінація поряд із геном, що становить інтерес. У випадку 150 рослин-беккросів існує 95 % ймовірність того, що принаймні в одній рослині відбудеться кросинговер у межах 1 сМ від гену з урахуванням відстані на карті одноразового мейозу. Маркери будуть забезпечувати однозначну ідентифікацію таких особин. У випадку одного додаткового зворотного схрещування 300 рослин буде 95 % ймовірність кросинговера в межах відстані 1 сМ за картою однократного мейозу з іншої сторони гена, що призведе до сегмента навколо цільового гена, що становить менше за 2 сМ з урахуванням відстані на карті одноразового мейозу. Цього можна досягти за два покоління за допомогою маркерів, тоді як без маркерів було б потрібно в середньому 100 поколінь (див. Tanksley et al., вище). Якщо відоме точне положення гена, то фланкувальні маркери, які оточують ген, можна використовувати для відбору щодо рекомбінацій при різних розмірах популяцій. Наприклад, у випадку популяцій меншого розміру можна очікувати рекомбінації, розташовані далі від гена, тому більш віддалені фланкувальні маркери будуть потрібні для виявлення рекомбінації.

Доступність інтегрованих карт зчеплення генома маїсу, що містять загальнодоступні маркери маїсу, щільність яких постійно зростає, полегшили генетичне картування маїсу та MAS. Див., наприклад, карти IBM2 Neighbors, які доступні онлайн на веб-сайті MaizeGDB.

Ключові компоненти реалізації MAS являю собою: (i) визначення популяції, у межах якої будуть визначати асоціацію маркер-ознака, яка може являти собою популяцію, що сегрегує, або випадкову, або структуровану популяцію; (ii) відстеження сегрегації або асоціації поліморфних маркерів з ознакою й визначення зчеплення або асоціації із застосуванням статистичних способів; (iii) визначення набору необхідних маркерів на підставі результатів статистичного аналізу та (iv) застосування й/або екстраполяція такої інформації на наявний набір селекційної зародкової плазми для забезпечення рішень щодо відбору на основі маркерів, які слід прийняти. Маркери, описані в даному документі, а також інші типи маркерів, такі як SSR і FLP, можна застосовувати в протоколах відбору за допомогою маркерів.

SSR можуть визначатися як порівняно короткі серії тандемно повторюваної ДНК довжиною 6 п.о. або менше (Tautz (1989) *Nucleic Acid Research* 17: 6463-6471; Wang et al. (1994) *Theoretical i Applied Genetics*, 88:1-6). Поліморфізми виникають внаслідок варіації в кількості повторюваних ланок, що, імовірно, обумовлено проковзуванням під час реплікації ДНК (Levinson і Gutman (1987) *Mol Biol Evol* 4: 203-221). Варіацію довжини повторів можна виявити за допомогою конструювання PCR-праймерів для консервативних неповторюваних фланкувальних ділянок (Weber і May (1989) *Am J Hum Genet.* 44:388-396). SSR найкраще підходять для картування й MAS, оскільки вони є мультіалельними, кодомінантними, відтворюваними й доступними для

високопродуктивної автоматичної обробки (Rafalski et al. (1996) *Generating i using DNA markers in plants*. In: *Non-mammalian genomic analysis: a practical guide*. Academic press, pp 75-135).

5 Можна створити різні типи SSR-маркерів, і SSR-профілі можна одержувати за допомогою гель-електрофорезу продуктів ампліфікації. Оцінка маркерного генотипу ґрунтується на розмірі ампліфікованого фрагменту. Сервіс для роботи з SSR маїсу є загальнодоступним на договірній основі від компанії DNA Limarks у Сен-Жан-сюр-Рішельє, Квебек, Канада.

10 Також можна створювати різні типи FLP-маркерів. Найчастіше для одержання поліморфізмів довжин фрагментів застосовують праймери для ампліфікації. Такі FLP-маркери за багатьма параметрами подібні SSR-маркерам, за винятком того, що ділянка, яка ампліфікується за допомогою праймерів, здебільшого не є ділянкою з високою частотою повторів. Одночасно ампліфікована ділянка або амплікон будуть характеризуватися достатньою мінливістю в зародковій плазмі, найчастіше внаслідок вставок або делецій, унаслідок чого фрагменти, одержані за допомогою праймерів для ампліфікації, можуть відрізнятися у поліморфних особин, і, як відомо, такі вставки/делеції часто виникають у маїсу (Bhatramakki et al. (2002). *Plant Mol Biol* 48, 539-547; Rafalski (2002b), вище).

15 SNP-маркери виявляють заміни нуклеотиду в одній парі основ. Із-поміж усіх типів молекулярних маркерів SNP є найпоширенішими, отже, потенційно вони можуть забезпечити найвищу роздільну здатність генетичної карти (Bhatramakki et al. 2002 *Plant Molecular Biology* 48:539-547). SNP можна аналізувати навіть із вищою продуктивністю, ніж SSR, у так званому "надвисокопродуктивному" способі, оскільки для них не потрібні великі кількості ДНК, а автоматизація аналізу може бути нескладною. Також у перспективі SNP будуть відносно недорогими системами. Разом три ці фактори роблять SNP найбільш привабливими для застосування в MAS. Для генотипування SNP доступні декілька способів, зокрема без обмеження гібридизація, елонгація праймера, лігування олігонуклеотидів, розщеплення нуклеазами, мінісеквенування й кодувальні сфери. Огляд таких способів було наведено в: Gut (2001) *Hum Mutat* 17 pp. 475-492; Shi (2001) *Clin Chem* 47, pp. 164-172; Kwok (2000) *Pharmacogenomics* 1, pp. 95-100; і Bhatramakki і Rafalski (2001) *Discovery i application of single nucleotide polymorphism markers in plants*. In: R. J. Henry, Ed, *Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants*, CAB International, Wallingford. Ці та інші способи докладного дослідження SNP використовуються в широкому спектрі комерційно доступних технологій, зокрема Masscode.TM. (Qiagen), INVADER®. (Third Wave Technologies) і Invader PLUS®, SNAPSHOT®. (Applied Biosystems), TAQMAN®. (Applied Biosystems) і BEADARRAYS®. (Illumina).

20 Певну кількість SNP разом у межах послідовності або у різних пов'язаних послідовностях можна застосовувати для опису гаплотипу будь-якого конкретного генотипу (Ching et al. (2002), *BMC Genet.* 3:19 pp, Gupta et al. 2001, Rafalski (2002b), *Plant Science* 162:329-333). Гаплотипи можуть бути більш інформативними, ніж одиночні SNP, і можуть краще описувати будь-який конкретний генотип. Наприклад, одиночний SNP може являти собою алель T' у специфічній лінії або сорту зі стійкістю до сірої плямистості листя, однак алель "Г може також існувати в селекційній популяції маїсу, використовуваній як рекурентні батьківські форми. У цьому випадку гаплотип, наприклад, комбінація апелів у зчеплених SNP-маркерах, може бути більш інформативним. Після того як донорний хромосомний ділянці був приписаний унікальний гаплотип, такий гаплотип можна застосовувати в такій популяції або будь-якій її підмножині для визначення того, чи має особина конкретний ген. Див., наприклад, документ WO 2003054229. Застосування високопродуктивних автоматизованих платформ для виявлення маркера, відомих фахівцям у даній галузі, робить даний спосіб надзвичайно продуктивним та ефективним.

25 Багато з PHM-маркерів, представлених у даному документі, із легкістю можуть застосовуватися як FLP-маркери для відбору локусів генів на хромосомі 4 унаслідок наявності поліморфізмів на основі вставки/делеції. Праймери для PHM-маркерів також можна застосовувати для перетворення цих маркерів у SNP або інші структурно подібні або функціонально еквівалентні маркери (SSR, CAP, вставки/делеції тощо) у тих самих ділянках. Один високопродуктивний підхід для перетворення в SNP описаний у Rafalski (2002a) *Current opinion in plant biology* 5 (2): 94-100, а також у Rafalski (2002b) *Plant Science* 162: 329-333. У ході PCR праймери застосовують для ампліфікації сегментів ДНК від особин (переважно інбредних), які відображають різноманітність у популяції, що становить інтерес. Продукти PCR секвенують безпосередньо в одному або обох напрямках. Одержані послідовності вирівнюють і поліморфізми ідентифікують. Поліморфізми не обмежуються одонуклеотидними поліморфізмами (SNP), але також включають вставки/делеції, CAPS, SSR і VNTR (кількість тандемних повторів, що варіює). Так, з урахуванням інформації точної карти, описаної в даному документі, можна легко застосовувати інформацію, представлену в даному документі, для одержання додаткових поліморфних SNP (та інших маркерів) у межах ділянки, ампліфікованої

за допомогою праймерів, наведених у даному винаході. Маркери в межах описаної ділянки карти можна гібридизувати з BAC або іншими геномними бібліотеками, або за допомогою електронних засобів вирівнювати з геномними послідовностями, щоб знайти нові послідовності в тому самому приблизному місцезрештуванні, що й описані маркери.

5 Додатково до SSR, FLP і SNP, описуваних вище, також широко застосовуються інші типи молекулярних маркерів, зокрема без обмеження маркери експресованих послідовностей (EST), SSR-маркери, одержані з послідовностями EST, випадково ампліфіковані поліморфні ДНК (RAPD) та інші маркери на основі нуклеїнової кислоти.

10 Ізоферментні профілі й пов'язані морфологічні характеристики в деяких випадках також можуть опосередковано застосовуватись як маркери. Хоча вони безпосередньо не виявляють відмінності в ДНК, на них часто впливають специфічні генетичні відмінності. Проте маркери, які виявляють варіацію ДНК, набагато більш численні й поліморфні, ніж ізоферменти або морфологічні маркери (Tanksley (1983) Plant Molecular Biology Reporter 1:3-8).

15 Результати вирівнювання послідовностей або контиги також можна застосовувати для виявлення послідовностей вище або нижче від специфічних маркерів, перерахованих у даному документі. Такі нові послідовності, розташовані поблизу маркерів, описаних у даному документі, потім застосовують для пошуку й розробки функціонально еквівалентних маркерів. Наприклад, різні фізичні й/або генетичні карти вирівнюють, щоб локалізувати еквівалентні маркери, які не описані в межах даного винаходу, але розташовані в межах подібних ділянок. Такі карти можуть належати до карт для виду маїс або навіть інших видів, таких як рис, пшениця, ячмінь або сорго, водночас вони були генетично або фізично вирівняні з картами маїсу.

20 Зазвичай у MAS застосовують поліморфні маркери, які були ідентифіковані як такі, що характеризуються значною ймовірністю косегрегації з ознакою, такою як ознака стійкості до сірої плямистості листя. Передбачається, що такі маркери розташовані на карті поряд із геном або генами, які надають рослині фенотип, стійкий до сірої плямистості листя, і вони вважаються індикаторами необхідного ознаки або маркерами. Рослини тестують щодо наявності необхідного алеля в маркері, і, очікується, що рослини, які містять необхідний генотип в одному або декількох локусах, передадуть необхідний генотип разом з необхідним фенотипом своїм потомками. Таким чином, за допомогою виявлення одного або декількох маркерних алелів можна відбирати рослини зі стійкістю до сірої плямистості листя і, крім того, також можна відбирати рослини-потомки, одержані від таких рослин. У результаті одержують рослину, яка містить необхідний генотип у вказаній хромосомній ділянці (тобто генотип, асоційований зі стійкістю до сірої плямистості листя), а потім схрещують її з іншою рослиною. Потомків від такого схрещування потім будуть оцінювати щодо генотипу із застосуванням одного або

25 30 35

декількох маркерів, і рослини-нащадки з тим же генотипом у вказаній хромосомній ділянці можна потім відібрати як такі, що характеризуються стійкістю до сірої плямистості листя. Шляхом застосування картування зчеплення й аналізу асоціації ідентифікували маркери, асоційовані з ознакою стійкості до сірої плямистості листя. Еталонні послідовності для маркерів представлені під SEQ ID NO:1-9. У межах маркерних послідовностей ідентифікують положення

40

45 Способи ідентифікації та/або відбору рослин маїсу з підвищеною стійкістю до сірої плямистості листя можуть включати: (а) проведення скринінгу популяції за допомогою маркера в інтервалі QTL для визначення того, чи має рослина маїсу з популяції алель QTL, заданий у даному документі; (b) виявлення рослини маїсу, яка має маркерний алель, асоційований із гаплотипом, заданим у даному документі; (c) виявлення рослини маїсу, яка має алель QTL, де вказаний алель QTL містить "C" у PHM1963-15 і будь-який інший алель, передбачений у даному документі; або (d) виявлення рослини маїсу, яка має "T" у PHM521-8; "G" у PHM12024-9; "T" у PHM 199-23; "T" у PHM586-10; "C" у PHM1963-15; "G" у PHM18451-2 і "C" у PHM289-20. Рослина маїсу, яка була ідентифікована, потім може бути відібрана для подальшої розробки, яка може включати схрещування з другою рослиною маїсу й одержання рослини-потомка.

50

55 Фахівцеві в даній галузі слід очікувати, що можлива наявність додаткових поліморфних сайтів у маркерних локусах, ідентифікованих у даному документі маркерів на хромосомі 4 і навколо них, де один або декілька поліморфних сайтів перебувають у нерівноважному зчепленні (LD) з алелем в одному або декількох поліморфних сайтах у гаплотипі й, таким чином, їх можна буде застосовувати в програмі відбору за допомогою маркерів для інтрогресії алеля QTL, що становить інтерес. Вважається, що два конкретні алеля в різних поліморфних сайтах розташовані в LD, якщо наявність алеля в одному із сайтів у більшості випадків прогнозує наявність алеля в іншому сайті на одній і тій же хромосомі (Stevens, Mol. Diag. 4:309-17 (1999)). Маркерні локуси можуть розташовуватися в межах 5 cM, 2 cM або 1 cM (на генетичній карті одноразового мейозу) від QTL ознаки стійкості до сірої плямистості листя.

60

Фахівцеві в даній галузі буде зрозуміло, що алельна частота (і, отже, частота гаплотипу) може відрізнятися в різних пулах зародкової плазми. Пули зародкової плазми варіюють внаслідок відмінностей у дозріванні, гетерозисних угруповань, географічного поширення тощо. Це призводить до того, що SNP та інші поліморфізми можуть не бути інформативними для деяких пулів зародкової плазми.

Склади рослин

Рослини маїсу, ідентифіковані та/або відібрані за допомогою одного зі способів, описаних вище, також становлять інтерес. Мається на увазі будь-яка рослина виду *Zea mays*, яка має у своєму геномі на хромосомі 4 гаплотип, що містить: "T" у PHM521-8; "G" у PHM12024-9; "T" у PHM199-23; "T" у PHM586-10; "C" у PHM1963-15; "G" у PHM18451-2 і "C" у PHM289-20; і проявляє стійкість до сірої плямистості листя (стійкість може бути такою, що надається вперше або поліпшеною) порівняно з рослиною маїсу, яка не має цього гаплотипу у своєму геномі.

Засоби для обробки насіння

Щоб захистити й підвищити врожай і поліпшити технології вдосконалення ознак, застосовуються способи обробки насіння, які можуть забезпечувати додаткову пристосованість культурних рослин і економічно ефективний контроль комах, бур'янів і захворювань, додатково поліпшуючи таким чином об'єкт, описаний у даному документі. Насіннєвий матеріал можна обробляти, зазвичай обробляти його поверхню, за допомогою композиції, що містить комбінації хімічних або біологічних гербіцидів, антидотів гербіцидів, інсектицидів, фунгіцидів, інгібіторів і підсилювачів проростання, живильних речовин, регуляторів й активаторів росту рослин, бактерицидних речовин, нематоцидів, авіцидів і/або молюскоцидів. Такі сполуки здебільшого складають разом із додатковими носіями, поверхнево-активними речовинами або допоміжними речовинами, що сприяють нанесенню, традиційно використовуваними в галузі одержання складів. Покриття можна наносити за допомогою просочування матеріалу для розмноження рідким складом або за допомогою покриття комбінованим вологим або сухим складом. Приклади різних типів сполук, які можна застосовувати як засоби для обробки насіння, представлено у *The Pesticide Manual: A World Compendium*, C.D.S. Tomlin Ed., Published by British Crop Production Council, що таким чином включений у даний документ за допомогою посилання.

Деякі засоби для обробки насіння, які можна застосовувати щодо насіння сільськогосподарських культур, включають без обмеження одне або декілька з абсцизової кислоти, ацибензолар-в-метилу, авермектину, амітролу, азаконазолу, азоспіріллуму, азадирахтину, азоксистробіну, *Bacillus* spp. (включно з одним або декількома видами *segeus*, *firmus*, *megaterium*, *pumilis*, *sphaericus*, *subtilis* і/або *thuringiensis*), *Bradyrhizobium* spp. (включно з одним або декількома видами *betae*, *canariense*, *elkanii*, *iriomotense*, *japonicum*, *liaonigense*, *rachyrhizi* і/або *uanmingense*), каптану, карбоксину, хітозану, клотіанідину, міді, ціазипіру, дифенокназолу, етидіазолу, фіпронілу, флудіоксонілу, флуквінконазолу, флуразолу, флуксофеніму, білка гарпіну, імазалілу, імідаклоприду, іпконазолу, ізофлавоноїдів, ліпохітоолігосахариду, манкозебу, марганцю, манебу, мефеноксаму, металаксилу, метконазолу, PCNB, пенфлуфену, пенциллуму, пентіошраду, перметрину, пікоксистробіну, протіокназолу, піраклостробіну, ринаксіпіру, S-метолахлору, сапоніну, седаксану, TCMTB, тебуконазолу, тіабендазолу, тіаметоксаму, тіокарбу, тіраму, толклофос-метилу, триадименолу, триходерми, трифлуксистробіну, тритіконазолу та/або цинку. Засіб для покриття насіння PCNB із реєстраційним номером EPA 00293500419 містить квінтозен і терразол. TCMTB має назву 2-(тіоціанометилтіо)бензотіазол.

Насіння, яке продукують рослини зі специфічними ознаками (такими як стійкість до сірої плямистості листя), можна тестувати для того, щоб визначити, які способи обробки насіння і норми внесення можуть поєднуватися з такими рослинами для підвищення врожайності. Наприклад, рослина з прийнятною потенційною врожайністю, але зі сприйнятливістю до курної сажки, може одержати перевагу від застосування засобу для обробки насіння, який забезпечує захист від курної сажки, рослина з прийнятною потенційною врожайністю, але зі сприйнятливістю щодо цистоутворювальної нематоди, може одержати перевагу від застосування засобу для обробки насіння, який забезпечує захист від цистоутворювальної нематоди тощо. До того ж, надійне вкорінення і рання поява сходів, які є результатом належного застосування засобу для обробки насіння, можуть призводити до більш ефективного використання азоту, кращої здатності до перенесення посухи й загального збільшення потенційного врожаю рослини або рослин, які мають певну ознаку, у разі комбінації із засобом для обробки насіння.

ПРИКЛАДИ

Наступні приклади передбачені для ілюстрації, а не для обмеження об'єкта, що заявляється. Зрозуміло, що приклади й варіанти здійснення, описані в даному документі, призначені лише з метою ілюстрації, і що фахівці в даній галузі розпізнають різні реагенти або параметри, які можуть бути змінені без відступу від суті даного винаходу або обсягу формули винаходу, яка додається.

ПРИКЛАД 1.

Картування й підтвердження QTL, пов'язаного зі стійкістю до сірої плямистості листа

У дослідженні з картуванням QTL виявили, що ділянка генома маїсу в положенні 100-115 сМ на хромосомі 4 на генетичній карті одноразового мейозу асоційована зі стійкістю до сірої плямистості листа. Щоб додатково дослідити ділянку QTL, пропріетарну інбредну лінію, сприйнятливую до сірої плямистості листа (називану в даному документі як "інбред В"), схрещували зі стійкою пропріетарною інбредною лінією (називаною в даному документі як "інбред А") з одержанням популяції BC₄F₂, що складається з ~1600 рослин. Насіння збирали після самозапилення останнього беккросу, а потім висівали. Рослини інокулювали за допомогою насінин маїсу, заражених *Cercospora zeae-maydis*, як носія. Інокуляції виконували, опускаючи по 5-10 заражених насінин у колотівки листа на стадії росту V5-6 і знову на стадії росту V8. Оцінку захворювання в балах проводили шляхом ранжування рослин за шкалою від 1 до 9, де 1 означає найгірше, а 9 означає найкраще. Контрольні графіки з відомою відповіддю на захворювання застосовували як настанову для найкращого часу для проведення оцінки й калібрування ранжування. Оцінювання проводили двічі. Також збирали дані щодо цвітіння, позначаючи дату, на яку в 50 % кожної рослини виявлено шовк, із перерахуванням її в показник суми активних температур (GDUSLK) на основі погодних даних у цьому місцерозташуванні.

Із 1633 рослин, вирощених у польових умовах, 1607 рослин генотипували за 5 маркерами в ділянці хромосоми 4; причому ці маркери являли собою PHM6764-7 (94,78 сМ на генетичній карті одноразового мейозу), PHM16360-9 (104,12 сМ), PHM521-8 (108,38 сМ), PHM586-10 (111,72 сМ) і PHM289-20 (113,94 сМ). Відмінності спостерігали між рослинами з однією або двома копіями алеля донорної батьківської форми й рослинами без копій алеля донорної батьківської форми (таблиця 1). Для двох копій алеля донорної батьківської форми показана відмінність, що становить 0,62 бала, а для однієї копії показана відмінність, що становить 0,79 бала за шкалою від 1 до 9 (таблиця 2). Рослини без копій алеля донорної батьківської форми характеризувалися середнім показником, що становить 4,64 (таблиця 2). Між класами були відсутні відмінності в часі цвітіння.

Таблиця 1

Генотипи батьківських форм за маркерами PHM6764-7, PHM16360-9, PHM521-8, PHM586-10 і PHM289-20

Маркер	Генетичне положення (власна карта одноразового мейозу, сМ)	Генетичне положення (IBM2, сМ)	ID еталонної послідовності	Донорна батьківська Форма "інбред А"	Рекурентна батьківська форма "інбред В"	Положення SNP в еталонній послідовності
PHM6764-7	94,78	261,3	SEQ ID NO:1	A	G	150
PHM16360-9	104,12	287,0	SEQ ID NO:2	G	C	231
PHM521-8	108,38	299,3	SEQ ID NO:3	T	C	244
PHM586-10	111,72	304,3	SEQ ID NO:4	T	C	114
PHM289-20	113,94	331,3	SEQ ID NO:5	C	T	121

Таблиця 2

Показники в балах сірої плямистості листа для кожного генотипового класу в області QTL

	Рослини	Показник GLS в балах
Рекурентна батьківська форма	187	4,64 (0)
Донорна батьківська форма	165	5,26 (+0,62)
Гетерозиготи	482	5,44 (+0,79)

ПРИКЛАД 2.

ДОДАТКОВЕ УТОЧНЕННЯ QTL

Ті самі способи застосовували для оцінки окремих рослин BC₂, одержаних від 3 додаткових рекурентних батьківських форм (PH18F6 (див. US 8766059), PH18G5, див. US 8304633) і третя пропріетарна інбредна лінія, позначувана в даному документі як "інбред С"), щоб визначити ефект донорної батьківської форми ("інбред А") у різних генетичних фонах. У всіх популяціях застосовували додаткові маркери в ділянці 108-114 сМ (299-331 сМ у випадку карти IBM2). Застосовувані маркери і генотипи кожної рекурентної батьківської форми й донорної батьківської форми наведені в таблиці 3. Деякі з-поміж цих маркерів є мономорфними для деяких комбінацій донорна/рекурентна батьківська форма. Це тестування знову показало відмінності між рослинами з однією копією алеля донорної батьківської форми й рослинами з двома копіями алеля рекурентної батьківської форми (таблиця 4). Відмінності варіювалися в діапазоні від 1,5 бала до 2,5 бала за шкалою від 1 до 9. Сприйнятливі рекурентні батьківські форми характеризувалися показниками в діапазоні від 3,7 до 4,3.

Таблиця 3

Маркери й генотипи донорних і рекурентних батьківських форм

Маркер	Генетичне положення (власна карта одноразового мейозу, сМ)	Генетичне положення (IBM2, сМ)	Номер ID еталонної послідовності	Інбред А	Інбред С	PH18F6	PH18G5	Положення SNP в еталонній послідовності
PHM521-8	108,38	299,9	SEQ ID NO:3	T	C	C	C	244
PHM12024-9	109,01	299,9	SEQ ID NO:6	G	C	C	C	190
PHM199-23	110,5	304,3	SEQ ID NO:7	T	A	T	T	243
PHM586-10	111,72	304,3	SEQ ID NO:4	T	C	T	T	114
PHM1963-15	111,72	304,3	SEQ ID NO:8	C	C	T	T	71
PHM15534-13	111,88	304,3	SEQ ID NO:28	C	T	T	T	50
PHM18451-2	113,64	330,4	SEQ ID NO:9	G	A	A	A	233
PHM289-20	113,94	331,3	SEQ ID NO:5	C	T	T	T	121

Таблиця 4

Показники в балах сірої плямистості листя для кожного генотипового класу в області QTL

Інбред С<[інбред А]	GLFSPT	Відмінність у показниках	GDUSLK	Поширеність
Алень RP у ділянці	4,1		141,1	49
Het у ділянці	6,6	2,5	139,8	17
PH18F6<[інбред А]				
Алень RP у ділянці	3,7		138,7	45
Het у ділянці	5,9	2,2	139,1	39
PH18G5<[інбред А]				
Алень RP у ділянці	4,3		141,4	64
Het у ділянці	5,8	1,5	141,9	22

RP=рекурентна батьківська форма

Het=гетерозигота

Здійснювали додатковий аналіз ділянки навколо PHM586-10, оскільки вона розташована близько до QTL, ідентифікованого в патентній заявці US 2009172845. Інбред А і PHJEP (у патентній заявці US 2009172845) мають різні поліморфізми в PHM1963-15 у положенні 111,72 сМ (власна карта, 304,3 сМ на карті IBM2). Крім того, додатковий аналіз маркерів поблизу

пікового маркера (таблиця 5) показує, що інбред А і РНЖЕР відрізняються в цій ділянці, вказуючи на те, що інбред А являє собою нове джерело стійкості.

Таблиця 5

Аналіз маркерів поряд із піковим маркером

Маркер	Seq ID NO еталонної послідовності	Генетичне положення (власна карта одноразового мейозу, сМ)	Генетичне положення (IBM2, сМ)	Положення SNP в еталонній послідовності	Інбред А	РНЖЕР
PZE-104068674	SEQ ID NO:10	111,45	304,3	51	A\A	ANA
SYN25809	SEQ ID NO:11	111,52	304,3	61	C\C	T\T
PZE-104069351	SEQ ID NO:12	111,55	304,3	51	G\G	A\A
PZE-104069548	SEQ ID NO:13	111,57	304,3	51	A\A	A\A
PZE-104069570	SEQ ID NO:14	111,59	304,3	51	A\A	G\G
PZE-104069652	SEQ ID NO:15	111,62	304,3	51	T\T	C\C
SYN21168	SEQ ID NO:16	111,68	304,3	61	G\G	T\T
SYN4720	SEQ ID NO:17	111,72	304,3	61	G\G	A\A
SYN4714	SEQ ID NO:18	111,74	304,3	61	T\T	T\T
PZE-104070450	SEQ ID NO:19	112,5	323,2	51	C\C	G\G

Таблиця 6

Маркерні гаплотипи в поточному інтервалі картування з показниками GLS для кожного гаплотипу й рекомбінантів.

ID рослини	PHMGL S_01	PHMGL S_07	PHMGL S_14	PHMGL S_19	PHMGL S_21	PHMGL S_45	PHMCO 01YAR	PHM50 1 3-12	Положення на хромосомі 4 згідно і Blur
Донорна батьківська форма	T	C	G	C	C	C	A	C	
Інбред С	A	T	A	T	T	T	G	T	-
419	T	C	G	C	C	C	A	C	5,73
373	T	C	G	C	C	C	A	C	5,22
312	T	C	G	C	C	C	A	C	5,62
316	T	C	G	C	C	C	A	C	5,5
256	T/A	C/T	G/A	C/T	C	C	A	C	5,68
253	T	C	G	C	C	C	A	C	5,09
207	T	C	G	C	C	C	A	C	5,44
211	T	C	G	C	C	C	A	C	5,08
159	T	C	G	C	C	C	A	C	5,43
103	T	C	G	C	C	C	A	C	5,87
86	T	C	G	C	C	C	A	C	5,08
Середнє значення класу	-								5,43
223	T	C	G	C	C	C	G	T	5,65
121	A	T	A	T	C	C	A	C	5,84
120	A	T	A	T	C	C	A	C	5,79
	-	-	-	-	-	-	-	-	

Маркерні гаплотипи в поточному інтервалі картування з показниками GLS для кожного гаплотипу й рекомбінантів.

ID рослини	PHMGL S_01	PHMGL S_07	PHMGL S_14	PHMGL S_19	PHMGL S_21	PHMGL S_45	PHMCO 01YAR	PHM50 1 3-12	Положення на хромосомі 4 згідно і Blup
239	A	T	A	T	T	T	G	T	4,58
270	A	T	A	T	T	T	G	T	4,37
406	A	T	A	T	T	T	G	T	4,76
282	A	T	A	T	T	T	G	T	4,15
47	A	T	A	T	T	T	G	T	4,48
46	A	T	A	T	T	T	G	T	4,4
31	A	T	A	T	T	T	G	T	4,2
9	A	T	A	T	T	T	G	T	4,61
391	A	T	A	T	T	T	G	T	3,64
Середнє значення класу									4,35

<110> ПІОНІР ХАЙ-БРЕД ІНТЕРНЕСНЛ, ІНК.

<120> Способи одержання маїсу, стійкого до сірої плямистості листя

5

<130> BV2457-WO-PCТ

<160> 28

10

<150> 62/360585

<151> 2016/07/11

<170> PatentIn версія 3.5

15

<210> 1

<211> 374

<212> ДНК

<213> Штучна

20

<220>

<223> Еталонна послідовність PHM6764-7

<220>

<221> іншаознака

25

<222> (103) .. (103)

<223> n являє собою a, c, g або t

<220>

<221> інша_ознака

30

<222> (210) .. (211)

<223> n являє собою a, c, g або t

<220>

<221> інша_ознака

35

<222> (222) .. (222)

<223> n являє собою a, c, g або t

<220>

<221> інша_ознака

40

<222> (238) .. (239)

<223> п являє собою а, с, г або т

<220>

<221> інша_ознака

5 <222> (316) .. (316)

<223> п являє собою а, с, г або т

<400> 1

сacagccagc agagttccag aggtgatgg tcccctttt tgcicagatt tcccgatgtt
60

taagcagltc tcactttcag gfaagaaag atagcagact gcnagttaca caatataaat
120

atagtatatt tacttgthaa tagtcaotr aagttotcat cticaaattt atcattgatt
180

tctgccttat tgettggac atgatgactn natcathtat lngtttataa gtgcagnoa
240

actaagctgt agcaagpgat aggtgtaaag cgcatactac tatittgttg atgttgatac
300

scaaatagta atattnacct ttctagctgc cacttacaca tgatgacatg ttagtagtgt
360

gggaactttg tcca
374

10

<210> 2

<211> 362

<212> ДНК

15 <213> Штучна

<220>

<223> Еталонна послідовність РНМ16360-9

20

<220>

<221> інша_ознака

<222> (15) .. (15)

<223> п являє собою а, с, г або т

25

<220>

<221> інша_ознака

<222> (24) .. (24)

<223> п являє собою а, с, г або т

30

<220>

<221> інша ознака

<222> (108) .. (108)

<223> п являє собою а, с, г або т

35

<220>

<221> інша_ознака

<222> (172) .. (173)

<223> п являє собою а, с, г або т

40

<220>

<221> інша_ознака

<222> (179) .. (179)

<223> п являє собою а, с, г або т

<220>

<221> інша_ознака

5 <222> (187) .. (187)

<223> п являє собою а, с, г або т

<220>

<221> інша_ознака

10 <222> (346) .. (346)

<223> п являє собою а, с, г або т

<220>

<221> інша_ознака

15 <222> (356) .. (356)

<223> п являє собою а, с, г або т

<400> 2

agatcccgcc acacnnggacc gjanngggcag atggaggagg cgtccaggat cgcctaccctg
60

tgcacnngcgg agctgcccgc caagaggccc gccatgcagc agatcgtngg coltctcaag
120

gacatcgagc cgaaggtgga agaggagggg gactgaaget ctggaggagt gnatccggt
180

gcacctngca gctgtcggg tgggtgtgag atttgtgtag tgcagcgtc agcagggcagg
240

agggtgtga ctgtgagtga gctcgtggtt gttttaccat cgtcagagctc actatgcaat
300

gccttgcctc gcatatctct ttttctctcc tctttctctc cttttaccag cttttctctc
360

gc
362

20

<210> 3

<211> 395

<212> ДНК

25 <213> Штучна

<220>

<223> Еталонна послідовність PHM521-8

30

<400> 3

agtgaqaaaq gaaatcaacc catcttgcag cagcatagtt gcagggagg gcaactgmat
60

cgtctactct tctgatggga agcgggttga gatccccctt tottaccctc acaocggagt
120

gtttgtagag ctactgaagc tctcgcagga agagtttggg ttcaacaagt atgggaggat
180

caactgcct tgcgataaag cagtyatgga gtatgtgatg tgtttgctaa gtagagaagc
240

ctcygaggat gttgagaagg cgtctctcag ttccatagtg aggtottgoc accaccacaa
300

caggatggtg caaccaccaa gtggagtgaa ccaaccctc gctgtgtgca gctcctgaag
360

atgaagatat caaccgcttg gagcttgctt caga
395

- <210> 4
- <211> 374
- <212> ДНК
- <213> Штучна

- <220>
- <223> Еталонна послідовність PHM586-10

<400> 4
gcagctcggc gtcaggtoyt gcccacagtg agcaccgctg ccgcccgatca ctgyccgcta
60
gittacttct tggtytctcg tccccagctc ctgatcggcg tggcgtatgt aacygctgco
120
gtgcgtgtgc aggtgggggt gccccgcccg gaagttcccg gtcgaagtcc acgcccggca
180
gacgtgctac ctgctcaagg gcaaggctgc ggccacatc aaggggtcgt cggagtgzgt
240
ggagttcggc gccggcgacc tegtctctt ccccaggggk ctgagctgca cctgggagct
300
cgccgcggcc gtccacaagt actacaagtt cgaactcgtc tgaacygctga cgcacatcgc
360
tcccgccggg ctcc
374

- <210> 5
- <211> 183
- <212> ДНК
- <213> Штучна

- <220>
- <223> Еталонна послідовність PHM289-20

<400> 5
cgtcatcgag aagaaaagcca aggggacaga agaagaagaa cgtgtgtggg cgtgggagat
60
ggtgagagcca ctcatgaaca aagcgtctac caocatgccc tacctcaacc aatacaaggt
120
yocrgaacct gaacctgaac ctgaaccocat ccttgaact tctgcaactgc agagttctcc
180
gat
183

- <210> 6

<211> 373
 <212> ДНК
 <213> Штучна

5 <220>
 <223> Еталонна послідовність PHM12024-9

<400> 6
 cccctcttgg atgtcgggca tgggaggca tgcacgctcc ttgggacttg taagagttat
 60
 ctgtttttgtt gcttcggggg cccaaaggac gcttccctgc accaictgcc ttigttttgg
 120
 acggctttgg ccgcogtggc ccttttacct gcagcaagga aaggaatggc tgggagggaa
 180
 tggatactga tatcgttcag tgtgtggcag ccctgcatct gtttgccttg cttttatagga
 240
 ggcctggcgt attgccgggt accttgggtt tggagactgc tactgactgc tgmogtctgc
 300
 gggcscgtcc tctcaoctct ggtaatagg accttgtaca caattatctt gttatagcca
 360
 gtatagtac atc
 373

10
 <210> 7
 <211> 350
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Еталонна послідовність PHM199-23

20 <220>
 <221> інша ознака
 <222> (141) .. (141)
 <223> п являє собою а, с, г або t

25 <220>
 <221> інша_ознака
 <222> (144) .. (144)
 <223> п являє собою а, с, г або t

30 <220>
 <221> інша_ознака
 <222> (198) .. (198)
 <223> п являє собою а, с, г або t

35 <220>
 <221> інша_ознака
 <222> (295) .. (295)
 <223> п являє собою а, с, г або t

40 <220>
 <221> інша_ознака
 <222> (326) .. (326)

<223> п являє собою а, с, г або т

<400> 7

ttatcaggtg gcactcctct gcacgcaggg ctcccgttgg agcgtccaaa gatgtcggag
60

gtggtgagga tgctggaagg tgacggcctg gcagagcgtt gggacgaaatg gcagaaagta
120

gaggtggtga ggcaggaggg ngantcggca ccgctccgca atgactggat cgtcgtattcc
180

acgtacaaac ttcgtgcngt ggagctgtcc ggtccaaggt agtagccact ccattgactcc
240

gawgaaagaa ttcaacactg aattgcctag attcagtcct attgctgctt gigtntatga
300

aaggtagctt ttggaattgt tagcgcacgt caatatgaag ggatgttttt
360

5

<210> 8

<211> 361

<212> ДНК

<213> Штучна

10

<220>

<223> Еталонна послідовність РНМ1963-15

15

<220>

<221> інша_ознака

<222> (9) .. (9)

<223> п являє собою а, с, г або т

20

<220>

<221> інша_ознака

<222> (21) .. (21)

<223> п являє собою а, с, г або т

25

<220>

<221> інша_ознака

<222> (125) .. (125)

<223> п являє собою а, с, г або т

30

<220>

<221> інша_ознака

<222> (185) .. (185)

<223> п являє собою а, с, г або т

35

<220>

<221> інша_ознака

<222> (201) .. (201)

<223> п являє собою а, с, г або т

40

<220>

<221> інша_ознака

<222> (215) .. (215)

<223> п являє собою а, с, г або т

45

<220>

<221> інша_ознака

<222> (301) .. (301)
 <223> п являє собою а, с, г або т
 <220>
 <221> інша_ознака
 5 <222> (332) .. (335)
 <223> п являє собою а, с, г або т
 <220>
 <221> інша_ознака
 10 <222> (337) .. (337)
 <223> п являє собою а, с, г або т

 <220>
 <221> інша_ознака
 <222> (345) .. (345)
 15 <223> п являє собою а, с, г або т

<400> 8

```

gggtcttttc gcygyoagtc ncaasetaac cagattttgt gcagctgaac atcaatggaa
60
atcttatctc ygatgaaggg gttgatgagg tgaaggaaat tctgaaggct ggtaagaaat
120
ctctngatgt gctggggccca ctagacgaga atgaaectga tggagagcct gatgatgagg
180
atgcnagaga cgatgaggac nagctggatt teaanctgca gagtgtgaag gttgagcagg
240
atgaggatga ttagcagatcc ttaggttaaa tatcttttagc taotcagtaa tcaattggat
300
ntccatgagc tacgcaaaact ttaattaaa annnotntac tgagnctttt gcattgtcct
360
g
361
  
```

20 <210> 9
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Штучна

 25 <220>
 <223> Еталонна послідовність PHM18451-2

 <400> 9

ataaaatagc tacttcattt aagtaagcgc caagagattg aaggattaat ggtggccata
60

actttatgca gaatttcatt gccatgatct taccagtcac aagtgttacc ccattgttgc
120

aacttggcat aatcgttgac ctggaagttt aacggttgaa ccaggyaccg gcatgcagct
180

ccatttcitt tttaggtgtg gccatggat caaagagcag cgcctgtggt ggcattttt
240

accttctctt tggtttaggt gaaagttgga cctctgttagc tggagctctt agcaggttagc
300

cagttttwat ttctgataag tttttaggea agttgtaagt tgtagccaca aatcgatcac
360

tlg
363

- <210> 10
- <211> 101
- <212> ДНК
- <213> Штучна

- <220>
- <223> Еталонна послідовність PZE-104068674

<400> 10
caagcagggag cgaatgggcac ctccaccggag aacatgaatt atgtgaccocg rccaccataa
60
tccaaatcta acagacgcta ctggaagtaa ggaagacaaat a
101

- <210> 11
- <211> 121
- <212> ДНК
- <213> Штучна

- <220>
- <223> Еталонна послідовність SYN25809

<400> 11
gaatcacaaa atctttgcac cttaacactc agctcggggtt gaaccagagg ccgcccagtcg
60
ygctgttcat gtggtgcccg ttccogtgca tccctgcacc gtttgggtgac attggggatg
120
c
121

- <210> 12
- <211> 101
- <212> ДНК
- <213> Штучна

<220>

<223> Еталонна послідовність PZE-104069351

<400> 12

gtgtcttact agtaggetct atatatgegt ggtgtgggct gccgtgccgt rccatcactg
60

ctctctctgcc ctctctcttta taaacagcgc gcaaccgagg a
101

5

<210> 13

<211> 101

<212> ДНК

<213> Штучна

10

<220>

<223> Еталонна послідовність PZE-104069548

<400> 13

attacgatgg ggaatccag gggcgaccgc ttctaatct tctctcactc rggggccgcg
60

cagaccacga gggcgttcca cctgcaccgc ttacttccgg g
101

15

<210> 14

<211> 101

<212> ДНК

<213> Штучна

20

<220>

<223> Еталонна послідовність PZE-104069570

<400> 14

cagctgccag accgtaaccg cctcagggctc ctccctgcga aactgttttt aaatcccta
60

gggcctcact tgcacgttta gcatccaaact ttcagtttc a
101

25

<210> 15

<211> 101

<212> ДНК

<213> Штучна

30

<220>

<223> Еталонна послідовність PZE-104069652

<400> 15

aggcctttat tgagatcact ttctctctac ctccaaccgc agcctttccc yagtcactgt
60

ggctgactag agtgcacttc tggctgactc gaggcagggt c
101

35

<210> 16

<211> 121

<212> ДНК

<213> Штучна

40

<220>
 <223> Еталонна послідовність SYN2116
 8

5 <220>
 <221> інша_ознака
 <222> (83) .. (83)
 <223> п являє собою а, с, г або т

<400> 16
 tcttatctccc tccctgcgggc gactccgagc agaaccccaac ataggctcgtt tctccgcaga
 60
 katcatgacc aatccaggcg gccngtgacgt tcttggggctc gctaatgatg gtgtttcttga
 120
 #
 121

10
 <210> 17
 <211> 121
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Еталонна послідовність SYN4720

20 <400> 17
 tttctctgaa gggatgatca gtggcgttat attraatatta ctgatgatgt cggggatggt
 60
 ragcccgctc gagaagcggc ccgctggcttg gtccgctgggg aagtcgatgc cctagggggg
 120
 c
 121

25 <210> 18
 <211> 121
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Еталонна послідовність SYN4714

30 <400> 18
 gccacagcatc tccctcttct caaacgggct atccatttt ccaaacagca tccgactcct
 60
 ytcgaaactt ctaccagga tcccgcgaa ctctcagca gtattggctg gagagaccct
 120
 a
 121

35 <210> 19
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Еталонна послідовність PZE-104070450

5 <220>
 <221> інша_ознака
 <222> (51) .. (51)
 <223> п являє собою а, с, г або т

<400> 19
 acaatttgggt taactcagta accgtatgct cgtatgtatg ctgttttagta notacatgtg
 60

10 atgtgcttca gttcgttgggt ttctgcttct gctcttcctt g
 101

<210> 20
 <211> 102
 <212> ДНК
 <213> Штучна

15 <220>
 <223> Еталонна послідовність PHMGLS_01

20 <220>
 <221> інша_ознака
 <222> (51) .. (51)
 <223> п являє собою а, с, г або т

<400> 20
 actgatagga gccgatgccg aaaaccatt ctctatgcat cctacttgat ngctaogtat
 60

25 atatgccaga actggatgga tccatggatg gatggcatt gt
 102

30 <210> 21
 <211> 102
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Еталонна послідовність PHMGLS_07

35 <220>
 <221> інша_ознака
 <222> (51) .. (51)
 <223> п являє собою а, с, г або т

40 <400> 21
 tttaaaactg aattctact acatttgggt tatgtacctg ccctaagatg nctttctcg
 60

ctcagcctc cactagcaat ccagccgtga gtcctatcac tg
 102

45 <210> 22
 <211> 102
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Еталонна послідовність PHMGLS_14

5 <220>
 <221> інша-ознака
 <222> (51) .. (51)
 <223> п являє собою а, с, г або т

<400> 22
 agcaggagga gcsagaagaa caagagggctg agagaggagg aatcgacgoc nagaagcaga
 60
 gaccgggtgga gcaagccatt ctggctgccc ccgctccct gg
 102

10 <210> 23
 <211> 102
 <212> ДНК
 15 <213> Штучна

<220>
 <223> Еталонна послідовність PHMGLS_19

20 <220>
 <221> інша_ознака
 <222> (51) .. (51)
 <223> п являє собою а, с, г або т

25 <400> 23
 gaaacaactc ccaataccac tgattggaca cclattgtca cgcattgctg ttigtggat
 60
 aaaaagucato aagaacaaac aacagttgtg ctaccgctga gc
 102

30 <210> 24
 <211> 102
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Еталонна послідовність PHMGLS_21

35 <220>
 <221> інша_ознака
 <222> (51) .. (51)
 <223> п являє собою а, с, г або т

40 <400> 24
 tacagtcctg tttgaacggt atttttctag gctggacaga tggccacac nagatataat
 60
 gactctactg atttatctag atcgtcccaa gggastaatc at
 102

45 <210> 25
 <211> 102
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Еталонна послідовність PHMGLS_45

5 <220>
 <221> інша_ознака
 <222> (51) .. (51)
 <223> п являє собою а, с, г або т

<400> 25
 tgcctaatca ggcgtcagca gctcaccctg gccggaaacc gccctctacgg ncaggtacc
 60
 gacggcctct gcaagcttgc tgggcccgcg gccgcctctg cc
 102

10 <210> 26
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Еталонна послідовність PHMC001YAR

20 <220>
 <221> інша_ознака
 <222> (5) .. (5)
 <223> п являє собою а, с, г або т

25 <220>
 <221> інша_ознака
 <222> (51) .. (51)
 <223> п являє собою а, с, г або т

30 <400> 26
 aagantagcc tgcataaccca yttcttgcct tctcactgga attgtaatac ntgcagaagt
 60
 tgcattctat gagtcgcat ggtataaaaa gtggtagatt g
 101

35 <210> 27
 <211> 99
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Еталонна послідовність PHM5013-12

40 <220>
 <221> інша_ознака
 <222> (50) .. (50)
 <223> п являє собою а, с, г або т

45 <400> 27
 ggcctctccc cttttccggg ttcttcaaca gcttcgacgy cgcggatttc gacgacgacg
 60
 accctgcctg agggaaactc cccccgttc ggtaacgga
 99

<210> 28
 <211> 99
 <212> ДНК
 5 <213> Штучна

 <220>
 <223> Еталонна послідовність PHM15534-13

 10 <220>
 <221> інша_ознака
 <222> (50) .. (50)
 <223> п являє собою а, с, г або т

 15 <400> 28
 aaagtttgcgat gaagtatatt tatgcctggt tgtggtcaaa actaacatcc taataattgt
 50
 gcttcctcctt ccatacgcag ttaigatcac tcgattcag
 99

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

- 20 1. Спосіб ідентифікації та/або відбору рослини маїсу, яка виявляє підвищену стійкість до сірої плямистості листя, причому вказаний спосіб передбачає: а) виявлення в рослині маїсу алеля QTL, що містить:
- i) "С" в нуклеотидному положенні 71 PHM1963-15 (SEQ ID NO: 8);
 - ii) "Т" в нуклеотидному положенні 244 PHM521-8 (SEQ ID NO: 3);
 - 25 iii) "G" в нуклеотидному положенні 190 PHM12024-9 (SEQ ID NO: 6);
 - iv) "Т" в нуклеотидному положенні 243 PHM199-23 (SEQ ID NO: 7);
 - v) "Т" в нуклеотидному положенні 51 PHMGLS_01 (SEQ ID NO: 20);
 - vi) "С" в нуклеотидному положенні 51 PHMGLS_07 (SEQ ID NO: 21);
 - vii) "G" в нуклеотидному положенні 51 PHMGLS_14 (SEQ ID NO: 22);
 - 30 viii) "С" в нуклеотидному положенні 51 PHMGLS_19 (SEQ ID NO: 23);
 - ix) "С" в нуклеотидному положенні 51 PHMGLS_21 (SEQ ID NO: 24);
 - x) "С" в нуклеотидному положенні 51 PHMGLS_45 (SEQ ID NO: 25);
 - xi) "Т" в нуклеотидному положенні 114 PHM586-10 (SEQ ID NO: 4);
 - xii) "G" в нуклеотидному положенні 233 PHM18451-2 (SEQ ID NO: 9) і
 - 35 xiii) "С" в нуклеотидному положенні 121 PHM289-20 (SEQ ID NO: 5),
де вказаний алель QTL розташований на хромосомі 4 в інтервалі, що є заданим і включає PHM6764-7 (SEQ ID NO: 1) і PHM289-20 (SEQ ID NO: 5); і
- b) відбір вказаної рослини маїсу, яка має алель QTL.
- 40 2. Спосіб за п. 1, де вказаний алель QTL розташований на хромосомі 4 в інтервалі, що є заданим і включає PHM521-8 (SEQ ID NO: 3) і PHM18451-2 (SEQ ID NO: 9).
3. Спосіб за п. 1, де виявлення передбачає виявлення в рослині маїсу кожного з:
- i) "Т" в нуклеотидному положенні 244 PHM521-8 (SEQ ID NO: 3);
 - ii) "G" в нуклеотидному положенні 190 PHM12024-9 (SEQ ID NO: 6);
 - iii) "Т" в нуклеотидному положенні 243 PHM199-23 (SEQ ID NO: 7);
 - 45 iv) "Т" в нуклеотидному положенні 51 PHMGLS_01 (SEQ ID NO: 20);
 - v) "С" в нуклеотидному положенні 51 PHMGLS_07 (SEQ ID NO: 21);
 - vi) "G" в нуклеотидному положенні 51 PHMGLS_14 (SEQ ID NO: 22);
 - vii) "С" в нуклеотидному положенні 51 PHMGLS_19 (SEQ ID NO: 23);
 - viii) "С" в нуклеотидному положенні 51 PHMGLS_21 (SEQ ID NO: 24);
 - 50 ix) "С" в нуклеотидному положенні 51 PHMGLS_45 (SEQ ID NO: 25);
 - x) "Т" в нуклеотидному положенні 114 PHM586-10 (SEQ ID NO: 4);
 - xi) "С" в нуклеотидному положенні 71 PHM1963-15 (SEQ ID NO: 8);
 - xii) "G" в нуклеотидному положенні 233 PHM18451-2 (SEQ ID NO: 9); і
 - xiii) "С" в нуклеотидному положенні 121 PHM289-20 (SEQ ID NO: 5).

55

