

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 036362

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.30

(21) Номер заявки
201690508

(22) Дата подачи заявки
2014.09.03

(51) Int. Cl. *A01H 1/04* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(54) РАСТЕНИЕ, УСТОЙЧИВОЕ К ГЕЛЬМИНТОСПОРИОЗУ

(31) 10 2013 014 637.2; 10 2014 005 823.9

(32) 2013.09.04; 2014.04.24

(33) DE

(43) 2016.11.30

(86) PCT/EP2014/002386

(87) WO 2015/032494 2015.03.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КВС ЗААТ СЕ (DE); УНИВЕРЗИТЕТ
ЦЮРИХ (CH)

(72) Изобретатель:
Озунова Милена, Шойрманн Даниела
(DE), Келлер Беат, Краттингер Симон,
Викер Томас, Херрен Герхард, Харни
Северин (CH), Кессель Беттина,
Престерл Томас, Кнаак Карстен (DE)

(74) Представитель:
Емельянова В.А., Вашук Т.В.,
Королева С.В., Кудашов В.И. (BY)

(56) GEVERS H.O.: "A NEW MAJOR GENE FOR RESISTANCE TO HELMINTHOSPORIUM-TURCICUM LEAF BLIGHT OF MAIZE", PLANT DISEASE REPORTER, WASHINGTON, DC, US, vol. 59, no. 4, 1 January 1975 (1975-01-01), pages 296-299, XP009181291, ISSN: 0032-0811, cited in the application, page 297, paragraph 1 - paragraph 3; tables

Chia-Lin Chung ET AL.: "Analysis of qEt8.06, a Major QTL for Resistance to Northern Leaf Blight in Maize", Annual Research Meeting of Generation Challenge Program, 1 January 2008 (2008-01-01), XP055154340, Bangkok, Thailand, Retrieved from the Internet: URL: http://www.plantpath.cornell.edu/labs/nelson_r/Docs/01_CLC_08GCP_12Sep08_2.pdf [retrieved on 2014-11-21], cited in the application the whole document

CHIA-LIN CHUNG ET AL.: "Characterization and fine-mapping of a resistance locus for northern leaf blight in maize bin 8.06", THEORETICAL AND APPLIED GENETICS; INTERNATIONAL JOURNAL OF PLANT BREEDING RESEARCH, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 121, no. 2, 9 March 2010 (2010-03-09), pages 205-227, XP019836046, ISSN: 1432-2242, cited in the application, page 216, column 2, paragraph 1 - page 218, column 1, paragraph 1; figure 4

WO-A1-2011163590
WO-A1-2008034648

(57) Изобретение обеспечивает улучшенное растение, устойчивое к *Helminthosporium turcicum*, в частности растение кукурузы, которое содержит полинуклеотид, имеющий один или несколько придающих устойчивость генов, например на усеченном фрагменте хромосомы исходного сорта *Peritilla*, а также его клетку, ткань, часть, зерно или семена, выделенный полинуклеотид, содержащий один или несколько генов, придающих устойчивость к *Helminthosporium turcicum*, вектор, трансгенную клетку растения и трансгенное растение, содержащее этот полинуклеотид. Изобретение также касается подходящих маркеров и их использования для интродукции устойчивости или трансгена в растение, а также для идентификации улучшенных растений кукурузы, содержащих укороченный фрагмент хромосомы.

B1

036362

036362 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение касается модификации растений с использованием методов молекулярной биологии и маркерных технологий, а также генетической инженерии. Оно обеспечивает новое растение, устойчивое к *Helminthosporium turcicum*, в частности растение кукурузы, которое содержит полинуклеотид, имеющий один или несколько придающих устойчивость генов на модифицированном фрагменте хромосомы исходного сорта *Peritilla*, а также его клетку, ткань, часть, зерна или семена, выделенный полинуклеотид, содержащий один или несколько генов, придающих устойчивость к *Helminthosporium turcicum*, вектор, клетку трансгенного растения и трансгенное растение, содержащее этот полинуклеотид. Изобретение также касается подходящих молекулярных маркеров и их использования для вставки локуса устойчивости или трансгена в растение, а также для идентификации улучшенных растений кукурузы, содержащих модифицированный фрагмент хромосомы.

Предпосылки создания изобретения

Существует большое количество грибных патогенов, вызывающих заболевание листьев у кукурузы (*Zea mays* L.). К известным грибам, способным причинять наибольший урон в условиях как тропического, так и умеренного климата, такого как на большей части Европы и Северной Америки, а также Африки и Индии, относится грибок *Helminthosporium turcicum*, синонимы: *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard и Suggs (теломорфа: *Setosphaeria turcica* (Luttrell) Leonard и Suggs). *H.turcicum* является возбудителем гельминтоспориозной пятнистости листьев, известной также как "северный гельминтоспориоз листьев кукурузы" (NCLB). Заболевание может приобретать эпидемические пропорции во влажные годы, поражая чувствительные сорта кукурузы и нанося большой урон, при этом потери урожая могут достигать 30% и более на больших площадях (Perkins и Pedersen, 1987; Raymundo и Hooker, 1981a; Ullstrup и Miles, 1957). С 1970-х годов ведется поиск природных механизмов устойчивости в генетическом материале. В настоящее время известны качественные и количественные признаки устойчивости. В то время как олиго- или полигенно наследуемая качественная устойчивость представляет собой неполную и неспецифическую устойчивость, что касается расы фенотипа, и контролируется дополнительными и частично доминантными генами, количественная устойчивость является, как правило, расоспецифической и может наследоваться посредством отдельных, по большей части доминантных генов, таких как Ht1, Ht2, Ht3, Htm1 или Htn1 (Lipps и соавт., 1997; Welz и Geiger, 2000). При возвратных скрещиваниях многих часто используемых инбредных линий кукурузы, таких как W22, A619, B37 или B73, происходит успешная интрогрессия HT-генов, при этом их частичное доминирование и экспрессия проявляются как функция соответствующего генетического фона (Weiz, 1998).

Несмотря на такую сложную генетическую архитектуру устойчивости кукурузы к NCLB до настоящего времени преимущественное использование в кукурузе гена Ht1 с частичной количественной устойчивостью было достаточным для контроля гельминтоспориоза (Weiz, 1998). Это вызвано тем, что использование расы 0 *H.turcicum* является доминирующим в мировом масштабе (приблизительно 55%) (Lipps и соавт., 1997; Ferguson и Carson, 2007), в то время как другие расы, такие как 2N и 23N, используются крайне редко и при этом географическая зона их использования также весьма ограничена (Moghaddam и Pataky, 1994; Jordan и соавт., 1983; Lipps и Hite, 1982; Thakur и соавт., 1989; Weiz, 1998). Раса 0 является авирулентной, что касается растения кукурузы с Ht1, поэтому при придании ему подходящей количественной устойчивости оно проявляет достаточную общую устойчивость к NCLB. Тем не менее, многочисленные исследования свидетельствуют об увеличении диссеминации менее распространенных рас (Jordan и соавт., 1983; Weiz, 1998; Pratt и Gordon, 2006). Это связано с изменчивостью популяций патогена, приводящей к изменениям вирулентности патогена за счет новых мутаций генов авирулентности и новых комбинаций имеющихся генов вирулентности. В конечном итоге это может приводить к появлению новых, подходящих, иногда более агрессивных патогенных рас. Например, в Бразилии популяция *H.turcicum* уже характеризуется значительно большим разнообразием расового состава, чем, например, в Северной Америке. Gianasi и соавт. (1996) опубликованы данные о расах *H.turcicum*, которые уже способны подавлять устойчивость, придаваемую геном Ht1. Кроме того, отмечается нестабильность генов устойчивости под действием определенных факторов окружающей среды, таких как температура и интенсивность света в некоторых климатических зонах (Thakur и соавт., 1989). В результате такого положения вещей в мире растет важность использования новых HT-генов устойчивости или таких генов, которым до настоящего времени уделялось мало внимания при создании коммерческих сортов кукурузы, с целью получения кукурузы с более широкой и более длительной устойчивостью к *H.turcicum*. Первоначальные попытки в этом направлении были предприняты Pataky и соавт. еще в 1998 г. Устойчивость к NCLB элитной кукурузы типа sh2 была улучшена путем комбинации генов Ht1 и Htn1.

Источником моногенной устойчивости Htn1 является местный сорт кукурузы Мексики "*Peritilla*" (Gevers, 1975). У интрогрессивных линий с Htn1 ген картируется на длинном плече хромосомы 8 на расстоянии около 10 сМ от Ht2 и на расстоянии 0,8 сМ от RFLP-маркера *umc117* (бин 8,06) (Simcox и Bennetzen, 1993). В отличие от обычных HT-генов устойчивости Htn1 придает устойчивость, которая обеспечивает задержку наступления споруляции, и, таким образом, предотвращает развитие поражений. В результате число поражений и их размер уменьшаются, а также уменьшается объем споруляции (Raymundo и соавт., 1981b; Simcox и Bennetzen, 1993). Хлоротичные и некротические поражения, которые

имеют место при таких придающих устойчивость генах, как Ht1, Ht2 или Ht3, не образуются (Gevers, 1975). Однако реакция устойчивости гена Htn1 в гетерозиготном состоянии значительно менее эффективна, чем в гомозиготном состоянии (Raymimdo и соавт., 1981b).

Развитие дополнительных специфических маркеров, способных еще более упростить процесс определения генотипа, улучшило бы управляемость действия гена Htn1 при скрещивании. Таким образом, технология маркер-опосредованной (MAS) селекции делает возможным эффективный стэкинг или пирамидирование нескольких генов устойчивости (Min и соавт., 2012). Во многих исследованиях по картированию локуса устойчивости и идентификации источника устойчивости применялись интрогрессивные линии B37Htn1 или W22Htn1 (Raymimdo и соавт., 1981b; Simcox и Bennetzen, 1993; Bar-Zur и соавт., 1998; Coates и White, 1998). Однако имеющаяся информация о маркерах, которые можно было бы использовать для отбора локуса Htn1 устойчивости из исходного сорта Pepitilla, до сих пор весьма ограничена (Simcox и Bennetzen, 1993). Известные функциональные маркеры Htn1, которые фланкируют locus устойчивости из исходного сорта Pepitilla, все еще картируются на расстоянии около 22,2 сМ друг от друга, что при наилучшем сценарии развития событий позволяет осуществлять отбор большого фрагмента хромосомы. Однако часто есть риск того, что внутри этого фрагмента между маркерами может происходить двойная генетическая рекомбинация, что будет приводить к ложно позитивному отбору локуса Htn1 устойчивости. Более того, в некоторых случаях в зависимости от размера интрогрессируемого фрагмента хромосомы возрастает вероятность внедрения в интрогрессивные линии нежелательных генетических участков и их передачи последующим поколениям элитных линий. Такие генетические участки, особенно если они тесно сцеплены с локусом Htn1 и оказывают явно негативное воздействие на проявление одного или нескольких агрономических признаков, известны как сцепленное наследование генов. Из результатов проведенных исследований, в ходе которых изучались интрогрессивные линии с Htn1 из Pepitilla, такое негативное воздействие неизвестно. Даже всеобъемлющие научные исследования, осуществленные Weiz (1998), в ходе которых, помимо прочего, изучалась линия B37Htn1, постулировали, что, например, в отношении созревания и урожайности интрогрессия локуса Htn1 не оказывала значительного воздействия. Таким образом, из предшествующего уровня техники следует, что в прошлом серьезных попыток преднамеренно уменьшить большой размер фрагмента хромосомы не предпринималось.

В международной публикации WO 2011/163590 раскрывается генотип PH99N в качестве альтернативного источника устойчивости к NCLB на хромосоме 8 (бин 5), который, однако, не соответствует исходному сорту Pepitilla. Как правило, у популяций в потомстве от возвратного скрещивания PH99N идентифицировалась устойчивость, касающаяся только рас 0 и 1 *H. turcicum*. Даже фенотип устойчивости четко не определялся. Тем не менее, авторы пришли к выводу, что устойчивость вызывалась геном Htn1. Однако locus устойчивости в PH99N ограничивался только фрагментом хромосомы длиной ~224 Кб. Устойчивое растение кукурузы, содержащее фрагмент длиной 224 Кб и, таким образом, предполагаемый ген Htn1, в данной публикации не раскрывается. Более того, генотип PH99N не был доведен до всеобщего сведения путем депонирования.

Альтернативный подход, чтобы сделать ген Htn1 полезным, заключается в идентификации и клонировании гена устойчивости и его использовании в стратегии создания трансгенного растения.

С целью идентификации гена устойчивости к NCLB в 2010 году Chung и соавт. опубликовали исследование по тонкому картированию локуса устойчивости (бин 8,06). Однако исследуемый фрагмент хромосомы был взят не из Pepitilla, а из гибрида кукурузы DK888, который проявлял множественную устойчивость к болезням. Исследования расовой специфичности *Helminthosporium* с самого начала показали, что locus устойчивости в DK888, обозначенный как qNLB8.06_{dk888}, был тесно связан или функционально связан с генами Ht2 и Htn1, так как штаммы 23 и 23N *Helminthosporium* были вирулентными (Chung и соавт., 2008). Детекция присутствия Htn1 не была, однако, позитивной, вследствие отсутствия чистого N-изолята *H. turcicum*. Более того, фенотип устойчивости с qNLB8.06_{dk888} не соответствовал ожидаемому фенотипу в том, что касалось появления хлоротичных поражений и задержки образования поражений. Более подробные дополнительные исследования Chung и соавт. (2010) в конечном итоге показали, что qNLB8.06_{dk888} был идентичным, аллельным, тесно связанным или функционально связанным с Ht2, а не с Htn1. Locus устойчивости qNLB8.06_{dk888} мог располагаться на фрагменте хромосомы размером 0,46 Мб. Аннотации генома этого фрагмента хромосомы косвенно указывали на наличие 12 потенциальных открытых рамок считывания, три из которых могли быть, соответственно, тандемным протеинкиназа-подобным геном (GRMZM2G135202; GRMZM2G164612) или протеинфосфатаза-подобным геном (GRMZM2G119720), при этом каждый из них в равной степени мог быть потенциальным геном-кандидатом гена устойчивости Ht2 (Chung и соавт., 2010). Сведения о функциональной оценке не описывались.

В международной публикации WO 2011/163590 A1 предполагаемый ген Htn1 в источнике устойчивости PH99N также аннотирован как тандемный протеинкиназа-подобный ген (GRMZM2G451147) и раскрыта его генетическая последовательность, однако опять не определена его функциональность, например, в трансгенном растении кукурузы.

Описание изобретения

Изобретение основывается на предшествующем уровне техники, описанном выше. Целью изобретения является растение кукурузы, обладающее устойчивостью к патогену *Helminthosporium turcicum* донорного сорта *Peritilla*, в котором агрономические признаки известных сортов кукурузы могут совмещаться с устойчивостью донорного сорта *Peritilla*.

С одной стороны, цель изобретения достигается путем получения растения кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы донорного сорта *Peritilla*, характеризующееся тем, что фрагмент хромосомы содержит интервал донора (далее - первый интервал или интервал 1), который проявляет донорные аллели в соответствии с гаплотипом, представленным в табл. 2, и полинуклеотид, который придает устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы, при этом фрагмент хромосомы не содержит еще один интервал донора (далее - второй интервал или интервал 2) между маркером в первом маркерном участке (M1), который фланкирован маркерами SYN14136 и PZE-108076510, и маркером во втором маркерном участке (M2), который фланкирован маркерами SYN24931 и PZE-108077560. Эти и альтернативные решения проблемы, описанные ниже, могут основываться на программе скрещиваний по интеграции локуса *Htn1* из *Peritilla* в линии кукурузы. Для создания растений по данному изобретению могут также выбираться подходы генетической инженерии. Примеры стратегий генетической инженерии более подробно описаны ниже. Чтобы создать растения по данному изобретению, можно использовать различные генотипы, известные из предшествующего уровня техники. В частности, B37PTN1, включающий locus устойчивости местного сорта "Peritilla", был использован в качестве исходной линии. Кроме непосредственно *Peritilla* и B37HTN1 (также известного из предшествующего уровня техники как B37HtN), практически любой генотип кукурузы может быть задействован для интеграции локуса *Htn1* с целью получения растения кукурузы по данному изобретению, в геном которого, в частности, на хромосоме 8 (бин 5 или 6), путем интрогрессии встроен locus *Htn1* устойчивости *Peritilla*. В этом отношении из предшествующего уровня техники известны многочисленные примеры генотипов, например W22Htn (Bar-Zur и соавт., 1998), H6314Htn (Bar-Zur и соавт., 1998), B73HtN (Shimoni и соавт., Journal of Phytopathology 131:4 (1991), 315-321), B68HtN и A632HtN (Carson, Plant Disease 79 (1995), 717-720) и A619HtN (Stankovic и соавт., Genetika 39:2 (2007), 227-240). У растения кукурузы по данному изобретению фрагмент хромосомы происходит из донорного сорта *Peritilla*; в предпочтительном варианте получения растения кукурузы по данному изобретению фрагмент хромосомы происходит из донорного B37HTN1 или иного генотипа кукурузы, указанных выше. Например, B37HTN1 можно заказать в Maize Genetics COOP Stock Center, регистрационный номер 65749.

Фрагмент хромосомы, интегрируемый в геном растения кукурузы по данному изобретению, происходит из донорного сорта *Peritilla*, который, как известно, содержит locus HTN1 устойчивости. Интрогрессия этого локуса устойчивости локализуется на длинном плече хромосомы 8, бин 8,05-8,06. Интегрируемый фрагмент хромосомы содержит первый интервал донора, включающий полинуклеотид, придающий устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы по данному изобретению. Полинуклеотид содержит один или несколько придающих устойчивость генов локуса HTN1 *Peritilla* (табл. 1) или их аллели. В условиях поражения *H.turcicum* гены или аллели генов способны продуцировать устойчивый фенотип, обладающий признаками, типичными для HTN1. Предпочтительно, чтобы полинуклеотид содержал один или несколько придающих устойчивость генов локуса HTN1, предпочтительно из *Peritilla*, выбираемых из RLK1 и EXT1 (см. табл. 1), или их аллелей, которые продуцируют устойчивый фенотип, обладающий признаками, типичными для HTN1 в условиях поражения *H.turcicum*. Наиболее предпочтительно, чтобы полинуклеотид включал нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид согласно SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6 или гомолог полипептида согласно SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6, который продуцирует устойчивый фенотип, обладающий признаками, типичными для HTN1 в условиях поражения *H.turcicum*. Примерами признаков, типичных для HTN1, являются задержка наступления споруляции, уменьшение числа поражений, уменьшение размера поражений, уменьшение объема споруляции и/или отсутствие либо лишь локальное наличие хлоротичных и некротических поражений. Структурная организация полинуклеотида характеризуется тем, что он содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая (a) включает нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 15, (b) включает нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична любой одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 15, предпочтительно по всей ее длине, (c) гибридизуется с комплементарной цепью молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с (a) или (b) в жестких условиях, (d) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 или 16, (e) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична любой одной из аминокислотных последовательностей в соответствии с (d), или (f) включает часть последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с (a)-(e). В предпочтительном варианте осуществления полинуклеотид характеризуется тем, что содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая (aa) включает нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или 5, (bb) включает нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична любой одной из

нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 или 5, предпочтительно по всей ее длине, (cc) гибридизуется с комплементарной цепью молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с (aa) или (bb) в жестких условиях, (dd) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или 6, (ee) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична любой одной из аминокислотных последовательностей в соответствии с (dd), или (ff) включает часть последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с (aa)-(ee). "Часть последовательности молекулы нуклеиновой кислоты", как она здесь используется, может содержать по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или по меньшей мере 100 последовательных нуклеотидов, более того по меньшей мере 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 последовательных нуклеотидов. Полинуклеотид может находиться в гетерозиготном или гомозиготном состоянии в геноме растения кукурузы по данному изобретению. Предпочтительно, чтобы полинуклеотид находился в гомозиготном состоянии.

Таблица 1. Потенциальные гены, придающие устойчивость, локуса HTN1 из Pcpitilla

| Название гена | кДНК SEQ ID NO: | Последовательность белка SEQ ID NO: | Гомологичный ген B73 |
|---------------|--------------------|--|----------------------|
| RLK1 | 1 | 2 | GRMZM2G451147 |
| RLK4 | 3 | 4 | GRMZM2G144028 |
| EXT1 | 5 | 6 | GRMZM2G445338 |
| DUF1 | 7 | 8 | AC209075.3_FG007 |
| ZNF1 | 9 | 10 | GRMZM2G175661 |
| CYT1 | 11 | 12 | GRMZM2G092018 |
| RET1 | 13 | 14 | GRMZM2G091973 |
| HYD | 15 | 16 | GRMZM2G144021 |

Название гена (графа 1); ссылка на соответствующий номер геномной кодирующей последовательности (экзоны) (графа 2); ссылка на соответствующий номер предсказанной аминокислотной последовательности/последовательности белка (графа 3); аннотированный гомологичный ген из B73 референсного генома (графа 4).

Первый интервал во фрагменте хромосомы, проявляющий донорные аллели в соответствии с гаплотипом, представленным в табл. 2, характеризуется последовательностью донорных аллелей в гаплотипе табл. 2, но не ограничивается этой последовательностью донорных аллелей в соответствии с табл. 2. Это означает, что первый интервал проявляет, по меньшей мере, донорный аллель, который определяет придающий устойчивость ген, показанный в табл. 1, как вариант, донорный аллель с маркером MA008. Кроме того, первый интервал предпочтительно проявляет, по меньшей мере, донорные аллели в соответствии с гаплотипом, представленным в табл. 2, от MA0021 до MA0022 (например, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022), либо от MA0005 до MA0022 (например, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012 и MA0022), либо от MA0005 до MA0013 (например, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022 и MA0013), либо от MA0005 до MA0014 (например, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013 и MA0014), либо от MA0005 до MA0015 (например, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014 и MA0015), либо от MA0005 до MA0016 (например, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015 и MA0016), в частности предпочтительно от MA0005 до MA0017 (например, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016 и MA0017), MA0005 до MA0018 (например, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017 и MA0018), MA0005 до PZE-108095998 (например, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018 и PZE-108095998), MA0005 до PZE-108096011 (например, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998 и PZE-108096011) или MA0005 до MA0019 (например, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011 и MA0019), в частности более предпочтительно от MA0005 до PZE-108096610 (например, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011, MA0019 и PZE-108096610), MA0005 до MA0020 (например, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011, MA0019, PZE-108096610 и MA0020), MA0005 до PZE-108096791 (например, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011, MA0019, PZE-108096610, MA0020 и PZE-108096791) или MA0005 до MA0006 (например, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011, MA0019, PZE-

108096610, MA0020, PZE-108096791 и MA0006). Этот устойчивый гаплотип однозначно различает и идентифицирует источник устойчивости *Peritilla*. В частности, первый интервал локализован между маркерами MA0004 и PZE-108097482, между маркерами MA0004 и MA0022, между маркерами MA0005 и PZE-108097482 или между маркерами MA0005 и MA0022. Предпочтительно, чтобы первый интервал определял сегмент фрагмента хромосомы, способный придавать устойчивость, типичную для HTN1. Как таковой, он является носителем полинуклеотида, указанного выше.

Таблица 2. Устойчивый гаплотип из В37HTN1

| Расположение в п.о. на В73 AGPv02 | Аллельный донор В37HTN1 | Обозначение маркера |
|-----------------------------------|-------------------------|---------------------|
| 151831049 | C | MA0005 |
| 151907173 | G | MA0021 |
| 152045106 | T | MA0007 |
| 152045141 | T | MA0008 |
| 152045402 | T | MA0009 |
| 152045516 | C | MA0010 |
| 152045912 | T | MA0011 |
| 152046502 | T | MA0012 |
| 152046529 | A | MA0022 |
| 152133057 | G | MA0013 |
| 152133380 | A | MA0014 |
| 152144310 | A | MA0015 |
| 152250992 | A | MA0016 |
| 152301656 | A | MA0017 |
| 152304127 | A | MA0018 |
| 152433358 | A | PZE-108095998 |
| 152435855 | A | PZE-108096011 |
| 152630794 | C | MA0019 |
| 152703579 | G | PZE-108096610 |
| 152753635 | A | MA0020 |
| 152887338 | G | PZE-108096791 |
| 152888374 | A | MA0006 |

Каждое растение кукурузы по данному изобретению представляет собой HT-устойчивое растение кукурузы. HT-устойчивость, придаваемую за счет интеграции фрагмента хромосомы, можно оценивать количественно с помощью шкалы количественных признаков согласно табл. 3 и примеру 1.А), получаемых в результате испытаний по фенотипированию. Как видно, степень устойчивости снижается от 1 до 9. HT-устойчивые растения кукурузы по данному изобретению проявляют повышенную устойчивость к *H.turcicum* по меньшей мере по 1 количественному признаку, предпочтительно по меньшей мере 2 количественным признакам или по меньшей мере 3 количественным признакам, наиболее предпочтительно по меньшей мере 4 количественным признакам. Предпочтительно, чтобы растение кукурузы по данному изобретению проявляло устойчивость по меньшей мере к одной расе *Helminthosporium turcicum*, которая не соответствует специфичности расы, известной из предшествующего уровня техники. В наиболее предпочтительном варианте осуществления растение кукурузы по данному изобретению проявляет устойчивость ко всем известным расам *Helminthosporium turcicum*, т.е. придаваемая устойчивость не является расоспецифической и может больше всего подходить для формирования широкой устойчивости к *Helminthosporium turcicum*.

Таблица 3. Шкала количественных признаков по результатам фенотипических испытаний в полевых условиях в разных локациях с естественной и искусственной инокуляцией *H.turcicum* (источник - Немецкий комитет по кукурузе (DMK)); AG сорт 27.02.02; (DMK J. Rath; RP Freiburg H.J. Imgraben)

| Количественный признак | Фенотип |
|------------------------|--|
| 1 | Растения не проявляют симптомов заболевания, 0% |
| 2 | Начало поражения, видны первые небольшие пятна (менее 2 см). Поражено менее 5% листовой поверхности. |
| 3 | На листовой поверхности образовались пятна. Поражено 5-10% листовой поверхности. |
| 4 | Поражено 10-20% листовой поверхности. Четко видимые пятна в фазе нескольких листьев. |
| 5 | Поражено 20-40% листовой поверхности. Пятна начинают |

| | |
|---|---|
| | сливаться. |
| 6 | Поражено 40-60% листовой поверхности. Наблюдается массовое поражение листьев. |
| 7 | Поражено 60-80% листовой поверхности. Около половины листьев деформированы или засохли вследствие грибкового заболевания. |
| 8 | Поражено 80-90% листовой поверхности. Более половины листьев деформированы или засохли вследствие грибкового заболевания. |
| 9 | Поражено 90-100% листовой поверхности. Растения почти полностью засохли. |

В описании изобретения раскрывается генетическая или молекулярная структура локуса HTN1 путем обеспечения гаплотипа, путем картирования ярко выраженных маркеров, а также путем определения генов-кандидатов для придания устойчивости к патогену *Helminthosporium turcicum*.

Удивительно, но агрономичность растений кукурузы по данному изобретению была подтверждена в ходе фенотипических испытаний, проведенных в полевых условиях и в условиях теплицы. Удивление вызывает то, что в отличие от других линий, преобразованных по программе скрещивания с целью интеграции локуса HTN1 из *Peritilla*, а также от известных из предшествующего уровня техники, у преобразованных линий, таких как B37HTN1, в дополнение к придаваемой HT-устойчивости в условиях отсутствия поражения *H.turcicum* и в аналогичных условиях окружающей среды (температура, снабжение питательными веществами, местоположение и т.п.), проявлялась значительная задержка между периодами цветения мужских и/или женских цветков по сравнению с соответствующими линиями без интрогрессии (например, изогенными линиями или исходными линиями). У растения кукурузы по данному изобретению период цветения соответствовал периоду цветения у аналогичного изогенного растения кукурузы, в геном которого не был интегрирован фрагмент хромосомы донорного сорта *Peritilla*. "Периоды цветения" совпадают, если они отличаются друг от друга не более чем на 2 дня. Степень наблюдаемой задержки в этом случае сильно зависит от вида кукурузы или генотипа кукурузы, преобладающих условий окружающей среды, таких как состояние почвы, влажность, осадки, температура и т.п., и/или биотического стресса, такого как поражение патогеном, отличным от *H.turcicum*. Задержка составляла по меньшей мере 2 дня, по меньшей мере 3 дня, по меньшей мере 5 дней или по меньшей мере 7 дней. Такая установившаяся разница между периодами цветения вызывалась сцепленным наследованием, как часть интрогрессии, что особенно удивительно, так как подобные наблюдения не известны из предшествующего уровня техники. Период цветения является важным агрономическим признаком. Он может непосредственно и значительно влиять на потенциал урожайности растения кукурузы. Более поздний период цветения, как правило, приводит к снижению урожайности.

Чтобы прояснить генетическую причину этого негативного явления и идентифицировать сцепленное наследование, были выполнены обширные программы возвратного скрещивания, сопровождавшиеся генотипированием и фенотипированием. Работе способствовало интенсивное развитие специфических молекулярных маркеров на фрагменте хромосомы, несущем HTN1. Технологии маркер-опосредованной селекции (MAS) и методы осуществления сфокусированных программ возвратного скрещивания (например, "клонирование на основе картирования") известны из источников предыдущего уровня техники (Gupta и Varshney, 2013). Локус количественных признаков (QTL) с геном HTN1 устойчивости из донорного B37HTN1 или *Peritilla* локализовался в потомстве с помощью SSR-маркеров *bnlg1067*, *umc1121*, *MA0002*, *MA0003*, *bnlg1782*, *umc1287*, *umc1960* и *bnlg240* на хромосоме 8 (бин 8,06) между маркерами *MA0002* (табл. 4) и *umc1287* (табл. 5) в участке размером 23,1 сМ (см. фиг. 1). У растений кукурузы с задержкой периода цветения местоположение локуса донорной последовательности геномного сегмента, ответственного за идентифицированное сцепленное наследование периода цветения, было успешно определено во втором интервале донора на фрагменте хромосомы (пример 3В; фиг. 3). У растения кукурузы по данному изобретению фрагмент хромосомы интегрируется в такое растение, которое не содержит второй интервал донора. Второй интервал возникает, например, от рекуррентного родителя, который не несет сцепленное наследование периода цветения, или от экзогенно интродуцируемого фрагмента гомологичной ДНК, не являющегося носителем сцепленного наследования, в подходящем векторе для целевой гомологичной рекомбинации. Второй интервал располагается проксимально и тесно сцеплен с локусом HTN1 устойчивости или с первым интервалом. Второй интервал представляет собой интервал между маркером в первом маркерном участке (M1), который фланкирован маркерами SYN14136 и PZE-108076510, и маркером во втором маркерном участке (M2), который фланкирован маркерами SYN24931 и PZE-108077560. Фланкирующие маркеры представлены в табл. 4. Маркеры SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 и PZE-108077560 являются SNP-маркерами для использования в системе биоисследований KBioscience-KASP (www.lgcgenomics.com/genotyping/KASP-genotyping-reagents/KASP-overview/). Они четко определяют маркерные участки M1 и M2 по обеим сторонам последовательности сегмента, который в донорном B37HTN1 или *Peritilla* несет сцепленное наследование периода цветения. Кроме того, будучи полиморфными, эти маркеры также способны дифференцировать между донорными аллелями *Peritilla* и, например, аллелем рекуррентного родителя. Подробные сведения, касающиеся применения

этих маркеров в качестве KASP-маркера, приводятся в табл. 4. Подходящие примерные параметры гибридизации праймеров для ПЦР даны в примере 2. Специалист в данной области может определить другие подходящие параметры гибридизации. Более того, специалист в данной области, обладающий знаниями об описываемых маркерных участках, в дополнение к указанным маркерам может разработать другие маркеры, в частности полиморфные маркеры, в M1 и/или M2. Используя указанные здесь маркеры, в частности маркеры SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 и PZE-108077560, либо самостоятельно разработанные маркеры в M1 и/или M2, специалист в данной области сможет легко установить, находится или нет в растении кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы с локусом HTN1 устойчивости донорного сорта *Peritilla*, второй интервал донора, описанный выше. Специалист в данной области будет также знать, что, например, в ходе процесса скрещивания или стратегии генетической инженерии с целью целевой рекомбинации хромосомный интервал может удаляться из донора, который, например, содержит геномные последовательности, вызывающие сцепленное наследование, с помощью гомологичной/генетической рекомбинации интегрированного фрагмента хромосомы. В этом случае интервал донора *Peritilla* может замещаться на соответствующий интервал генома рекуррентного родителя или экзогенно интродуцируемый фрагмент гомологичной ДНК. В этом отношении маркеры вообще и маркеры, раскрытые в данной заявке, в частности, могут использоваться для селекции. Ниже следует пример возможного использования маркеров для детекции аллеля. Детекция аллеля может, например, проводиться путем (а) выделения по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты из генома растения или растительной клетки/растения кукурузы или растительной клетки кукурузы и (б) исследования выделенной молекулы нуклеиновой кислоты с помощью по меньшей мере одного маркера, а также, альтернативно, путем (с) секвенирования аллеля одного и/или нескольких генотипов, (d) детекции одного и/или нескольких полиморфизмов и/или (е) рестрикции с помощью эндонуклеазы рестрикции, обеспечивающей получение фрагментов различного размера в маркерном аллеле.

Предпочтительный вариант растения кукурузы по данному изобретению представляет собой растение кукурузы, как описано выше, характеризующееся тем, что фрагмент хромосомы не содержит второй интервал донора, который фланкирован а) маркерами SYN14136 и PZE-108077560, б) маркерами PZE-108076510 и PZE-108077560, с) маркерами SYN14136 и SYN24931, либо d) маркерами PZE-108076510 и SYN24931.

В предпочтительном варианте осуществления растение кукурузы по данному изобретению проявляет отклонение от нормы периода цветения мужских и/или женских цветков по сравнению с преобразованной *Peritilla* линией, или с преобразованным *Peritilla* растением, таким как B37HTN1, которое содержит интервал 2 между маркером в первом маркерном участке (M1), который фланкирован маркерами SYN14136 и PZE-108076510, и маркером во втором маркерном участке (M2), который фланкирован маркерами SYN24931 и PZE-108077560, при этом "отклонение от нормы периода цветения" означает, что преобразованная линия или преобразованное растение проявляет задержку по меньшей мере в 2 дня, по меньшей мере в 3 дня, по меньшей мере в 5 дней или по меньшей мере в 7 дней.

Еще один предпочтительный вариант растения кукурузы по данному изобретению представляет собой растение кукурузы, как описано выше, характеризующееся тем, что фрагмент хромосомы больше не содержит интервал донора (далее - третий интервал или интервал 3), между маркером во втором маркерном участке M2 и маркером в третьем маркерном участке M3, который фланкирован маркерами PZE-108093423 и PZE-108093748 (табл. 4). Маркеры PZE-108093423 и PZE-108093748 являются SNP-маркерами для использования в системе биоисследований KBioscience-KASP (www.lgcgenomics.com/genotyping/KASP-genotyping-reagents/KASP-overview/). Они однозначно определяют маркерный участок M3. Будучи полиморфными, эти маркеры также подходят для различия между донорными аллелями и, например, аллелем рекуррентного родителя. Подробные сведения, касающиеся применения этих маркеров в качестве KASP-маркеров, приводятся в табл. 4. Подходящие примерные параметры гибридизации праймеров для ПЦР даны в примере 2. Специалист в данной области может также определить другие подходящие параметры гибридизации. Более того, специалист в данной области, обладающий знаниями об описанном маркерном участке, в дополнение к указанным маркерам может разработать другие маркеры, в частности полиморфные маркеры, в M3. Используя маркеры для M2, указанные выше, и указанные здесь маркеры PZE-108093423 и PZE-108093748, либо самостоятельно разработанные маркеры в M3, для специалиста в данной области не составит труда установить, находится или нет в растении кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы с локусом HTN1 устойчивости донорного сорта *Peritilla*, третий интервал донора, описанный выше.

Еще один предпочтительный вариант растения кукурузы по данному изобретению представляет собой растение кукурузы, как описано выше, характеризующееся тем, что фрагмент хромосомы не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал и третий интервал донора и фланкирован а) маркерами SYN14136 и PZE-108093423, б) маркерами PZE-108076510 и PZE-108093423, с) маркерами SYN14136 и PZE-108093748, либо d) маркерами PZE-108076510 и PZE-108093748.

Еще один аспект изобретения заключается в том, что на фрагменте хромосомы могут определяться дополнительные генетические сегменты, которые в условиях отсутствия поражения *H.turcicum* способны оказывать большое негативное влияние на потенциал урожайности растения кукурузы, в геном которого

интегрирован фрагмент хромосомы с локусом HTN1 устойчивости из донорного сорта Peritilla. Таким образом, независимо от задержки периода цветения, описанного выше, в преобразованных линиях, а также в преобразованных линиях, известных из предшествующего уровня техники, таких как V37HTN1, в дополнение к придаваемой HT-устойчивости отмечается значительное снижение урожайности, в частности значительное снижение урожайности силоса по сравнению с соответствующими линиями без интрогрессии (например, изогенными линиями или исходными линиями). Причем это характерно и для линий, в геноме которых генетический сегмент донора, включающий интервал 2 (между маркером из M1 и M2) или интервал 2 и 3 (между маркером из M1 и M3), больше не присутствует. Это не является очевидным для специалиста в данной области, так как в сведениях из предшествующего уровня техники отсутствуют указания на такое сцепленное наследование в интрогрессивных линиях с HTN1. С целью выяснения генетической причины такого негативного с агрономической точки зрения фактора были выполнены обширные программы возвратного скрещивания, сопровождавшиеся генотипированием и фенотипированием. В ходе этой работы на фрагменте хромосомы, несущем HTN1, интенсивно разрабатывались более точные и более специфические молекулярные маркеры. У растений кукурузы, обладающих низкой урожайностью (урожайностью силосной массы), на фрагменте хромосомы Peritilla было успешно определено местоположение последовательности геномного сегмента в двух последующих интервалах донора (далее - четвертый интервал или интервал 4 и пятый интервал или интервал 5) (пример 3С; фиг. 3). У растения кукурузы по данному изобретению, содержащего соответствующий интервал без сцепленного наследования, например от рекуррентного родителя, вместо четвертого и/или пятого интервала донора, несущего сцепленное наследование, не проявляется снижение урожайности силосной массы и, таким образом, его урожайность, в частности урожайность на силос, такая же или сопоставимая с урожайностью линии без интрогрессии (например, изогенной линии или исходной линии). Урожайность силосной массы растения кукурузы по данному изобретению без четвертого и/или пятого интервалов доноров по сравнению с урожайностью силосной массы сопоставимого растения кукурузы со сцепленным наследованием может быть выше более чем на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20%. Четвертый интервал расположен проксимально и тесно сцеплен с локусом HTN1 устойчивости или с первым интервалом.

Таким образом, в соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления растение кукурузы по данному изобретению представляет собой растение кукурузы, как описано выше, в котором фрагмент хромосомы больше не содержит i) четвертый интервал донора между маркером в третьем маркерном участке M3 и маркером в четвертом маркерном участке M4, который фланкирован маркерами MA0004 и MA0005, либо ii) генетический сегмент с четвертым интервалом между маркером в третьем маркерном участке M3 и маркером в седьмом маркерном участке M7, который фланкирован маркерами MA0005 и MA0021, и/или в котором фрагмент хромосомы больше не содержит i) пятый интервал донора между маркером в пятом маркерном участке M5, который фланкирован маркерами MA0006 и PZE-108097482, и маркером в шестом маркерном участке M6, который фланкирован маркерами PZE-108107671 и SYN14196, либо ii) генетический сегмент с пятым интервалом между маркером в восьмом маркерном участке M8, который фланкирован маркерами MA0022 и MA0013, и маркером в шестом маркерном участке M6, который фланкирован маркерами PZE-108107671 и SYN14196. Фланкирующие маркеры приведены в табл. 4. Маркеры MA0004, MA0005, MA0006, MA0013, MA0021, MA0022, PZE-108097482, PZE-108107671 и SYN14196 являются SNP-маркерами для использования в системе биоисследований KBioscience-KASP (www.lgcgenomics.com/genotyping/KASP-genotyping-reagents/KASP-overview/). Они однозначно определяют маркерные участки M4, M5, M6, M7 и M8, которые вместе с M3 обозначают последовательности сегментов, несущих сцепленное наследование признака урожайности силосной массы донора V37HTN1 или Peritilla. Будучи полиморфными, эти маркеры также подходят для обнаружения различий между донорными аллелями и, например, аллелем рекуррентного родителя. Подробные сведения, касающиеся применения этих маркеров в качестве KASP-маркеров, приведены в табл. 4. Подходящие примерные параметры гибридизации праймеров для ПЦР даны в примере 2. Специалист в данной области может также определить другие подходящие параметры гибридизации. Помимо этого, специалист в данной области, обладающий знаниями об описанном маркерном участке, в дополнение к указанным маркерам может создавать другие маркеры, в частности полиморфные маркеры, в M4, M5, M6, M7 и/или M8. Используя указанные здесь маркеры MA0004, MA0005, MA0006, MA0013, MA0021, MA0022, PZE-108097482, PZE-108107671 и SYN14196 или самостоятельно разработанные маркеры в M4, M5, M6, M7 и/или M8 вместе с маркерами в M3, описанными выше, для специалиста в данной области не составит труда установить, содержит или нет растение кукурузы, в геноме которого был интегрирован фрагмент хромосомы с локусом HTN1 устойчивости донорного сорта Peritilla, четвертый интервал донора, как описано выше.

Согласно еще одному наиболее предпочтительному варианту осуществления растение кукурузы по данному изобретению представляет собой растение кукурузы, как описано выше, в котором фрагмент хромосомы: i) не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал, третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован: а) маркерами SYN14136 и MA0004, б) маркерами PZE-108076510 и MA0004, с) маркерами SYN14136 и MA0005 или d) маркерами PZE-108076510 и MA0005, либо ii) не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал и третий интервал донора

и фланкирован а) маркерами SYN14136 и PZE-108093423, б) маркерами PZE-108076510 и PZE-108093423, с) маркерами SYN14136 и PZE-108093748 или д) маркерами PZE-108076510 и PZE-108093748, а также пятый интервал донора, либо iii) не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал, третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован: а) маркерами SYN14136 и MA0004, б) маркерами PZE-108076510 и MA0004, с) маркерами SYN14136 и MA0005 или д) маркерами PZE-108076510 и MA0005, а также пятый интервал донора.

Согласно еще одному наиболее предпочтительному варианту осуществления растение кукурузы по данному изобретению представляет собой растение кукурузы, как описано выше, в котором фрагмент хромосомы: (i) не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал, третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован: а) маркерами SYN14136 и MA0021 или б) маркерами PZE-108076510 и MA0021, либо (ii) не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал, третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован: а) маркерами SYN14136 и MA0021 или б) маркерами PZE-108076510 и MA0021, а также пятый интервал донора, либо (iii) не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал, третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован: а) маркерами SYN14136 и MA0021 или б) маркерами PZE-108076510 и MA0021, а также второй генетический сегмент, который включает пятый интервал донора и фланкирован а) маркерами MA0022 и PZE-108107671, б) маркерами MA0022 и SYN4196, с) маркерами MA0013 и PZE-108107671 или маркерами MA0013 и SYN4196, либо (iv) не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал и третий интервал донора и фланкирован а) маркерами SYN14136 и PZE-108093423, б) маркерами PZE-108076510 и PZE-108093423, с) маркерами SYN14136 и PZE-108093748 или д) маркерами PZE-108076510 и PZE-108093748, а также второй генетический сегмент, который включает пятый интервал донора и фланкирован: а) маркерами MA0022 и PZE-108107671, б) маркерами MA0022 и SYN4196, с) маркерами MA0013 и PZE-108107671 или маркерами MA0013 и SYN4196, либо (v) не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал, третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован: а) маркерами SYN14136 и MA0021 или б) маркерами PZE-108076510 и MA0021, а также второй генетический сегмент, который включает пятый интервал донора и фланкирован: а) маркерами MA0022 и PZE-108107671, б) маркерами MA0022 и SYN4196, с) маркерами MA0013 и PZE-108107671 или маркерами MA0013 и SYN4196.

Как вариант, поставленная цель настоящего изобретения достигается путем получения растения кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы донорного сорта Pepitilla, характеризующееся тем, что этот фрагмент хромосомы включает первый интервал донора, который проявляет наличие донорных аллелей в соответствии с гаплотипом, представленным в табл. 2, и содержит полинуклеотид, придающий устойчивость к *Helminthosporium turcicum*, при этом фрагмент хромосомы не содержит: i) четвертый интервал донора между маркером в третьем маркерном участке, который фланкирован маркерами PZE-108093423 и PZE-108093748, и маркером в четвертом маркерном участке, который фланкирован маркерами MA0004 и MA0005, либо ii) генетический сегмент с четвертым интервалом между маркером в третьем маркерном участке M3 и маркером в седьмом маркерном участке M7, который фланкирован маркерами MA0005 и MA0021. Вышеприведенная характеристика, например, что касается маркеров, полинуклеотида или фенотипирования, подходит как для данного случая, так и для любых иных альтернативных решений проблемы, а также раскрытых вариантов осуществления настоящего изобретения.

Предпочтительный вариант инновационного растения кукурузы представляет собой растение кукурузы, как описано выше, в котором фрагмент хромосомы: i) не содержит четвертый интервал донора, который фланкирован: а) маркерами PZE-108093423 и MA0004, б) маркерами PZE-108093748 и MA0004, с) маркерами PZE-108093423 и MA0005 или д) маркерами PZE-108093748 и MA0005, либо (ii) не содержит генетический сегмент, который включает четвертый интервал донора и фланкирован а) маркерами PZE-108093423 и MA0021 или б) маркерами PZE-108093748 и MA0021.

Еще одним предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является описанное здесь растение кукурузы, в котором фрагмент хромосомы более не содержит третий интервал донора между маркером во втором маркерном участке M2 и маркером в третьем маркерном участке M3.

Еще одним предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является растение кукурузы, как описано выше, в котором фрагмент хромосомы не содержит генетический сегмент, который включает третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован: а) маркерами SYN24931 и MA0004, б) маркерами PZE-108077560 и MA0005, с) маркерами SYN24931 и MA0005, д) маркерами PZE-108077560 и MA0005, е) маркерами SYN24931 и MA0021 или ф) маркерами PZE-108077560 и MA0021.

Еще одним предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является описанное здесь растение кукурузы, в котором фрагмент хромосомы: i) более не содержит пятый интервал донора между маркером в пятом маркерном участке M5 и маркером в шестом маркерном участке M6, либо ii) не содержит генетический сегмент с пятым интервалом между маркером в восьмом маркерном участке M8 и маркером в шестом маркерном участке M6.

Еще одним наиболее предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному

изобретению является описанное здесь растение кукурузы, в котором фрагмент хромосомы: i) не содержит генетический сегмент, который включает третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован: а) маркерами SYN24931 и MA0004, б) маркерами PZE-108077560 и MA0004, с) маркерами SYN24931 и MA0005 или d) маркерами PZE-108077560 и MA0005, а также пятый интервал, либо ii) не содержит генетический сегмент, который включает третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован: а) маркерами SYN24931 и MA0004, б) маркерами PZE-108077560 и MA0004, с) маркерами SYN24931 и MA0005 или d) маркерами PZE-108077560 и MA0005, а также второй генетический сегмент, который включает пятый интервал и фланкирован: а) маркерами MA0022 и SYN4196, б) маркерами MA0022 и PZE-108107671, с) маркерами MA0013 и SYN4196 или маркерами MA0013 и PZE-108107671.

Еще одним наиболее предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является описанное здесь растение кукурузы, в котором фрагмент хромосомы: i) не содержит генетический сегмент, который включает третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован а) маркерами SYN24931 и MA00021 или б) маркерами PZE-108077560 и MA00021, а также пятый интервал, либо ii) не содержит генетический сегмент, который включает третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован: а) маркерами SYN24931 и MA00021 или б) маркерами PZE-108077560 и MA00021, а также второй генетический сегмент, который включает пятый интервал и фланкирован а) маркерами MA0022 и PZE-108107671, б) маркерами MA0022 и SYN4196, с) маркерами MA0013 и PZE-108107671 или маркерами MA0013 и SYN4196.

Как вариант, поставленная цель настоящего изобретения достигается путем получения растения кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы донорного сорта Pepitilla, характеризующееся тем, что этот фрагмент хромосомы включает первый интервал донора, который проявляет наличие донорных аллелей в соответствии с гаплотипом, представленным в табл. 2, и содержит полинуклеотид, придающий устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы, при этом фрагмент хромосомы не содержит: i) пятый интервал донора между маркером в пятом маркерном участке, который фланкирован маркерами MA0006 и PZE-108097482, и маркером в шестом маркерном участке, который фланкирован маркерами PZE-108107671 и SYN4196, либо ii) генетический сегмент с пятым интервалом между маркером в восьмом маркерном участке M8, который фланкирован маркерами MA0022 и MA0013, и маркером в шестом маркерном участке M6, который фланкирован маркерами PZE-108107671 и SYN4196.

Еще одним наиболее предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является описанное здесь растение кукурузы, в котором фрагмент хромосомы больше не содержит третий интервал донора между маркером во втором маркерном участке M2 и маркером в третьем маркерном участке M3.

Еще одним наиболее предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является растение кукурузы, как описано выше, в котором фрагмент хромосомы фланкирован: а) маркером во втором маркерном участке M2 и маркером в шестом маркерном участке M6, б) маркером в третьем маркерном участке M3 и маркером в шестом маркерном участке M6, с) маркером в четвертом маркерном участке M4 и маркером в шестом маркерном участке M6, d) маркером в седьмом маркерном участке M7 и маркером в шестом маркерном участке M6, e) маркером в маркерном участке M1 и маркером в маркерном участке M5, f) маркером во втором маркерном участке M2 и маркером в пятом маркерном участке M5, g) маркером в третьем маркерном участке M3 и маркером в пятом маркерном участке M5, h) маркером в четвертом маркерном участке M4 и маркером в пятом маркерном участке M5, i) маркером в седьмом маркерном участке M7 и маркером в пятом маркерном участке M5, j) маркером в маркерном участке M1 и маркером в маркерном участке M8, k) маркером во втором маркерном участке M2 и маркером в восьмом маркерном участке M8, l) маркером в третьем маркерном участке M3 и маркером в восьмом маркерном участке M8, m) маркером в четвертом маркерном участке M4 и маркером в восьмом маркерном участке M8, либо n) маркером в седьмом маркерном участке M7 и маркером в восьмом маркерном участке M8.

Еще одним наиболее предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является растение кукурузы, как описано выше, в котором фрагмент хромосомы фланкирован а) маркерами SYN24931 и SYN4196, б) маркерами PZE-108077560 и SYN4196, с) маркерами SYN24931 и PZE-108107671, d) маркерами PZE-108077560 и PZE-108107671, e) маркерами PZE-108093423 и SYN4196, f) маркерами PZE-108093748 и SYN4196, g) маркерами PZE-108093423 и PZE-108107671, h) маркерами PZE-108093748 и PZE-108107671, i) маркерами MA0004 и SYN4196, j) маркерами MA0005 и SYN4196, k) маркерами MA0004 и PZE-108107671, l) маркерами MA0005 и PZE-108107671, m) маркерами MA0021 и SYN4196, n) маркерами MA0021 и PZE-108107671, o) маркерами PZE-108076510 и MA0006, p) маркерами SYN14136 и MA0006, q) маркерами PZE-108076510 и PZE-108097482, r) маркерами SYN14136 и PZE-108097482, s) маркерами SYN24931 и PZE-108097482, t) маркерами PZE-108077560 и PZE-108097482, u) маркерами SYN24931 и MA0006, v) маркерами PZE-108077560 и MA0006, w) маркерами PZE-108093423 и PZE-108097482, x) маркерами PZE-108093748 и PZE-108097482, y) маркерами PZE-108093423 и MA0006, z) маркерами PZE-108093748 и MA0006, aa) маркерами MA0004 и PZE-108097482, ab) маркерами MA0005 и PZE-108097482, ac) маркерами MA0004

и MA0006, ad) MA0005 и MA0006, ae) маркерами MA0021 и PZE-108097482, af) маркерами MA0021 и MA0006, ag) маркерами PZE-108076510 и MA0013, ah) маркерами SYN14136 и MA0013, ai) маркерами PZE-108076510 и MA0022, aj) маркерами SYN14136 и MA0022, ak) маркерами SYN24931 и MA0013, al) маркерами PZE-108077560 и MA0013, am) маркерами SYN24931 и MA0022, an) маркерами PZE-108077560 и MA0022, ao) маркерами PZE-108093423 и MA0013, ap) маркерами PZE-108093748 и MA0013, aq) маркерами PZE-108093423 и MA0022, ar) маркерами PZE-108093748 и MA0022, as) маркерами MA0004 и MA0013, at) маркерами MA0005 и MA0013, au) маркерами MA0004 и MA0022, av) маркерами MA0005 и MA0022, aw) маркерами MA0021 и MA0013, ax) маркерами MA0021 и MA0022.

Еще одним наиболее предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является растение кукурузы, как описано выше, в котором фрагмент хромосомы локализован между а) маркером во втором маркерном участке M2 и маркером в шестом маркерном участке M6, b) маркером в третьем маркерном участке M3 и маркером в шестом маркерном участке M6, c) маркером в четвертом маркерном участке M4 и маркером в шестом маркерном участке M6, d) маркером в седьмом маркерном участке M7 и маркером в шестом маркерном участке M6, e) маркером в первом маркерном участке M1 и маркером в пятом маркерном участке M5, f) маркером во втором маркерном участке M2 и маркером в пятом маркерном участке M5, g) маркером в третьем маркерном участке M3 и маркером в пятом маркерном участке M5, h) маркером в четвертом маркерном участке M4 и маркером в пятом маркерном участке M5, i) маркером в седьмом маркерном участке M7 и маркером в пятом маркерном участке M5, j) маркером в маркерном участке M1 и маркером в маркерном участке M8, k) маркером во втором маркерном участке M2 и маркером в восьмом маркерном участке M8, l) маркером в третьем маркерном участке M3 и маркером в восьмом маркерном участке M8, m) маркером в четвертом маркерном участке M4 и маркером в восьмом маркерном участке M8, либо n) маркером в седьмом маркерном участке M7 и маркером в восьмом маркерном участке M8.

Таблица 4. Последовательности праймеров для KASP-маркеров и привязка к донорным аллелям В37НТN1, получаемым от местного сорта Peritilla (аллель X и аллель Y: определение доли биаллельных однонуклеотидных замен)

| SNP-маркер | Позиция маркера AGRv02 [п.о.] | Аллель-специфические праймеры X(5'-3') [SEQ ID NO] | Аллель-специфические праймеры Y(5'-3') [SEQ ID NO] | Общий праймер (5'-3') [SEQ ID NO] | Донорные аллели В37НТN1 (SNP) | Маркерный участок |
|---------------|-------------------------------|--|--|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| SYN14136 | 131681497 | 17 | 18 | 19 | A | M1 |
| PZE-108076510 | 131905855 | 20 | 21 | 22 | G | M1 |
| SYN24931 | 132877982 | 23 | 24 | 25 | A | M2 |
| PZE-108077560 | 133189880 | 26 | 27 | 28 | A | M2 |
| PZE-108093423 | 150279048 | 29 | 30 | 31 | A | M3 |
| PZE-108093748 | 150562764 | 32 | 33 | 34 | G | M3 |
| PZE-108107671 | 161543406 | 35 | 36 | 37 | C | M6 |
| SYN4196 | 161766769 | 38 | 39 | 40 | C | M6 |
| MA0004 | 151688652 | 41 | 42 | 43 | A | M4 |
| MA0005 | 151831049 | 44 | 45 | 46 | C | M4/M7 |
| MA0021 | 151907173 | 241 | 242 | 243 | G | M7 |
| MA0006 | 152888310 | 47 | 48 | 49 | A | M5 |
| PZE-108097482 | 153139646 | 50 | 51 | 52 | A | M5 |

| | | | | | | |
|---------------|-----------|-----|-----|-----|---|----|
| MA0002 | 147720853 | 53 | 54 | 55 | A | |
| MA0003 | 151346184 | 56 | 57 | 58 | C | |
| MA0007 | 152045106 | 59 | 60 | 61 | T | |
| MA0008 | 152045141 | 62 | 63 | 64 | T | |
| MA0009 | 152045402 | 65 | 66 | 67 | T | |
| MA0010 | 152045516 | 68 | 69 | 70 | C | |
| MA0011 | 152045912 | 71 | 72 | 73 | T | |
| MA0012 | 152046502 | 74 | 75 | 76 | A | |
| MA0022 | 152046529 | 244 | 245 | 246 | A | M8 |
| MA0013 | 152133057 | 77 | 78 | 79 | G | M8 |
| MA0014 | 152133380 | 80 | 81 | 82 | T | |
| MA0015 | 152144310 | 83 | 84 | 85 | A | |
| MA0016 | 152250992 | 86 | 87 | 88 | A | |
| MA0017 | 152301656 | 89 | 90 | 91 | A | |
| MA0018 | 152304127 | 92 | 93 | 94 | A | |
| MA0019 | 152630794 | 95 | 96 | 97 | C | |
| MA0020 | 152753635 | 98 | 99 | 100 | A | |
| PZE-108095998 | 152433358 | 101 | 102 | 103 | T | |
| PZE-108096011 | 152435855 | 104 | 105 | 106 | A | |
| PZE-108096610 | 152703579 | 107 | 108 | 109 | C | |
| PZE-108096791 | 152887338 | 110 | 111 | 112 | G | |

Кроме того, настоящее изобретение касается семян или зерна, ткани, органа, части и клетки растений кукурузы по данному изобретению, описанных выше. В этом отношении указанные семена или зерно представляют собой семена или зерно, в геном которых интегрирован фрагмент хромосомы согласно изобретению.

Еще один аспект настоящего изобретения касается идентификации устойчивого к *H.turcicum* растения кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы донорного сорта *Peritilla* и которое содержит потомков по меньшей мере двух аллелей в своем геноме, при этом один аллель локализован в геномном сегменте, который фланкирован маркером в первом маркерном участке M1, втором маркерном участке M2, третьем маркерном участке M3, четвертом маркерном участке M4 или седьмом маркерном участке M7 и описанным выше полинуклеотидом, который придает устойчивость к *H.turcicum* растению кукурузы, и по меньшей мере один аллель локализован в геномном сегменте, который фланкирован маркером в шестом маркерном участке M6, пятом маркерном участке M5 или восьмом маркерном участке M8. Маркерные участки и приводимые в качестве примеров маркеры в этих маркерных участках представлены выше. Предпочтительно, чтобы идентифицируемое растение кукурузы представляло собой растение кукурузы по данному изобретению. Изобретение также касается растения кукурузы, которое идентифицируется с помощью упомянутого способа идентификации.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу повышения урожайности *H.turcicum* устойчивого растения кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы донорного сорта *Peritilla*, характеризующемуся тем, что этот способ включает этап удаления второго интервала донора, четвертого интервала донора или пятого интервала донора, при этом фрагмент хромосомы содержит описанный выше первый интервал донора, который включает донорные аллели в соответствии с гаплотипом, представленным в табл. 2, и полинуклеотид, который придает устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы. Например, удаление может осуществляться путем генетической рекомбинации в процессе скрещивания двух растений кукурузы, при этом родительское растение кукурузы несет локус HTN1 устойчивости *Peritilla*. Помимо применения традиционных методов скрещивания для осуществления генетической рекомбинации, в результате которой происходит замещение по меньшей мере одного донорного интервала со сцепленным наследованием, идентифицированным выше, геномными последовательностями рекуррентного родителя, в которых, предпочтительно, отсутствуют нежелательные гены, специалисту в данной области доступны многочисленные инструменты современной биотехнологии, открывающие путь к использованию точных методов геномной инженерии. Примерами известных инструментов являются мегануклеазы (Silva и соавт., 2011), хоминг-эндонуклеазы (Chevalier, 2002), нуклеазы "цинковые пальцы", нуклеазы TALE (WO 2010/079430; WO 2011/072246) или CRISPR (Gaj и соавт., 2013). Это искусственно созданные гибридные белки с нуклеазной активностью, способные расщеплять двухцепочечные молекулы нуклеиновой кислоты, такие как ДНК растений, и, таким образом, вносить двухцепочечные разрывы в целевые локусы в геноме. Используя механизмы защиты самих клеток для репарации индуцируемых двухцепочечных разрывов, можно осуществлять гомологичную рекомбинацию или "негомологичное соединение концов", что способно приводить к удалению интервалов донора, несущих сцепленное наследование. Подходящие целевые последовательности в геноме для распознавания доменов нуклеаз можно, например, брать из информации о последовательности SNP-маркеров (табл. 4) или в их интервалах. Специалист в данной области способен идентифицировать другие после-

довательности, предпочтительно, внутри или между шестью маркерными участками, описанными выше, которые являются подходящими в качестве целевых последовательностей для распознавания доменов нуклеаз.

В этом отношении далее следует более подробное описание двух подходов генной инженерии, с помощью которых облегчается или непосредственно обеспечивается удаление из генома растения нуклеотидных последовательностей, несущих сцепленное наследование. Следующие методы, наряду с традиционными методами скрещивания, могут быть использованы для создания растений кукурузы по данному изобретению.

Как уже отмечалось, современные молекулярные инструменты способны индуцировать двухцепочечные разрывы в определенных локусах ДНК генома растения. В этом отношении использование нуклеаз TALE (TALEN) или нуклеаз цинковые пальцы (ZFN) оказалось особенно успешным. TALE или ZF распознавание домена способствует его специфическому связыванию с любым локусом в геноме. Зная последовательность целевой области, TALE или ZF распознавание доменов может быть разработано таким образом, чтобы они связывались только с желаемыми локусами в геноме. Если, например, распознаваемая последовательность сплавляется с неспецифической эндонуклеазой, такой как FokI, двухцепочечный разрыв (DSB) может индуцироваться в определенных локусах генома, что вызывает целевой геномный инжиниринг (Tzfira и соавт., 2012; Li и соавт., 2011; Puchta и Hohn, 2010). Специалист в данной области будет знать, как обращаться с эндонуклеазами FokI, и как обеспечивать подходящие TALEN и ZFN из предшествующего уровня.

Индуцированный двухцепочечный разрыв может, например, вызывать гомологичную рекомбинацию между эндогенным локусом целевого гена (например, одним из вышеупомянутых маркерных участков) и экзогенно интродуцированным фрагментом гомологичной ДНК, который, например, не является носителем сцепленного наследования (например, в подходящем донорном векторе). Это так называемое замещение генов или редактирование геномов может осуществляться *in vitro* и не требует выполнения каких-либо этапов скрещивания между двумя растениями. В связи с этим растения, подлежащие модифицированию, должны быть транзитивно трансформированы, с одной стороны, нуклеиновыми кислотами, кодирующими указанные TALEN и ZFN, и, с другой стороны, фрагментами экзогенной ДНК. Фрагмент ДНК может происходить от растения того же вида и, например, соответствовать сегменту хромосомы, который должен быть замещен, но без сцепленного наследования. После завершения индуцированной гомологичной рекомбинации клетки с модифицированным геномом можно регенерировать в растения и затем выделять, чтобы убедиться, было ли удаление сцепленного наследования успешным и не были ли снова утрачены элементы ранее трансформированной ДНК при делении клеток в ходе регенерации. Для этих целей могут использоваться маркеры, описанные выше. Методы для трансформации и регенерации известны из предшествующего уровня техники. Эти методы обсуждаются ниже.

Более того, TALEN и ZFN могут интродуцироваться трансгенным путем в процессе мейоза, в ходе которого в заранее определенных местах в геноме индуцируются двухцепочечные разрывы и, таким образом, увеличивается вероятность рекомбинации в этих местах на стадии кроссинговера. Это может способствовать исключению сцепленного наследования. Специалист в данной области знает, что после завершения мейоза растения, у которых отсутствует сцепленное наследование и нуклеазы TALEN и ZFN, получают из гаплоидных клеток.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение касается способа получения растения кукурузы по данному изобретению, который состоит из следующих этапов: (A) получения первого растения кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы донорного сорта *Peritilla*, характеризующегося тем, что указанный фрагмент хромосомы содержит первый интервал донора, который проявляет донорные аллели в соответствии с гаплотипом, представленным в табл. 2, и полинуклеотид, придающий устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы, при этом фрагмент хромосомы содержит второй интервал донора и/или четвертый интервал донора и/или пятый интервал донора, (B) получения второго растения кукурузы, (C) скрещивания растения кукурузы (A) с растением кукурузы (B) и (D) отбора растения кукурузы по данному изобретению, предпочтительно с использованием одного из маркеров, описанных выше. Как вариант, настоящее изобретение касается способа получения растения кукурузы по данному изобретению, состоящего из следующих этапов: (A) транзитивной трансформации клетки растения кукурузы первой нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый белок с эндонуклеазной активностью (например, гибридный белок TALE или ZF), способный индуцировать двухцепочечный разрыв ДНК между маркерными участками M2 и M3 в клетке растения кукурузы, и второй нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй белок с эндонуклеазной активностью (например, гибридный белок TALE или ZF), способный индуцировать двухцепочечный разрыв ДНК в геноме клетки растения кукурузы между маркерными участками M5 и M6, (B) транзитивной интродукции донорного вектора в первую клетку растения кукурузы, несущую фрагмент хромосомы донорного сорта *Peritilla*, при этом фрагмент хромосомы содержит первый интервал донора, который проявляет донорные аллели в соответствии с гаплотипом, представленным в табл. 2, и полинуклеотид, придающий устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы, причем фрагмент хромосомы дополнительно содержит хромосомные сегменты донорного сорта *Peritilla* между сайтами двухцепочечного разрыва (A), в

результате чего между геномом первой клетки растения кукурузы и фрагментом хромосомы донорного вектора происходит гомологичная трансформация, (С) регенерации растения кукурузы из клетки растения кукурузы, (D) идентификации растения кукурузы по данному изобретению, предпочтительно с использованием по меньшей мере одного из маркеров, описанных выше. Наиболее предпочтительно, чтобы транзистентно индуцированные первая и вторая последовательности нуклеиновой кислоты и донорные векторы затем утрачивались. Специалист в данной области будет знать, как это осуществить и как это детектировать.

Еще один аспект изобретения касается маркеров, описанных выше, в качестве олигонуклеотидов, в частности олигонуклеотидов в качестве праймеров. Предпочтительно, чтобы олигонуклеотиды были выделенными олигонуклеотидами. Олигонуклеотид содержит молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую одну из нуклеотидных последовательностей, выбираемых из SEQ ID NO: 41-49, 53-100 и 229-250. Кроме того, настоящее изобретение касается использования олигонуклеотида, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую одну из нуклеотидных последовательностей, выбираемых из SEQ ID NO: 17-250, для идентификации растения кукурузы, устойчивого к *H.turcicum*. Предпочтительно, чтобы устойчивость происходила от донорного сорта *Pepitilla* и представляла собой HTN1.

Как вариант, проблема настоящего изобретения решается трансгенным растением, в частности трансгенным растением кукурузы, которое содержит трансгенную клетку растения, как описано ниже. Изобретение также касается части такого растения по данному изобретению, при этом часть может представлять собой отдельную клетку, ткань, орган или комбинацию нескольких клеток, тканей или органов. Примером комбинации нескольких органов является цветок и семена. В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления изобретение относится к семенам трансгенного растения, характеризующимся тем, что эти семена содержат полинуклеотид по данному изобретению в качестве трансгена, как показано ниже. Предпочтительно, чтобы трансгенное растение по настоящему изобретению, в частности растение вида *Zea mays*, проявляло более высокую степень устойчивости к *H.turcicum*, чем соответствующее нетрансформированное растение (изогенное растение без трансгена). Трансгенное HT-устойчивое растение по данному изобретению проявляет повышенную степень устойчивости к *H.turcicum* по меньшей мере по одному количественному признаку, по меньшей мере 2 количественным признакам или по меньшей мере 3 количественным признакам и наиболее предпочтительно по меньшей мере 4 количественным признакам (см. схему количественных признаков, представленную в табл. 3).

Более того, изобретение обеспечивает способ получения трансгенного растения, который включает этап вставки полинуклеотида по данному изобретению или вектора по данному изобретению, описанному ниже, в клетку растения и, как вариант, стадию отбора трансгенной клетки растения. Указанный способ получения трансгенного растения характеризуется последующим этапом, включающим регенерацию трансгенного растения из трансгенной клетки растения, получаемой на первой стадии. Специалисту в данной области известны способы регенерации из предшествующего уровня техники.

Дополнительный аспект настоящего изобретения касается полинуклеотида, содержащего один или несколько придающих устойчивость генов локуса HTN1 из *Pepitilla* (табл. 1) или выбираемых из RLK1 и EXT1 (см. табл. 1) или их аллелей. Гены или аллели генов обуславливают устойчивый фенотип с признаками, типичными для HTN1 в условиях поражения *H.turcicum*. Структурная организация полинуклеотида характеризуется тем, что он содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая (a) включает нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 15, (b) включает нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична любой одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 15, предпочтительно по всей ее длине, (c) гибридизуется с комплементарной нитью молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с (a) или (b) в жестких условиях, (d) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 или 16, либо (e) кодирует полипептид, имеющий нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична любой одной из аминокислотных последовательностей в соответствии с (d). Согласно предпочтительному варианту осуществления полипептид характеризуется тем, что он содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая (aa) включает нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или 5, (bb) включает нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична любой одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 или 5, предпочтительно по всей ее длине, (cc) гибридизуется с комплементарной цепью молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с (aa) или (bb) в жестких условиях, (dd) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или 6, либо (ee) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична любой одной из аминокислотных последовательностей в соответствии с (dd). Предпочтительно, чтобы полинуклеотид был выделенным и/или очищенным из естественной генетической среды или находился в чистой или гомогенной форме. Предпочтительно, чтобы полинуклеотид представлял собой ДНК, наиболее предпочтительно кДНК, т.е. включал кДНК одного или нескольких генов, придающих устойчивость (табл. 1). Однако он может также находиться в форме РНК. Специалист в данной области знает, как расшифровать последовательность геномной ДНК из ин-

формации о последовательностях, которая здесь раскрыта. Полинуклеотид по данному изобретению кодирует по меньшей мере один полипептид, способный придавать устойчивость к патогену *Helminthosporium turcicum* растению, в котором этот полипептид экспрессируется. Предпочтительно, чтобы полипептид, кодируемый полинуклеотидом по данному изобретению или его частями, придавал устойчивость к патогену *Helminthosporium turcicum*, в частности растению рода *Zea* или растению вида *Zea mays*.

Настоящее изобретение также касается полипептида, способного придавать устойчивость к *H. turcicum* растению, в котором этот полипептид экспрессируется и который кодируется полинуклеотидом по данному изобретению или его частью. Предпочтительно, полипептид включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 или 16, наиболее предпочтительно аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или 6. Указанный полипептид может быть выделенным полипептидом.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение касается вектора, который содержит полинуклеотид по данному изобретению. Вектор может представлять собой плазмиду, космиду, фаг или экспрессирующий вектор, трансформирующий вектор, шаттл-вектор или клонирующий вектор. Он может быть двухцепочечным или одноцепочечным, линейным или кольцевым; он может трансформировать прокариотического или эукариотического хозяина либо путем внедрения в его геном, либо путем экстрахромосомной перестройки. Предпочтительно, чтобы полинуклеотид по данному изобретению был оперативно связан в экспрессирующем векторе с одной или несколькими регуляторными последовательностями, обеспечивающими транскрипцию и, как вариант, экспрессию в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Например, полинуклеотид может находиться под контролем подходящих промоторов или терминатора. Подходящими промоторами могут быть конститутивно индуцируемые промоторы (например, 35S промотор из "вируса мозаики цветной капусты" (Odell и соавт., 1985)); наиболее подходящими промоторами являются патоген-индуцируемые промоторы (например, PR1 промотор петрушки (Rushton и соавт., 1996)). Наиболее подходящими патоген-индуцируемыми промоторами являются синтетические или химерные промоторы, которые не встречаются в природе, состоят из нескольких элементов и содержат минимальный промотор, а также вверх по течению от минимального промотора по меньшей мере один *cis*-регуляторный элемент, который действует как сайт связывания специальных факторов транскрипции. Химерные промоторы синтезируются под заказ и индуцируются различными факторами или повторно праймируются. Примеры таких промоторов можно найти в международных публикациях WO 2000/29592 и WO 2007/147395. Примером подходящего терминатора является посттерминатор (Dericker и соавт., 1982).

Помимо векторов, описанных выше, настоящее изобретение обеспечивает способ встраивания вектора, как описано, в клетку-хозяина. Например, вектор может встраиваться посредством конъюгации, мобилизации, биолиственной трансформации, трансформации агробактериями, трансфекции, трансдукции, вакуумной инфльтрации или электропорации. Специалисту в данной области известны такие способы, а также способы получения описанных векторов (Sambrook и соавт., 2001).

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей полипептид или вектор по данному изобретению. В контексте настоящего изобретения клетка-хозяин может быть прокариотической клеткой (например, бактериальной) или эукариотической клеткой (например, клеткой растения или дрожжей). Предпочтительно фермент представляет собой агробактерию, например *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes* или клетку растения, которая содержит полинуклеотид или вектор по данному изобретению. Специалисту в данной области известны многочисленные методы, например, такие как конъюгация или электропорация, для встраивания полинуклеотида или вектора по данному изобретению в агробактерию, а также различные методы трансформации (биолиственная трансформация, агробактериальная трансформация), посредством которых можно встраивать полинуклеотид или вектор по настоящему изобретению в клетку растения (Sambrook и соавт., 2001).

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к трансгенной клетке растения, содержащей полинуклеотид по данному изобретению в качестве трансгена или вектор по данному изобретению. Примером такой трансгенной клетки растения является клетка растения, которая предпочтительно стабильно трансформирована полинуклеотидом или вектором по данному изобретению. В предпочтительном варианте трансгенной клетки растения полинуклеотид оперативно связан с одной или несколькими регуляторными последовательностями, обеспечивающими транскрипцию и, как вариант, экспрессию в клетке растения. Таким образом, полный конструкт полинуклеотида по данному изобретению и регуляторная последовательность(и) могут представлять собой трансген. Примерами таких регуляторных последовательностей являются промотор или терминатор. Специалисту в данной области известны многочисленные функциональные промоторы и терминаторы, которые могут использоваться в растениях. Трансгенная клетка растения по данному изобретению, в частности клетка растения вида *Zea mays*, предпочтительно проявляет более высокую устойчивость к *H. turcicum*, чем соответствующая нетрансформированная клетка растения ((изогенная) клетка растения без трансгена). Трансгенные НТ-устойчивые клетки растения по данному изобретению проявляют повышенную устойчивость к *H. turcicum* по меньшей мере по одному количественному признаку, предпочтительно по меньшей мере 2 количественным признакам или по меньшей мере 3 количественным признакам и наиболее предпочти-

тельно по меньшей мере 4 количественным признакам (см. схему количественных признаков в табл. 3). Объектом изобретения также является способ получения трансгенной клетки растения по изобретению, включающий этап вставки полинуклеотида или вектора по изобретению в клетку растения. Например, вставка может осуществляться посредством трансформации, предпочтительно стабильной трансформации. Специалисту в данной области известны подходящие методы встройки, такие как библистическая трансформация, агробактериальная трансформация или электропорация (Sambrook и соавт., 2001).

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу придания или повышения устойчивости к *H.turcicum* растению, предпочтительно растению вида *Zea mays*, который включает этап трансформации клетки растения полинуклеотидом или вектором по данному изобретению. Предпочтительно, чтобы указанный способ приводил к повышению устойчивости к *H.turcicum* по меньшей мере по одному количественному признаку, более предпочтительно по меньшей мере 2 количественным признакам или по меньшей мере 3 количественным признакам, наиболее предпочтительно по меньшей мере 4 количественным признакам (см. схему количественных признаков, представленную в табл. 3).

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к способу модификации фенотипа устойчивости растения, в частности растения кукурузы, к патогену *Helminthosporium turcicum*, который состоит из этапа мутации придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Pepitilla* или содержащегося в нем аллеля гена. Предпочтительно придающий устойчивость ген локуса HTN1 из *Pepitilla* кодирует полипептид согласно SEQ ID NO: 2 или гомологичный полипептид согласно SEQ ID NO: 2, который продуцирует фенотип устойчивости с признаками, типичными для HTN1 в условиях поражения *H.turcicum*. Придающий устойчивость ген локуса HTN1 из *Pepitilla* или его аллель может быть трансгенным или эндогенным в геноме растения. Модификация фенотипа устойчивости может означать изменение расовой специфичности патогена и/или изменение уровня устойчивости, измеряемых по классификационной шкале на основании фенотипических характеристик, таких как пораженность поверхности листа (см. табл. 3) или измеряемых как значение AUDPC (см. пример 1.C). Предпочтительно, чтобы уровень устойчивости после модификации фенотипа устойчивости находился между уровнем устойчивости растения, которое экспрессирует немутировавший ген, придающий устойчивость, локуса HTN1 из *Pepitilla*, и уровнем устойчивости изогенного растения, которое не экспрессирует придающий устойчивость ген локуса HTN1 из *Pepitilla*. Однако он может также быть выше уровня устойчивости растения, которое экспрессирует немутировавший ген, придающий устойчивость, локуса HTN1 из *Pepitilla*. Наиболее предпочтительно, чтобы уровень устойчивости находился между уровнем устойчивости растения, которое экспрессирует полипептид согласно SEQ ID NO: 2, и уровнем устойчивости изогенного растения, которое не экспрессирует полипептид согласно SEQ ID NO: 2; однако он может также быть выше уровня устойчивости растения, которое экспрессирует полипептид согласно SEQ ID NO: 2. Выражение "мутировать", используемое в данной заявке, может означать изменение, внесенное человеком в генетическую последовательность (мутацию). В этом отношении примерами являются растения, растительные клетки или части растения, получающие высокую дозу химических, радиологических или иных мутирующих агентов, с последующим отбором мутантов. Альтернативно, мутации могут вноситься, например, с помощью TILLING нуклеаз, TALE нуклеаз, нуклеаз "цинковые пальцы" или системы CRISPR/Cas, либо вызываться слиянием, инсерцией, делецией или заменой в последовательности ДНК или аминокислотной последовательности. Специалист в данной области может получить достаточные технические указания из предшествующего уровня техники относительно того, как вносить мутации. Предпочтительно, чтобы мутация придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Pepitilla* приводила к замене по меньшей мере одной аминокислоты, по меньшей мере двух аминокислот, по меньшей мере трех аминокислот либо по меньшей мере пяти или более аминокислот. В случае множественности аминокислотных замен они могут происходить в различных аллелях придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Pepitilla*, т.е. мутация может быть гетерозиготной или также гомозиготной.

В предпочтительном варианте осуществления указанного способа модификации фенотипа устойчивости растения мутация придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Pepitilla* приводит к точечной мутации в нуклеотидной последовательности согласно SEQ ID NO: 1 в положении 1365 с заменой основания G на A или в положении 1490 с заменой основания G на A. Кроме того, указанный вариант осуществления также касается мутации, которая приводит к замене одной аминокислоты в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2 в положении 455 M (метионина) на I (изолейцин) или в положении 497 G (глицина) на E (глутаминовую кислоту). Еще в одном предпочтительном варианте осуществления способа мутация придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Pepitilla* приводит к точечной мутации, результатом которой является замена одной аминокислоты в нуклеотидной последовательности согласно SEQ ID NO: 1 между положением 1365 и положением 1490, либо, как вариант, мутация приводит к замене одной аминокислоты в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2 между положением 455 и положением 497.

Еще один аспект изобретения относится к способу получения растения, в частности растения кукурузы, имеющего модифицированный фенотип устойчивости, что касается патогена *Helminthosporium turcicum*, который включает этап мутации придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Pepitilla* или его аллеля, по меньшей мере по одной клетке растения или по меньшей по одной клетке, из которой это

растение регенерируется. Кроме того, указанный способ может затем включать этап регенерации по меньшей мере одного растения из по меньшей мере одной мутировавшей клетки и отбор регенерированных растений по фенотипу устойчивости к патогену *Helminthosporium turcicum*. Предпочтительно, чтобы придающий устойчивость ген локуса HTN1 из *Pepitilla* кодировал полипептид согласно SEQ ID NO: 2, который продуцирует фенотип устойчивости с признаками, типичными для HTN1 в условиях поражения *H. turcicum*. Придающий устойчивость ген локуса HTN1 из *Pepitilla* или его аллельный ген может присутствовать в растении в трансгенной или эндогенной форме. Модификация фенотипа устойчивости может означать замену расовой специфичности патогена и/или замену уровня устойчивости, измеряемых по классификационной шкале на основании фенотипических характеристик, таких как пораженность поверхности листа (см. табл. 3) или измеряемых как значение AUDPC (см. пример 1.С). Предпочтительно, чтобы уровень устойчивости модифицированного фенотипа устойчивости находился между уровнем устойчивости растения, которое экспрессирует немутировавший ген, придающий устойчивость, локуса HTN1 из *Pepitilla*, и уровнем устойчивости изогенного растения, которое не экспрессирует ген локуса HTN1 из *Pepitilla*. Однако он может также быть выше уровня устойчивости растения, которое экспрессирует немутировавший ген, придающий устойчивость, локуса HTN1 из *Pepitilla*. Наиболее предпочтительно, чтобы уровень устойчивости находился между уровнем устойчивости растения, которое экспрессирует полипептид согласно SEQ ID NO: 2, и уровнем устойчивости изогенного растения, которое не экспрессирует полипептид согласно SEQ ID NO: 2; однако он может также быть выше уровня устойчивости растения, которое экспрессирует полипептид согласно SEQ ID NO: 2. Выражение "мутация", используемое в данной заявке, может означать изменение (мутацию), внесенное человеком в генетическую последовательность. В этом отношении примерами являются растения, растительные клетки или части растения, получившие высокую дозу химических, радиологических или иных мутагенов, с последующим отбором мутантов. Как вариант, мутации могут вноситься, например, с помощью TILLING нуклеаз, TALE нуклеаз, нуклеаз "цинковые пальцы" или системы CRISPR/Cas, либо вызываться слиянием, инсерцией, делецией или заменами в последовательности ДНК или аминокислотной последовательности. Специалист в данной области может получить достаточные технические указания из предшествующего уровня техники относительно того, как вносить мутации. Предпочтительно, чтобы мутация придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Pepitilla* приводила к замене по меньшей мере одной аминокислоты, по меньшей мере двух аминокислот, по меньшей мере трех аминокислот либо по меньшей мере пяти или более аминокислот. В случае множественности аминокислотных замен они могут происходить в различных аллелях придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Pepitilla*, т.е. мутация может быть гетерозиготной или даже гомозиготной.

В предпочтительном варианте осуществления способа получения растения, обладающего модифицированным фенотипом устойчивости к патогену *Helminthosporium turcicum*, мутация придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Pepitilla* приводит к точечной мутации в нуклеотидной последовательности согласно SEQ ID NO: 1 в положении 1365 с заменой основания G на A или в положении 1490 с заменой основания G на A. Кроме того, указанный вариант осуществления также касается мутации, которая приводит к замене одной аминокислоты в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2 в положении 455 M (метионина) на I (изолейцин) или в положении 497 G (глицина) на E (глутаминовую кислоту). Еще в одном предпочтительном варианте осуществления указанного способа мутация придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Pepitilla* приводит к точечной мутации, результатом которой является замена одной аминокислоты в нуклеотидной последовательности согласно SEQ ID NO: 1 между положением 1365 и положением 1490, либо, как вариант, мутация приводит к замене одной аминокислоты в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2 между положением 455 и положением 497.

Изобретение также касается растений или их частей, которые можно получать посредством способа получения растения с модифицированным фенотипом устойчивости к патогену *Helminthosporium turcicum*.

Более того, изобретение включает растение или его часть, которое включает мутацию придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Pepitilla* или его аллеля. Предпочтительно результатом такой мутации является модифицированный фенотип устойчивости, как описано выше. Предпочтительно, чтобы придающий устойчивость ген локуса HTN1 из *Pepitilla* кодировал полипептид согласно SEQ ID NO: 2 или гомолог полипептида согласно SEQ ID NO: 2, который продуцирует фенотип устойчивости с признаками, типичными для HTN1 в условиях поражения *H. turcicum*. Придающий устойчивость ген локуса HTN1 из *Pepitilla* или его аллельный ген может присутствовать в растении в трансгенной или эндогенной форме. В предпочтительном варианте осуществления растения или его части мутация представляет собой точечную мутацию в нуклеотидной последовательности согласно SEQ ID NO: 1 в положении 1365 с заменой основания G на A или в положении 1490 с заменой основания G на A. Кроме того, указанный вариант осуществления также касается мутации, которая приводит к замене одной аминокислоты в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2 в положении 455 M (метионина) на I (изолейцин) или в положении 497 G (глицина) на E (глутаминовую кислоту). В еще одном предпочтительном варианте осуществления указанного растения или его части мутация придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Pepitilla* представляет собой точечную мутацию, результатом которой является замена одной

аминокислоты в нуклеотидной последовательности согласно SEQ ID NO: 1 между положением 1365 и положением 1490, либо, как вариант, мутация приводит к замене одной аминокислоты в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2 между положением 455 и положением 497.

Следующие термины, используемые в данной заявке, имеют значения, приведенные ниже.

Термин "аллель" означает одну, или две, или более нуклеотидных последовательностей в специфическом локусе генома. Первый аллель находится в одной хромосоме, второй аллель находится в другой хромосоме в том же положении. Если оба аллеля являются разными, они гетерозиготные, и если они одинаковые, они гомозиготные. Различные аллели гена (генные аллели) различаются по меньшей мере одним нуклеотидом (SNP). В зависимости от контекста описание аллель также означает единичный нуклеотидный полиморфизм SNP, который позволяет проводить различие между донорным HTN1 (Pepitilla) и рекуррентным родителем.

Выражение "фрагмент хромосомы" означает специфический сегмент хромосомной ДНК из специфической хромосомы, содержащей по меньшей мере один ген. Интегрируемый фрагмент хромосомы происходит из донорного источника. В контексте изобретения последовательное чередование генов внутри интегрируемого фрагмента хромосомы соответствует такой последовательности, которая существует в исходном фрагменте хромосомы из донорного источника. Таким образом, интегрируемый фрагмент хромосомы может оставаться неизменным по всей длине по сравнению с соответствующим фрагментом хромосомы в донорном источнике. Фрагмент хромосомы или его часть может представлять собой специфический "гаплотип", в котором указанный фрагмент хромосомы может содержать специфические SNP, посредством которых гаплотип также может однозначно различаться и идентифицироваться.

Термины "дистальный" и "проксимальный" описывают расположение хромосомного интервала или генетического сегмента относительно специфической референсной точки (например, специфического полинуклеотида, другого хромосомного интервала или гена) в целой хромосоме; "дистальный" означает, что интервал или сегмент локализован со стороны референсной точки на удалении от центромеры хромосомы, а "проксимальный" означает, что интервал или сегмент локализован со стороны референсной точки вблизи от центромеры хромосомы.

"Тесно сцепленный" или "тесно связанный" означает два локуса, два интервала, два генетических сегмента или два маркера (маркерные локусы), которые находятся на расстоянии менее 15 сМ, менее 12 сМ, менее 10 сМ, менее 8 сМ, менее 7 сМ, менее 6 сМ, менее 5 сМ, менее 4 сМ, менее 3 сМ, менее 2 сМ, менее 1 сМ, менее 0,5 сМ, менее 0,2 сМ, менее 0,1 сМ друг от друга на используемой IBM2 генетической карте 4 соседей, находящейся в открытом доступе на веб-сайте Maize GDB.

Термин "урожайность", используемый в контексте настоящего изобретения, относится к продуктивности на единицу площади специфического растительного продукта, обладающего коммерческой ценностью. Например, урожайность кукурузы измеряется в метрических тоннах семян или зерна на гектар (га) и за посевной сезон или в метрических тоннах сухой биомассы с гектара (га) и в посевной сезон. Если специально не указано иное или контекст не требует иного, урожайность может означать зеленую массу или абсолютно сухую массу, зеленую массу или относительно сухую массу, урожайность силоса (также известную как урожайность кукурузы на силос или общая урожайность сухой массы) или урожайность зерна. На урожайность влияют генетические факторы и факторы окружающей среды. В принципе она представляет собой совокупность многих агрономических признаков, которые складываются из признаков, основывающихся на генетических элементах растения, и обеспечивают конечную урожайность в течение посевного сезона. Примерами таких агрономических признаков являются прорастание семян, жизнестойкость вегетирующего растения, устойчивость к стрессам, резистентность или устойчивость к возбудителям болезней, резистентность к действию гербицидов, тенденция к ветвлению, период цветения, число зерен, сомкнутость, стабильность и сохранность зерен, выход зерна при обмолоте (равномерное созревание семян) и т.п.

Выражение "генетический сегмент с" более точно определенным интервалом, следует понимать как означающий генетический сегмент, который включает или содержит более точно определенный интервал, т.е. не ограниченный более точно определенным интервалом. Например, "генетический сегмент с пятым интервалом между маркером в восьмом маркерном участке M8, который фланкирован маркерами MA0022 и MA0013, а также маркером в шестом маркерном участке M6, который фланкирован маркерами PZE-108107671 и SYN4196", означает, что генетический сегмент содержит пятый интервал и что этот генетический сегмент локализован между маркером в восьмом маркерном участке M8, который фланкирован маркерами MA0022 и MA0013, и маркером в шестом маркерном участке M6, который фланкирован маркерами PZE-108107671 и SYN4196.

Термин "гибридизировать" или "гибридизация" следует понимать как означающий процесс агрегации одноцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты с цепью нуклеиновой кислоты, которая является строго комплементарной, т.е. образует с ней пары оснований. Стандартные методы гибридизации описаны, например, Sambrook и соавт. (2001). Это должно означать, что предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 65, 70, 75, 80 или 85%, наиболее предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% оснований молекулы нуклеиновой кислоты спариваются с основаниями цели нуклеиновой кислоты, которая является строго комплементарной. Возможность такой агрегации

зависит от жесткости условий гибридизации. Термин "жесткость" относится к условиям гибридизации. Условия высокой жесткости гибридизации задаются в тех случаях, когда спаривание оснований является трудным, а условия низкой жесткости гибридизации задаются в случаях, когда спаривание оснований является легким. Например, жесткость условий гибридизации зависит от концентрации солей или от ионной силы и температуры. В целом, жесткость можно повышать путем увеличения температуры гибридизации и/или снижения содержания солей. Термин "условия жесткой гибридизации" следует понимать, как означающий такие условия, в которых гибридизация происходит только между преимущественно гомологичными молекулами нуклеиновых кислот. В этом отношении термин "условия гибридизации" относится не только к действительным условиям, преобладающим во время непосредственной агломерации нуклеиновых кислот, но также к условиям, преобладающим во время последующих этапов отмывки. Например, условиями жесткой гибридизации являются условия, при которых преимущественно гибридизуются только те молекулы нуклеиновых кислот, которые имеют по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%, идентичности гибридизуемых последовательностей. Примером условий жесткой гибридизации является гибридизация в $4 \times \text{SSC}$ при 65°C и последующая многократная отмывка в $0,1 \times \text{SSC}$ при 65°C в течение около 1 ч. Используемый здесь термин "условия жесткой гибридизации" может также означать гибридизацию при 68°C в $0,25\text{M}$ фосфат натрия, pH 7,2, 7% SDS, 1 mM EDTA и 1% BSA в течение 16 ч и последующую двукратную отмывку в $2 \times \text{SSC}$ и 0,1% SDS при 68°C . Предпочтительно, чтобы гибридизация осуществлялась в жестких условиях.

Термин "интервал" или "хромосомный интервал" означает длинный линейный сегмент в геномной ДНК, который находится в отдельной хромосоме растения или во фрагменте хромосомы и который обычно определяется по двум маркерам, представляющим собой концевые точки интервала с дистальной и проксимальной стороны. В этом отношении маркеры, которые определяют края интервала, могут сами являться частью интервала. Более того, возможно взаимное наложение двух разных интервалов. В описании интервал характеризуется указанием "между маркером А и маркером В". Концевой маркер интервала может также локализоваться в определенном маркерном участке с одной стороны интервала. Таким образом, маркерный участок определяется двумя фланкирующими маркерами и представляет собой хромосомный сегмент, в котором возможно расположение, кроме фланкирующих маркеров, многих других маркеров. Фланкирующие маркеры определяют краевые точки маркерного участка и одновременно сами являются частью маркерного участка. Если оба концевых маркера интервала являются маркерами в разных маркерных участках с обеих сторон интервала, описание характеризует интервал указанием "между маркером в маркерном участке X, который фланкирован маркерами С и D, и маркером в маркерном участке Y, который фланкирован маркерами Е и F". Маркерный участок может быть длиной до более 500000 пар оснований (п.о.) и предпочтительно иметь размер от 100000 до 400000 п.о. или более предпочтительно от 140000 до 315000 п.о.

Термин "интрогрессия", используемый в связи с настоящим изобретением, означает перемещение по меньшей мере одного желаемого генного аллеля в генетическом локусе генетического фона в другой. Например, путем интрогрессии желаемый генный аллель в определенном локусе может перемещаться в потомка посредством полового скрещивания двух родителей того же вида. Как вариант, перемещение генного аллеля может также происходить путем рекомбинации между двумя донорными геномами в слившемся протопласте, в котором по меньшей мере один протопласт несет желаемый ген в своем геноме. В каждом случае потомки, составляющие желаемый генный аллель, затем могут подвергаться возвратному скрещиванию с линией, содержащей предпочитаемый генетический фон, и отбираться по желаемому генному аллелю. Результатом является закрепление желаемого генного аллеля на выбираемом генетическом фоне.

Термин "выделенная молекула нуклеиновой кислоты" или "выделение полинуклеотида" следует понимать как означающий молекулу нуклеиновой кислоты или полинуклеотид, которые были удалены из их естественной или исходной среды. Термин также включает молекулу нуклеиновой кислоты, получаемую синтетическим путем. "Выделенный полипептид" следует понимать, как означающий полипептид, который был удален из его естественной или исходной среды. Термин также включает полипептид, получаемый синтетическим путем.

Термин "патогенное заражение" следует понимать как означающий самый ранний момент взаимодействия патогена с тканью растения-хозяина. Примером поражения грибами, такими как аскомицеты или оомицеты, является рост гифов или образование специфических структур поражения, таких как проникающие гифы и аппрессории. Более подробно поражение *Helminthosporium turcicum* можно изучать путем использования различных методик окрашивания (например, трипановым синим) (Chung и соавт., *VMC Plant Biology* 10 (2010), 103; Walsh и соавт. (2008), Poster presentation P12, 50-я Конференция по генетике кукурузы, Вашингтон).

"Донорный сорт Pepitilla", "исходный сорт Pepitilla" или "Pepitilla" означает, кроме собственно самого местного сорта кукурузы Pepitilla, другие генотипы кукурузы, в геном которых, в частности, на хромосоме 8, бин 5 и 6, осуществлена интрогрессия локус HTN1 устойчивости, предпочтительно из Рер-

itilla. Примерами таких генотипов являются W22Htn (например, Bar-Zur и соавт., 1998), H6314Htn (например, Bar-Zur и соавт., 1998), B73Htn (например, Shimon и соавт., Journal of Phytopathology 131:4 (1991), 315-321), B68Htn и A632Htn (например, Carson, Plant Disease 79 (1995), 717-720) и A619Htn (например, Stankovic и соавт., Genetika 39:2 (2007), 227-240). Кроме того, Pepitilla включает любой источник устойчивости, придающий фенотипу устойчивости признаки, типичные для HTN1 после интрогрессии в восприимчивую линию кукурузы/растение кукурузы. Примерами таких HTN1-специфических признаков являются задержка начала споруляции, уменьшение числа поражений, уменьшение размера поражений, уменьшение объема споруляции и/или отсутствие или наличие лишь изолированных хлоротичных и некротических поражений.

"Локус" представляет собой положение на хромосоме, где находятся один или несколько генов, которые определяют агрономический признак или оказывают на него влияние. В частности, "локус", как он используется в данной заявке, означает локус HTN1 устойчивости, который придает устойчивость к *Helminthosporium turcicum* или по меньшей мере к одной расе *Helminthosporium turcicum*.

Выражение "растение кукурузы" следует понимать как означающее растение вида *Zea mays*, а также подвиды *Zea mays ssp. mays*, *Zea mays ssp. mexicana* или *Zea mays ssp. parviglumis*.

"Маркер" представляет собой нуклеотидную последовательность, которая используется в качестве референсной или ориентационной точки. Маркер для распознавания явления рекомбинации должен быть подходящим для контроля различий или полиморфизмов в популяции растения. Для маркеров такие различия находятся на уровне ДНК и, например, представляют собой различия в нуклеотидных последовательностях, такие как SSR (простые повторяющиеся последовательности), RFLP (полиморфизмы длин рестрикционных фрагментов), FLP (полиморфизмы длин фрагментов) или SNP (простые нуклеотидные полиморфизмы). Маркеры можно получать из геномных и экспрессирующихся нуклеиновых кислот, таких как сплайсированная РНК, кДНК или EST-последовательности, либо они могут основываться на нуклеиновых кислотах, которые используются в качестве зондов или пар праймеров и как таковые являются подходящими для амплификации фрагмента последовательности с применением методов на основе ПЦР. Маркеры, которые касаются генетических полиморфизмов между частями популяции, можно детектировать с помощью хорошо разработанных методов, известных из предыдущего уровня техники (An Introduction to Genetic Analysis, 7th Edition, Griffiths, Miller, Suzuki и соавт., 2000). Например, они включают секвенирование ДНК, методы на основе ПЦР, амплификацию специфических последовательностей, RFLP-анализ, анализ полинуклеотидных полиморфизмов с использованием аллель-специфической гибридизации (ASH), детектирование SSR, SNP или AFLP. Известны методы для детектирования EST (метод экспрессированных последовательностей) и RAPD (случайно амплифицированной полиморфной ДНК). В зависимости от контекста описания термин "маркер" может также означать специфическое положение хромосомы в геноме вида, где может обнаруживаться специфический маркер (например, SNP). Положение маркера указанного типа может использоваться для контроля присутствия сцепленного локуса, который способствует проявлению специфического фенотипического признака (например, HTN1 или сцепленного наследования). Как пример, маркерный локус может также использоваться для установления сегрегации аллелей в локусе ((QTL или отдельного гена), которые генетически или физически тесно сцеплены с маркерным положением).

"Оперативно связанный" означает связанный в общей молекуле нуклеиновой кислоты таким образом, что соединенные элементы расположены и ориентированы относительно друг друга так, что обеспечивается транскрипция молекулы нуклеиновой кислоты. ДНК, оперативно связанная с промотором, находится под транскрипционным контролем этого промотора.

Примерами "органов" растений являются листья, побеги, стебли, корни, вегетативные почки, меристемы, зародыши, пыльники, семязачатки или плоды. "Части" растения означает комбинацию нескольких органов, например цветка и семян, или часть органа, например, поперечный разрез стебля. Примерами "тканей" растения являются каллусная ткань, запасаящая ткань, меристемная ткань, ткань листьев, почки, корня, опухольная ткань растения или репродуктивная ткань. Термин "клетки" следует понимать как означающий выделенные клетки растения, имеющие клеточную стенку, или их агрегаты, либо протопласты.

В контексте изобретения, если не указано иное, "растение" может представлять собой любой вид двудольного, однодольного или голосемянного растения. Предпочтительно, чтобы растения были однодольными растениями и представляли интерес для сельского хозяйства и растениеводства или для получения биоэнергии (биоэтанола, биогаза и т.п.). Примерами таких растений являются *Gossypium sp.*, *Zea mays*, *Brachypodium distachyon*, *Triticum sp.*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Sorghum sp.*, *Musa sp.*, *Saccharum officinarum*, *Secale cereal*, *Avena sp.*, газонные и кормовые травы. Предпочтительным растением по данному изобретению является растение рода *Zea*, в частности, *Zea mays* или *Sorghum*.

В связи с настоящим изобретением термин "регуляторная последовательность" означает нуклеотидную последовательность, которая обуславливает специфичность и/или уровень экспрессии, например, в случае, когда регуляторная последовательность придает специфичность определенной ткани. Регуляторная последовательность указанного типа может находиться как вверх по течению от точки инициации транскрипции минимального промотора, так и вниз по течению от нее, например в транскриби-

руемой, но не транслируемой лидерной последовательности или внутри интрона.

Выражение "устойчивость" или "устойчивый" относительно патогена следует понимать как означающее способность растения или растительной клетки противостоять поражающему воздействию патогена, заключающемуся в задержке развития заболевания до его полного подавления. В связи с настоящим изобретением растение/растительная клетка являются устойчивыми или растение/растительная клетка проявляют устойчивость к патогену *Helminthosporium turcicum* (*H.turcicum* или НТ), т.е. к северному гельминтоспориозу (NCLB). Устойчивость обеспечивается одним или несколькими белками, которые кодируются геном или генами (генами, придающими устойчивость) исходного сорта *Peritilla*. Устойчивость может быть полной или частичной, специфической или неспецифической относительно рас патогена. В случае расоспецифической устойчивости к патогену вирулентные расы *Helminthosporium turcicum* могут, например, включать N, 1N, 2N, 23N или 123N, а авирулентные расы могут, например, включать 0, 1, 2, 3, 12, 23 или 123. Придаваемая устойчивость может быть вновь приобретаемой устойчивостью или повышением уже имеющейся частичной устойчивости.

"Трансгенное растение" представляет собой растение, в геном которого интегрирован по меньшей мере один полинуклеотид, предпочтительно гетерологичный полинуклеотид. Предпочтительно, чтобы интеграция полинуклеотида была стабильной, что означает, что интегрированный полинуклеотид должен оставаться стабильным в растении, стабильно экспрессироваться и стабильно передаваться потомкам. Стабильная вставка полинуклеотида в геном растения также включает интеграцию в геном растения предыдущего поколения родителей, что дополнительно способствует стабильному наследованию полинуклеотида. Термин "гетерологичный" означает, что встраиваемый полинуклеотид происходит, например, из клетки или организма иного генетического фона того же вида или другого вида, либо является гомологичным с прокариотической или эукариотической клеткой-хозяином, но в таком случае локализуется в разной генетической среде и таким образом отличается от возможного соответствующего естественно встречающегося полинуклеотида. Гетерологичный полинуклеотид может присутствовать в дополнение к соответствующему эндогенному гену.

Далее будут описаны варианты осуществления изобретения в качестве примеров со ссылкой на прилагаемые рисунки и последовательности.

Фиг. 1 - рассчитанный QTL район размером 23,11 сМ на хромосоме 8 с использованием 8 маркеров у 528 F2 растений RP1 × RP1HTN1 скрещивания. Черные полосы (HtN) показывают доверительный интервал. Расстояния между маркерами вычислены в сантиморганах (сМ);

фиг. 2 - результаты испытаний урожайности силосной массы в 5 локациях в Германии в двух повторностях с использованием рекуррентного родителя RP3 и А-версии донорного фрагмента В37HTN1 (RP3HTNA) и К-версии донорного фрагмента В37HTN1 (RP3HTNK). Полосы показывают значительные различия при использовании t-теста, $p=0,05$;

фиг. 3 - характеристика маркерных участков М1-М6, определяющих хромосомные интервалы (Int. 1-Int. 5), которые проявляют придающий устойчивость полинуклеотид у интрогрессивных линий и несут наследование, сцепленное с фрагментом хромосомы, происходящей от донора. Хромосомные сегменты донора (*Peritilla*) показаны как пунктирные участки, рекуррентного родителя (без сцепленного наследования) как участки с диагональными полосками. Интервал 1 (Int. 1) покрывает локус HTN1, интервал 2 (Int. 2) покрывает районы последовательностей, отвечающих в доноре за сцепленное наследование периода цветения, интервалы 4 и 5 (Int. 4 и 5) покрывают районы последовательностей, отвечающих за сцепленное наследование урожайности силосной массы у донора;

фиг. 4 - ВАС контиг на основе его RP4HTN1 ВАС библиотеки с соответствующими скаффолдами и аннотациями генов. Гены-кандидаты показаны квадратными клетками. Черными стрелками обозначены другие аннотированные гены, не являющиеся генами-кандидатами HTN устойчивости.

1) Эксперименты по фенотипированию.

А) Проведение полевых испытаний для определения НТ-устойчивости в условиях естественной и искусственной инокуляции/заражения и периода цветения.

В локацию высаживали отдельными рядами по меньшей мере по 20 индивидуумов растений каждого испытуемого генотипа кукурузы. Проводили естественную и искусственную инокуляцию. Естественную инокуляцию/заражение осуществляли встречающимися в природе спорами *H.turcicum*. Искусственную инокуляцию/заражение осуществляли с использованием зараженного и опавшего листового материала, принадлежащего испытуемым растениям. Последний тип инокуляции позволял симулировать сравнительное заражение *H.turcicum* в различные годы проведения испытаний и в различных локациях независимо от преобладающих там условий естественного заражения. Одного чувствительного родителя и одного родителя с интрогрессией HTN1 из В37HTN1 выращивали в качестве контрольных генотипов в зависимости от популяции, испытываемой в скрещивании. Показатели количественных признаков НТ-устойчивости отмечали по меньшей мере трижды за вегетационный период. Использовали только схему количественной шкалы, представленную в табл. 3.

Донорный В37HTN1 в качестве источника НТ-устойчивости скрещивали с различным генетическим фоном элитных линий, обладающих различным уровнем чувствительности к *H.turcicum*, и получали почти изогенные линии, которые отличались от исходных чувствительных линий только наличием

интрогрессии В37HTN1. В экспериментах по фенотипированию после искусственной инокуляции, как описано выше, отбирали линии, которые проявляли улучшение HT-устойчивости по меньшей мере по 2-3 количественным признакам, предпочтительно 3-4 количественным признакам, в результате придающей устойчивость интрогрессии В37HTN1. Далее настоящее изобретение будет описано более подробно на примере двух отобранных рекуррентных родителей RP1 и RP3. Результаты экспериментов по фенотипированию суммированы в табл. 5. Рекуррентный родитель RP1 без интрогрессии проявлял в среднем 7-9 количественных признаков, которые были улучшены на 3-4 количественных признака за счет интрогрессии В37HTN1. Рекуррентный родитель RP3 без интрогрессии проявлял 4-6 количественных признаков, которые были улучшены на 2-3 количественных признака за счет интрогрессии.

Таблица 5. Данные фенотипирования HT-устойчивости генотипов RP1, RP3 и RP4 с придающей устойчивостью интрогрессией или без придающей устойчивостью интрогрессии В37HTN1 (показатели количественных признаков определялись в соответствии со схемой, представленной в табл. 3)

| Генотип | Средние количественные показатели (n=20) без интрогрессии В37HTN1 | Улучшение HT-устойчивости с интрогрессией В37HTN1 |
|---------|---|---|
| RP1 | от 7 до 9 | от 3 до 4 |
| RP3 | от 4 до 6 | от 2 до 3 |
| RP4 | 6 | от 2 до 3 |

В дополнение к HT-устойчивости определяли период цветения мужских и женских цветков в "днях после посева". Период цветения женских цветков определяли по появлению шелковистых нитей; период цветения мужских цветков определяли по появлению метелок. Более подробные результаты даны в примере 3.В).

В) Проведение полевых испытаний для определения урожайности зерна и силосной массы.

Кроме данных, касающихся HT-устойчивости и периода цветения, определяли урожайность RP3, содержащей различной длины фрагменты придающей устойчивостью интрогрессии В37HTN1 или *Peritilla* и сравнительной элитной линии. Линии RP3, RP3HTNA и RP3HTNK опыляли тестером (кремнистая кукуруза, единичное скрещивание между пулами) дополнительного пула генов (кремнистая кукуруза) для получения запаса семян испытуемых гибридов. Эти испытуемые гибриды выращивали в двукратной повторности в полевых условиях в пяти репрезентативных локациях возделывания кукурузы в Германии. Испытуемые гибриды были лучше приспособлены для условий выращивания в указанных регионах по срокам созревания. Полевые испытания проводили в двукратной повторности в 4-рядных делянках, длина делянки - 6 м, расстояние между рядками - 0,75 м. Густота стояния составляла 9 растений на квадратный метр в первом варианте опыта и 11 растений на квадратный метр во втором варианте опыта. В нужный срок урожай силосной массы кукурузы собирали с двух центральных рядков каждой делянки с целью минимизации "эффекта крайнего ряда". Определяли вес собранного материала из каждой делянки и содержание влаги в собранном материале для расчета урожайности кукурузы на силос (также известна как урожайность силоса или урожайность общей сухой массы) и содержания сухого вещества (общего содержания сухого вещества).

С) Проведение испытаний в условиях теплицы для определения HT-устойчивости.

По 20 индивидуальных растений каждого генотипа выращивали в горшках. Контрольными генотипами служили в зависимости от скрещивания генотипы чувствительного родителя и почти изогенного родителя (NIL) с интрогрессией придающей устойчивость В37HTN1. Через 14 дней после посева проводили искусственное заражение (см. выше). Спустя еще 2-3 недели появлялись первые симптомы заболевания. Со времени появления первых симптомов каждый последующий день определяли количественные показатели признака HT-устойчивости, а также количество растений с симптомами поражения. На основе этого определяли AUDPC (зона кривой развития болезни). Для классификации исследуемых растений применяли показатели частоты поражения (как % времени × период); в данном случае считали, что растения с AUDPC 0-100 были устойчивыми, с AUDPC 101 - 450 были гетерозиготными и с AUDPC > 450 были чувствительными.

2) Разработка маркеров для целевой области HTN1.

В дополнение к опытам по определению количественных показателей более подробно исследовали целевую область вокруг локуса устойчивости HTN1 на хромосоме 8 (бин 8,06) многих генотипов и осуществили ее тонкое картирование с применением новых и/или оптимизированных систем молекулярных маркеров. Используемые здесь маркеры были разработаны на основе однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) или уже широко доступных маркеров простых повторяющихся последовательностей (SSR).

ДНК генотипов для использования в качестве маркеров выделяли, используя набор NucleoSpin 96 Plant II в соответствии с руководством производителя (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Германия) или набор Klear Gene DNA Extraction 384 (LGC Genomics GmbH, Германия).

Последовательности праймеров SSR-маркеров уже имеются в открытой базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) на <http://www.ncbi.nih.gov/unists>; последовательности праймеров маркеров bnlgl782, umc1960, bnlgl240, umc1121, bnlgl1067 и umc1287, которые использовались для исследования целевой области, приведены в табл. 6 вместе с произведенными модификациями.

Таблица 6. Последовательности праймеров для SSR-маркера (NED: 2'-хлоро-5'-флуоро-7',8'-fused фенил-1,4-дихлоро-6-карбоксихлорофлуоресцеин; FAM: 6-карбоксихлорофлуоресцеин; M13: коровая последовательность фага M13)

| Маркер | SEQ ID NO: Прямой праймер (5'-3') | Модификация | SEQ ID NO: Обратный праймер (5'-3') | Модификация | Дополнительный праймер + модификация |
|----------|-----------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------|--------------------------------------|
| bnlg1782 | 113 | NED | 114 | отсут. | |
| umc1960 | 115 | NED | 116 | отсут. | |
| bnlg240 | 117 | FAM | 118 | отсут. | |
| umc1121 | 119 | FAM | 120 | отсут. | |
| bnlg1067 | 121 | FAM | 122 | отсут. | |
| umc1287 | 123 | отсут. | 124 | отсут. | M13+FAM |

Объем реакционной смеси bnlg1782, umc1960, bnlg240, umc1121 и bnlg1067 для проведения ПЦР составлял 10 мкл и состоял из одного 4-кратно концентрированного буфера В (Solis BioDyne, Эстония), 0,5 пмоль прямого праймера, 0,5 пмоль обратного праймера, 10-30 нг ДНК, 0,25 единиц ТАQ-полимеразы марки HotFirepol (Solis BioDyne, Эстония). Объем реакционной смеси umc1287 составлял 10 мкл и состоял из одного 4-кратно концентрированного буфера В (Solis BioDyne, Эстония), 0,5 пмоль прямого праймера, 2,5 пмоль обратного праймера, 0,3 пмоль дополнительного праймера M13, 10-30 нг ДНК, 0,25 единиц ТАQ-полимеразы марки HotFirepol (Solis BioDyne, Эстония).

ПЦР проводили в следующем режиме: начальная денатурация при 94°C в течение 900 с, 25-40 циклов амплификации при 94°C в течение 15 с, при 50-55°C в течение 30 с и при 72°C в течение 120 с, и финальная стадия при 72°C в течение 300 с. Затем реакционную смесь ПЦР инкубировали при 65°C в течение 2 ч. Продукты ПЦР разделяли в ABI3730xl (Life Technologies™, США) в соответствии с руководством производителя, касающемся разделения фрагментов размером 50-400 п.о.

SNP-маркеры разрабатывали и использовали из: (а) открытого источника, (б) сравнительного анализа секвенирования ампликонов или (с) сравнения последовательностей ВАС-клонов RP4HTN1 (см. молекулярный анализ сегментов) и В73 референсного генома AGPv02 (www.maizesequence.org).

(а) SNP трансформировали в KASP-маркеры (LGC Genomics GmbH, Германия) из открытого SNP источника от Maize Community 50K-Illumina-Chip (Ganal и соавт., 2011). Разрабатывали новые праймеры для амплификации доминантных аллелей методом, основанным на использовании KASP-маркера (см. табл. 4). Все операции проводились с использованием программного обеспечения Kraken™ (LGC Genomics GmbH, Германия). Амплификацию с KASP-маркером проводили в 1536-луночном планшете в присутствии 5-20 нг ДНК, 0,02 мкл испытательной олиго смеси (12 мкМ аллель-специфичного праймера 1 (прямого); 12 мкМ аллель-специфичного праймера 2 (прямого); 30 мкМ обратного праймера) и 1,5 мкл реагента из набора 1xKASPar. Стандартная постановка ПЦР состояла из 15 мин при 94°C, 10 циклов в течение 20 с при 94°C, ступенчатой ПЦР в течение 1 мин при 61-55°C, 26 циклов в течение 20 с при 94°C и в течение 1 мин при 55°C. Оценку аллелей по генотипу проводили с использованием программного обеспечения Kraken™ (LGC Genomics GmbH, Германия).

(б) Сравнительное секвенирование ампликонов проводили с помощью метода Сэнгера. Каждый генотип в сравниваемых последовательностях содержал донорный В37HTN1, а также В37, RP1, RP1HTN1, RP3, RP3HTN1 (версии А, В, К) RP4, RP4HTN1. ДНК выделяли из дробленых зерен СТАВ-методом (Maniatis и соавт., 1982). Последовательности праймеров для секвенирования ампликонов перечислены в табл. 4. Стандартный ПЦР протокол амплификации соответствующих участков состоял из денатурации при 94°C в течение 5 мин, 35 циклов при 94°C в течение 1 мин каждый, при 60°C в течение 1 мин и при 72°C в течение 2 мин и завершающей стадии при 72°C в течение 10 мин. Продукты ПЦР секвенировали по Сэнгеру (Sanger & Coulson, 1975). Оценку последовательностей проводили с использованием программного обеспечения DNASTar Lasergene (DNASTAR Inc., США). Детектируемые полиморфизмы трансформировали в KASP-маркеры, как показано в (а).

(с) Контиги последовательностей ВАС-клонов проектировали по В73 референсному геному AGPv02 с использованием алгоритмов Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) для детекции однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Полиморфизмы детектировали при помощи программного обеспечения Lasergene (DNASTAR Inc., США). Они показаны в табл. 4 вместе с фланкирующими последовательностями. Разрабатывали праймеры для фланкирующих последовательностей SNP и идентифицированные SNP трансформировали в KASP-маркеры, как показано в (а).

3) Локализация локуса устойчивости HTN1 на хромосоме 8 с использованием SSR-маркера.

А) Локализация локуса устойчивости HTN1.

Локус устойчивости HTN1 из донорных В37HTN1 скрещивали с элитными линиями, как показано в

примере 1.А), и локализовали на хромосоме 8 (бин 8,06) с помощью SNP- и SSR-маркеров по примеру 2 (см. фиг. 1). Почти изогенные линии (NIL) от скрещиваний RP1 × RP1HTN1 и RP3 × RP3HTN1 в течение нескольких лет фенотипировали в двух локациях в условиях естественного заражения, используя схему количественных признаков, приведенную в табл. 3. NIL демонстрировали улучшение признака устойчивости в среднем по 4 количественным показателям по сравнению с исходной линией. Период развития локальных поражений на листьях сдвигался приблизительно на 2 недели по сравнению с чувствительным генотипом. QTL картирование проводили по 528 индивидуумам F2 (RP1 × RP1HTN1 скрещивание) с помощью 8 маркеров (табл. 4 и 6 составлены на основе маркеров для QTL картирования фиг. 1). Область QTL, которая покрывала локус устойчивости HTN1, была локализована на хромосоме 8 между маркерами MA0002 и шпс1287, в участке размером 23,1 сМ.

В) Скрещивание фрагмента донорного В37HTN1 с элитной линией кукурузы и идентификация и элиминация сцепленного наследования задержки периода цветения.

Донорный В37HTN1 скрещивали с KWS.элитой - элитной линией от KWS SAAT AG (Германия) и затем проводили возвратное скрещивание с KWS.элитой в течение пяти поколений. В каждом поколении возвратного скрещивания использовали молекулярные маркеры для отбора растений, гетерозиготных по целевой HTN области. Затем растение, отобранное из пятого поколения возвратного скрещивания, самоопыляли и с помощью молекулярных маркеров идентифицировали растения, гомозиготные по целевой HTN области.

Эти линии исследовали в полевых испытаниях в нескольких локациях. Определяли фенотипические данные HT-устойчивости и периоды цветения для генотипов В37HTN1, KWS.элиты и KWS.элиты.В37HTN1, как показано в примере 1. Генотипы с интрогрессией HTN1 проявляли ожидаемую HT-устойчивость по количественным признакам 1 - 3, в то время как исходная линия KWS.элиты - по 5-7 признакам. Более того, неожиданно, по сравнению с KWS.элитой, у генотипа KWS.элиты.В37HTN1 было отмечено смещение на 2 дня периода цветения как женских, так и мужских цветков. Такое смещение периодов цветения является негативным агрономическим признаком, обусловленным сцепленным наследованием, которое еще не отмечалось у этой формы вследствие интрогрессии HT-устойчивости из В37HTN1. Маркерные анализы позволили обнаружить локализацию сцепленного наследования, ответственного за задержку периода цветения, в районе между двумя маркерными участками интрогрессии В37HTN1 - между M1 и M2. Для этого генотипы В37HTN1, KWS.элита и KWS.элиты.В37HTN1 анализировали с помощью KASP-маркеров SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 и PZE-108077560 (см. фиг. 3 и табл. 4). SYN14136 и PZE-108076510 использовались для специфической детекции маркерного участка M1, SYN24931 и PZE-108077560 - для специфической детекции маркерного участка M2. В результате было установлено, что маркерный участок M1 располагается на 5'-конце локуса сцепленного наследования, а маркерный участок M2 прилегает к нему с 3'-конца. Маркерный анализ показал, что у В37HTN1 и KWS.элиты.В37HTN1, характеризующихся задержкой сроков цветения на два дня, проявлялись схожие аллели в участках M1 и M2, а также интервал между этими участками, в то время как KWS.элита цвела в обычные сроки и содержала другие аллели в участках M1 и M2 и интервал между ними.

Донорный В37HTN1 скрещивали с RP3 и затем проводили возвратное скрещивание с RP3 в течение трех поколений. В каждом поколении обратного скрещивания использовали молекулярные маркеры. Сначала отбирали растения, гетерозиготные по целевой HTN1 области, затем эти растения исследовали с помощью маркеров, равномерно распределенных по всему геному, с целью отбора по донорному геному. Растение, отобранное из третьего поколения возвратного скрещивания, самоопыляли и с помощью молекулярных маркеров идентифицировали растения, гомозиготные по целевой HTN1 области.

Далее донорный В37HTN1 скрещивали с рекуррентным родителем RP3 и RP4 и получали линии RP3HTNA и RP4HTNA в течение нескольких этапов возвратного скрещивания. Фенотипирование по HT-устойчивости показало улучшение от 5-7 количественных признаков у исходной линии RP3 до 1-3 признаков у RP3HTNA, а также улучшение от 6 количественных признаков у исходной линии RP4 до 2-3 признаков у RP4HTNA. Фенотипирование по периодам цветения показало, что периоды цветения у RP3 и RP3HTNA были сопоставимы с периодами цветения у RP4 и RP4HTNA. При помощи KASP-маркеров SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 и PZE-108077560 было показано, что RP3 и RP3HTNA несли схожие аллели в участках M1 и M2. Они не соответствовали донорному В37HTN1. В результате, таким образом, было установлено, что хромосомный сегмент интрогрессии В37HTN1, ответственный за задержку сроков цветения, располагался в хромосомном интервале между маркерными участками M1 и M2. Таким образом, у линии RP3HTNA было успешно удалено сцепленное наследование. Используя KASP-маркеры SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 и PZE-108077560 доказали свою эффективность в качестве инструментов "способствовавших селекции".

Фенотипирование RP3 и RP3HTNA также включало регистрацию урожайности зерна и силоса. Если урожайность зерна по генотипам сильно не отличалась, то урожайность силоса RP4HTNA показала явное, статистически значимое снижение по меньшей мере на 14 децитонн с гектара (дт/га) по сравнению с RP3, или более чем на 5%.

Использование синтезированных KASP-маркеров SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 и PZE-108077560 позволило отобрать линию RP1HTN1 по результатам скрещивания между В37HTN1 и рекуррентным родителем RP1, которая больше не проявляла сцепленного наследования задержки сроков цветения, а только снижение урожайности силосной массы, как у RP3HTNA. Для более точной молекулярной характеристики продолжили развивать RP1HTN1. Была создана популяция F2, включающая 724 индивидуума по результатам скрещивания RP1 × RP1HTN1. Затем поколение F3 самоопыляли и отбираемые растения F4 генотипировали и фенотипировали. Генотипирование проводили с помощью маркеров, приведенных в табл. 6, в детектируемом QTL участке размером 23,1 сМ. Фенотипирование проводили в различных локациях в двукратном повторе (см. пример 1). Рекомбинантные растения отбирали по участку QTL и коррелировали с данными фенотипирования. С целью получения новых рекомбинантных растений отбор включал растения, которые покрывали разные участки целевой области, а также гетерозиготные растения. Каждый год проводили два возвратных скрещивания с RP1 и отбирали отдельные растения. Таким образом получали новые рекомбинанты. Новые рекомбинанты фенотипировали в ходе полевых опытов и опытов в условиях теплицы (см. 1.) и генотипировали с целью разработки новых молекулярных маркеров в соответствии с 2.

Использование этих новых маркеров в генотипе RP3HTNA позволило идентифицировать маркерный участок M3, ограничивающий интрогрессию с 5'-конца, который может быть охарактеризован фланкирующими маркерами PZE-108093423 и PZE-108093748. В связи с этим PZE-108093423 должен был проявлять аллели рекуррентного родителя RP3, а PZE-108093748 должен был проявлять аллели донорного В37HTN1. На 3'-конце интрогрессия RP3HTNA определялась маркерами PZE-108107671 и SYN4196 последующего маркерного участка M6 (см. фиг. 3). PZE-108107671 нес аллели донорного В37HTN1, SYN4196 нес аллели рекуррентного родителя RP3. Интрогрессия RP3HTNA (далее именуемая версия А) соответствовала, между маркерными участками M3 и M6, донорному В37HTN1, однако за пределами этого участка она соответствовала рекуррентному родителю или другой линии, которая не несла аллелей донорного В37HTN1 в участке между M1 и M2. Указанную версию А интродуцировали в разные другие генетические фоны и проводили новые опыты по оценке урожайности, фенотипированию устойчивости и определению периодов цветения. Полученные результаты были сопоставимы с результатами, описанными для RP3HTNA. Таким образом, период цветения не сдвигался по сравнению с соответствующей линией без интрогрессии. Линия проявляла лучшую устойчивость к *Helminthosporium turcicum* по сравнению с исходной линией, либо, по меньшей мере, снижение урожайности силосной массы.

С) Идентификация и элиминация сцепленного наследования, отвечающего за снижение урожайности силосной массы.

Используемым донором служила линия RP3HTNA. Ее скрещивали с RP3 и самоопыляли в течение шести поколений. В каждом самоопыленном поколении в целевой области использовали молекулярные маркеры с целью уменьшения донорного фрагмента. Так как все геномные участки за пределами целевой области в геноме RP3 линии RP3HTNA уже были селектированы, с помощью маркеров исследовали только участок вокруг целевой области HTN. Идентифицировали растения, гомозиготные по степени уменьшения целевой области HTN. Одновременно интенсивно разрабатывались маркеры в целевой области. В дополнение ко многим другим идентифицировали линию RP3HTNK, которая характеризовала донорный фрагмент В37HTN1 из маркерного участка M4, фланкированного маркерами MA0004 и MA0005, при этом MA0004 определял аллели рекуррентного родителя RP3, а маркер MA0005 определял аллели донорной В37HTN1 в RP3HTNK до маркерного участка M5, фланкированного маркерами MA0006 и PZE-108097482, где MA0006 определял аллели донорной В37HTN1, а PZE-108097482 определял аллели рекуррентного родителя RP3. У RP3HTNK интрогрессия RP3HTNK (далее называемая версия К) обуславливала улучшение количественной устойчивости HTN1 на 3-4 признака по сравнению с RP3, одинаковый период цветения с исходной линией RP3 (задержка цветения отсутствовала) и отсутствие значительного снижения урожайности силосной массы (см. фиг. 2). Более того, с помощью описанных маркеров при скрещивании с исходной линией RP1 получались линии, в которых отсутствовало сцепленное наследование, причем эти линии проявляли версию К интрогрессии.

D) Придающий устойчивость гаплотип из В37HTN1 или *Peritilla*.

Версия К обладала гаплотипом из В37HTN1 или *Peritilla*, который нес донорные аллели, представленные в табл. 4, в физических положениях относительно В73 AGPv02, выражаемых в п.о. Например, если гаплотип по маркеру MA0008 может быть определен, как использующий маркер MA0008 для обозначения аллелей В37HTN1, RP3, RP3HTNA, RP3HTNK, тогда аллель "Т" предназначен для В37HTN1, RP3HTNA, RP3HTNK, а аллель "С" - для RP3. Для этого локуса указанный маркер также различает предполагаемый источник устойчивости HTN1 PH99N (WO 2011/163590), который также содержит аллель "С" в этом положении из описываемого здесь источника устойчивости.

4) Молекулярный анализ области тонкого картирования.

Фрагмент хромосомы, который был вставлен и усечен интрогрессией, исследовали на молекулярном уровне. Локус устойчивости Htn1 из исходного сорта *Peritilla* сокращали до четкой целевой области, хромосомный интервал 700 кб, и секвенировали генотип RP4HTN1. Как более подробно будет показано ниже, выделяли ВАС-клоны из RP4HTN1, секвенировали и собирали скаффолд. Скаффолд аннотировали

и гены, аннотированные в этом интервале, сравнивали с информацией о EST/кДНК последовательностях. Затем проводили анализ дифференциальной экспрессии ряда аннотированных генов для идентификации генов-кандидатов (см. табл. 1).

А) Конструирование ВАС банка и пула, скрининг ВАС банка, секвенирование ВАС-клонов.

ВАС банк получали из генотипа RP4HTN1. Затем конструировали ВАС банк и 3D-матрицу пула из листового материала и проводили скрининг 3D-матрицы пула. Праймеры для скрининга 3D-матрицы пула основывались на последовательности B73 AGPv01 размером от 149957158 до 152977351 п.о. на хромосоме 8 (www.maizesequence.org) и программе Primer 3 (<http://simgene.com/primer3>; Rozen & Skaletsky, 2000). Параметры для подбора праймеров: средний GC состав - 50%, длина праймера - 20-25 п.о., температура плавления - 70-90°C и длина ампликона - 70-80 п.о. Используя пары праймеров, представленные в табл. 7, проводили скрининг 3D пулов посредством ПЦР с обратной транскрипцией. ВАС-клонам задавали два параметра, в частности температура плавления и значение порогового цикла (СР). В селективируемой области смогли идентифицировать 26 ВАС-клонов. Все ВАС-клоны выбирали из ВАС банка и использовали в качестве *E.coli* культуры для выделения ДНК и секвенирования. Секвенирование проводили с использованием стандартного набора GS-FLX Titanium (454 Life Sciences, США). Информация о полученных последовательностях ВАС-клонов 144N24, 119F13, 219G11, 86N21, 16B06, 84L18, 128D02, 25M23, 96H10, 19J24, 136A01, 75H06, 135F07 суммирована в табл. 8.

Таблица 7. Пары праймеров для детекции ВАС-клонов из ВАС банка RP4HTN

| ВАС-клон ID | Пара праймеров 1 | Последовательность, пары праймеров 1 (5'-3') | Тем. плавления, °С (50% ампликонов одноцепочечные), генотип RP4HTN1 | Значение СЗ (пороговый цикл начала экспоненциальной фазы ПЦР) | Размер ампликона, п.о. |
|-------------|------------------|--|---|---|------------------------|
| | Пара праймеров 2 | | | | |
| 58A14 | 579ZMPMO_2F; | 125; | 77,4 | 28,5 | 74 |

| | | | | | |
|--------|----------------------------------|-------------|-------|-------|----|
| | 579ZMPMO_2R | 126 | | | |
| | 579ZMPMO_4F; 579ZMPMO_4R | 127; 128 | 80,96 | 26,52 | 77 |
| 144N24 | 579ZMPMO_5F; 579ZMPMO_5R | 129; 130 | 79,09 | 27,09 | 76 |
| | 579ZMPMO_17F; 579ZMPMO_17R | 131; 132 | 83,06 | 25,53 | 78 |
| 219G11 | 579ZMPMO_16F; 579ZMPMO_16R | 133; 134 | 84,07 | 25,96 | 78 |
| | 579ZMPMO_25F; 579ZMPMO_25R | 135; 136 | 78,95 | 26,09 | 80 |
| 119F13 | 579ZMPMO_22F; 579ZMPMO_22R | 137; 138 | 80,89 | 25,98 | 73 |
| | 579ZMPMO_34F; 579ZMPMO_34R | 139; 140 | 80,1 | 24,43 | 76 |
| 86N21 | 579ZMPMO_35F; 579ZMPMO_35R | 141; 142 | 80,9 | 25,27 | 70 |
| | 579ZMPMO_38F; 579ZMPMO_38R | 143; 144 | 83,86 | 26,01 | 71 |
| 16B6 | 579ZMPMO_37F; 579ZMPMO_37R | 145; 146 | 79,22 | 25,71 | 80 |
| | 579ZMPMO_41F; 579ZMPMO_41R | 147; 148 | 75,93 | 26,6 | 74 |
| 84L18 | 579ZMPMO_41F; 579ZMPMO_41R | 149; 150 | 75,93 | 26,6 | 74 |
| | 579ZMPMO_46F; 579ZMPMO_46R | 151; 152 | 80,54 | 25,68 | 78 |
| 128D2 | 579ZMPMO_180F; 579ZMPMO_180R2 | 153; 154 | 84,41 | 25,99 | 77 |
| | 579ZMPMO_48F; 579ZMPMO_48R | 155; 156 | 83,96 | 25,33 | 77 |
| 25M23 | 579ZMPMO_48F; 579ZMPMO_48R | 157; 158 | 83,96 | 25,33 | 77 |
| | 579ZMPMO_56F; 579ZMPMO_56R | 159; 160 | 77 | 29,12 | 79 |
| 19J24 | 579ZMPMO_51F; 579ZMPMO_51R | 161; 162 | 87,76 | 27,75 | 77 |
| | 579ZMPMO_199F; 579ZMPMO_199R | 163; 164 | 82,49 | 26,56 | 79 |
| 96H10 | 579ZMPMO_63F; 579ZMPMO_63R | 165; 166 | 85,78 | 26,08 | 63 |
| | 579ZMPMO_208F; 579ZMPMO_208R | 167; 168 | 79,87 | 26,84 | 79 |

| | | | | | |
|--------|---------------------------------|-------------|-------|-------|----|
| 136A1 | 579ZMPMO_206F; 579ZMPMO_206R | 169; 170 | 89,81 | 32,09 | 70 |
| | 579ZMPMO_86F; 579ZMPMO_86R | 171; 172 | 81,81 | 30,07 | 71 |
| 135F7 | 579ZMPMO_79F; 579ZMPMO_79R | 173; 174 | 75,82 | 25,43 | 72 |
| | 579ZMPMO_278F; 579ZMPMO_278R | 175; 176 | 78,13 | 22,69 | 78 |
| 75H6 | 579ZMPMO_209F; 579ZMPMO_209R | 177; 178 | 75,41 | 24,93 | 77 |
| | 579ZMPMO_86F; 579ZMPMO_86R | 179; 180 | 81,81 | 30,07 | 71 |
| 117O2 | 579ZMPMO_87F; 579ZMPMO_87R | 181; 182 | 81,89 | 27,7 | 76 |
| | 579ZMPMO_91F; 579ZMPMO_91R | 183; 184 | 80,13 | 26,93 | 75 |
| 173H23 | 579ZMPMO_216F; 579ZMPMO_216R | 185; 186 | 82,3 | 25,76 | 80 |
| | 579ZMPMO_95F; 579ZMPMO_95R | 187; 188 | 79,5 | 24,97 | 73 |
| 118N19 | 579ZMPMO_99F; 579ZMPMO_99R | 189; 190 | 76,84 | 24,69 | 80 |
| | 579ZMPMO_86F; 579ZMPMO_86R | 191; 192 | 80,07 | 25,38 | 80 |
| 42L23 | 579ZMPMO_241F; 579ZMPMO_241R | 193; 194 | 81,16 | 25,79 | 79 |
| | 579ZMPMO_109F; 579ZMPMO_109R | 195; 196 | 77,89 | 25,28 | 74 |
| 112N13 | 579ZMPMO_109F; 579ZMPMO_109R | 197; 198 | 77,89 | 25,28 | 74 |
| | 579ZMPMO_247F; 579ZMPMO_247R | 199; 200 | 80,76 | 24,82 | 71 |
| 97K23 | 579ZMPMO_112F; 579ZMPMO_112R | 201; 202 | 79,22 | 25,2 | 77 |
| | 579ZMPMO_125F; 579ZMPMO_125R | 203; 204 | 83,44 | 28,17 | 74 |
| 18J17 | 579ZMPMO_253F; 579ZMPMO_253R | 205; 206 | 77,5 | 32,34 | 71 |
| | 579ZMPMO_125F; 579ZMPMO_125R | 207; 208 | 83,44 | 28,17 | 74 |
| 5M22 | 579ZMPMO_128F; 579ZMPMO_128R | 209; 210 | 77,99 | 24,05 | 77 |
| | 579ZMPMO_136F; 579ZMPMO_136R | 211; 212 | 78,65 | 26,46 | 78 |
| 146I6 | 579ZMPMO_131F; 579ZMPMO_131R | 213; 214 | 76,58 | 26,54 | 78 |
| | 579ZMPMO_137F; 579ZMPMO_137R | 215; 216 | 83,7 | 25,42 | 73 |
| 147O15 | 579ZMPMO_138F; 579ZMPMO_138R | 217; 218 | 79,38 | 24,8 | 79 |
| | 579ZMPMO_147F; 579ZMPMO_147R | 219; 220 | 79,63 | 26,77 | 80 |
| 88K17 | 579ZMPMO_145F; 579ZMPMO_145R | 221; 222 | 81,51 | 27,61 | 76 |
| | 579ZMPMO_262F; 579ZMPMO_262R | 223; 224 | 75,7 | 25,82 | 80 |
| 180G22 | 579ZMPMO_161F; 579ZMPMO_161R | 225; 226 | 80,21 | 25,16 | 73 |
| | 579ZMPMO_265F; 579ZMPMO_265R | 227; 228 | 79,3 | 24,7 | 79 |

Таблица 8. Содержание последовательностей 13 изученных ВАС-клонов

| ВАС | #Ридов | #Ридов без <i>E. coli</i> | Размер последовательности, п.о. | Размер последовательности, п.о. без <i>E. coli</i> |
|--------|--------|---------------------------|---------------------------------|--|
| 144N24 | 10967 | 10849 | 3646226 | 3591222 |
| 119F13 | 17987 | 17847 | 6033910 | 5957456 |
| 219G11 | 32904 | 32484 | 10553629 | 10381924 |
| 86N21 | 39606 | 39106 | 12991596 | 12750077 |
| 16B06 | 36198 | 35849 | 12523123 | 12357036 |
| 84L18 | 50537 | 34162 | 15991645 | 10776458 |
| 128D02 | 15998 | 15847 | 5138442 | 5064677 |
| 25M23 | 22551 | 22416 | 7864493 | 7786402 |
| 96H10 | 7723 | 7614 | 2569604 | 2525488 |
| 19J24 | 21953 | 21775 | 7327364 | 7234315 |
| 136A01 | 31998 | 31724 | 10298869 | 10158900 |
| 75H06 | 24345 | 24121 | 8021727 | 7920125 |
| 135F07 | 29702 | 29484 | 9721708 | 9604010 |

Создание скэффолда: ВАС-клоны 144N24, 119F13, 219G11, 86N21, 16B06, 84L18, 128D02, 25M23, 96H10, 19J24, 136A01, 75H06, 135F07 секвенировали с использованием технологии "454" (Margulies и соавт., 2005).

Автоматическую сборку "сырых" последовательностей ВАС-клонов осуществляли с помощью программного обеспечения "Newbler" (454runAssembly software, версия 2.3). Получаемые таким образом пропоследовательности ВАС-клонов правильно располагали, используя следующую методику ручного анализа:

(1) последовательности перекрывающихся ВАС-клонов грубо разделяли на перекрывающиеся и неперекрывающиеся зоны;

(2) в перекрывающихся зонах сравнивали контиги различных перекрывающихся ВАС-клонов. Таким образом располагали приблизительно 20% контигов и заполняли пробелы между ними (например, когда контиг одного ВАС-клона перекрывал или был связан с двумя контигами других ВАС-клонов);

(3) все контиги аннотировали вручную. Вначале аннотировались только повторяющиеся элементы (транспозоны и ретротранспозоны, сокращенно ТЕ). Поскольку пробелы в последовательностях встречаются прежде всего у ТЕ, то аннотирование ТЕ способствует правильному расположению контигов. Это означает, что если один край ТЕ находится на одном контиге, а второй край находится на другом контиге, то оба контига могут упорядочиваться соответствующим образом. В таких случаях соответственно вставляется последовательность из 100 Ns, чтобы заполнить пробелы между контигами. Кроме того, для расположения контигов использовали информацию о "гнездящихся" ТЕ (т.е. ТЕ, встроенных в другие ТЕ);

(4) в некоторых зонах было невозможно использовать информацию о перекрывающихся ВАС-клонах или аннотациях ТЕ (например, в зонах, покрываемых одним ВАС-клоном). В этих зонах контиги располагали произвольно и пробелы между ними заполняли последовательностями из 200 Ns;

(5) многие ТЕ в геноме кукурузы представляют собой "длинные терминальные повторы" (LTR), фланкированные длинными (1-2 Кб) LTR-последовательностями. LTR-последовательности могут быть 100% идентичными. В некоторых случаях сырые последовательности из двух LTR-последовательностей собирали в одну консенсусную последовательность (т.е. копия LTR отсутствовала в сборке). В таких случаях пробелы между последовательностями заполняли количеством Ns, соответствующим длине второй LTR;

(6) гены аннотировали вручную. В этом случае в качестве референсных использовали кодирующие последовательности (CDS) генома кукурузы В73 (http://www.maizegdb.org/gene_model.php). CDS выравнивали с последовательностью RP4HTN, используя DotPlot (<http://www.dotplot.org/>) и таким образом определяли положения экзонов и интронов. С одной стороны, гены-кандидаты определяли по описанию их функции (если было в открытом доступе). С другой стороны, CDS устойчивой RP4HTN сравнивали с чувствительной В73 AGPv02. Если встречались различия, соответствующий ген помещали в список кандидатов. Полученная последовательность имела длину в 1328253 п.о. Перечень генов-кандидатов приводится в табл. 1.

5) Молекулярный анализ генов-кандидатов.

Анализ экспрессии: экспрессию различных генов-кандидатов проверяли на 21-й день (после высева), непораженные растения (0 дней после заражения = 0 dpi), а также на 36-й день с растениями, которые были заражены и которые не были заражены *H. turcicum* (15 дней после заражения = 15 dpi inf/ni).

Из вторых листьев исследуемых растений кукурузы экстрагировали РНК, проводили обратную транскрипцию РНК в кДНК и измеряли экспрессию с помощью количественной ПЦР (кПЦР). В каждом случае второй лист собирали, замораживали и экстрагировали РНК, определяли количество и анализировали качество и чистоту с помощью набора SV Total RNA Isolation System (Z3100; Promega, Дюбендорф, Швейцария), как точно описано (Brunner и соавт., 2011; Risk и соавт., 2012).

Проводили обратную транскрипцию 1 мкг РНК с использованием iScript RT Supermix (170-8841;

Bio-rad, Крессье, Швейцария) в реакционном объеме 20 мкл согласно параметрам производителя. Чтобы исключить вероятность заражения геномной ДНК (RT минус), одновременно реакционную смесь каждой пробы инкубировали без добавления обратной транскриптазы.

Количественную ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) при трехкратном или двукратном повторении циклов проводили в реакционном объеме 10 мкл с добавлением 4 мкл разбавленной (1:10) кДНК (10 mM Tris HCL pH8, 0,1 mM EDTA), 5 мкл SsoFast EvaGreen® Supermix (172-5201; BioRad, Швейцария) и праймера в концентрации 400 нМ в приборе C1000Touch Cyler (BioRad, Швейцария). Амплификацию проводили при следующих параметрах: 95°C - 30 с; 40 циклов: 95°C - 3 с, 60-63°C (см. табл. 2) - 5 с. Для анализа кривой плавления (очистки от димеров праймеров) продукт ПЦР нагревали от 65 до 95°C с шагом 0,5°C. Кривые амплификации и кривые плавления оценивали с помощью программы CFX Manager V 3.0 (BioRad, Швейцария). Значения Cq (цикла для количественных оценок) экспортировали в базу данных программы qbasePLUS V 2.3 (Biogazelle, Zwijnaarde, Бельгия) для определения относительной экспрессии.

Праймеры генов-кандидатов определяли с помощью программы primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) с тем, чтобы, насколько возможно, исключить неспецифическую амплификацию транскриптов, которые уже были известны. Для оценки подходящих ампликонов продукты ПЦР разделяли с использованием электрофореза в агарозном геле, размер продуктов изучали с помощью изолированных полосок. Кроме того, ампликоны RP1HtN и NILHtN, представленные в табл. 1, секвенировали. Для нормализации данных экспрессии использовали 1-3 референсных гена (LUG, MEP, FPHS) (Mano-*li* и соавт., 2012).

Все гены-кандидаты экспрессировались в чувствительном генотипе RP1 и в устойчивом генотипе RP1HTN. Дифференциальная экспрессия наблюдалась у RLK1. RLK1 у чувствительных растений экспрессировался в 4 раза сильнее, чем у устойчивых растений.

Таблица 9. Пары праймеров генов-кандидатов (длина ампликонов в п.о.) и соответствующая температура отжига

| Ген | Праймер | SEQ ID NO: | Последовательности праймеров (F=прямая; R=обратная) | Длина в RP1, п.о. | Длина в RP1HTN, п.о. | Тем отжига |
|------|---------|------------|---|-------------------|----------------------|------------|
| ZNF1 | GH034 | 229 | F: TGGTTGGTGTCTGAAGCTGAG | 130 | 130 | 60°C |
| | GH033 | 230 | R: | | | |
| HYD | GH039 | 231 | ATTTATCCCGGCCTTTCAT | 74 | 74 | 60°C |
| | GH040 | 232 | F: GATCTACAGGGAAGCCSAC TGA | | | |
| | | | R: TTTTTCCTTGAGGCAGTTAT ATGCT | | | |
| RLK4 | GH220 | 233 | F: TTGTGCAGCGGAGGGAA | 91 | 85 | 63°C |
| | GH221 | 234 | R: CCAGGGCACCAGCAAGAAT | | | |
| EXT1 | GH168 | 235 | F: CGACTACAAGACGCGTACC | 103 | 103 | 60°C |
| | GH170 | 236 | R: GGTGTCTGATGGTGGAGGTTT | | | |
| RLK1 | GH138 | 237 | F: TATTGTTGGTGTCTTGCCG | 121 | 121 | 60°C |
| | GH139 | 238 | R: GGACTCAATCCTTGTCCCTG | | | |
| RET1 | GH055 | 239 | F: CGCTCGTTGCCAGATAGCC | 165 | 165 | 60°C |
| | GH056 | 240 | R: CACGGTGTGTGTCCAGTTTGT | | | |

Скрининг популяции TILLING и детекция мутантов. Для генов-кандидатов (табл. 1) результаты скрининга популяции TILLING из 1000 растений, которая несла интрогрессию из *Peritilla* в хромосоме 8 в участке от 151688552 до 153139596 п.о. и проявляла устойчивость к *Helminthosporium turcicum*, сравнивали с референсной B73 AGPv02 (www.maizesequence.org) (RP3HTN1). Мутации могли представлять собой либо "молчаливые" замены нуклеотидов, либо замены аминокислот или терминирующие кодоны, и применялись для детекции генов-кандидатов.

Трансформация. Например, гены-кандидаты могли интродуцироваться в чувствительный генотип A188 посредством опосредованной *Agrobacterium tumefaciens* трансформации. Этот генотип определяется значениями AUDPC 702 в GWH-анализе 3 (n=18 растений). Таким образом, трансформация с геном устойчивости давала четкий ответ устойчивости.

6) Определение расовой специфичности: подтверждение, что HTN1 также придает расонеспецифическую устойчивость.

Скрининг генотипов с геном HtN проводили во многих локациях всех регионов Европы, где наблюдалось заражение. До сих пор эта устойчивость не была нарушена, поэтому вначале было предположено, что до сих пор указанные генотипы были расоспецифическими, пока не была обнаружена раса N. Раса 1 преобладает в Европе, однако в некоторых отдельных регионах обнаруживались расы 2 или 3 или их комбинация (Напекамр и соавт., 2013).

7) Исследование фенотипа по другим рекомбинантным растениям.

Новые рекомбинантные растения анализировали по признакам QTL области и результаты коррелировали с данными фенотипирования. Отбор включал растения, которые покрывали разные участки целевой области. Идентифицировались рекомбинантные растения, которые проявляли интрогрессию донорной B37HTN1 между маркерами MA0005 и MA0021 - маркерный участок M7 и между маркерами MA0013 и MA0022 - маркерный участок M8 в генетическом фоне RP1. Эта область, показанная на фиг. 4, включает только три гена RLK4, EXT1 и RLK1. Указанные рекомбинантные растения, содержащие участок M7-M8, проявляли устойчивость в фенотипе как в испытаниях в полевых условиях с искусственной инокуляцией, так и в испытаниях в условиях теплицы.

8) Идентификация гена-кандидата, придающего устойчивость.

Для идентификации гена-кандидата, придающего устойчивость, проводили скрининг популяции TILLING из 1000 растений, которая несла интрогрессию из Pepitilla в хромосоме 8 в участке от 151688552 до 153139596 п.о. и проявляла устойчивость к *Helminthosporium turcicum*, и сравнивали результаты с референсной B73 последовательностью AGPv02 (<http://www.genome.arizona.edu>) (RP3HTN1).

Создавали ампликоны генов RLK4 и RLK1 (табл. 10) и после амплификации ДНК каждого растения популяции TILLING проводили их секвенирование по Сэнгеру.

Таблица 10. Последовательности праймеров для ампликонов

| Ген | Праймер | SEQ ID NO: | Последовательности праймеров (F=прямая; R=обратная) | Длина ампликонов, п.о. | Температура отжига, °C |
|------|--------------|------------|---|------------------------|------------------------|
| RLK4 | MA04916-6f | 247 | F: TGTTTCAGGAATCACG CAACTGGA | 399 | 60 |
| | MA04916-6r | 248 | R: GCACCACGCCATGAC CAACATC | | |
| RLK1 | TG10013-10.f | 249 | F: CTTCCTACAGAAGAAC GAGAGT | 804 | 60 |
| | TG10013-11.r | | R: TTCCTCACGAGCTCTG TGGTC | | |

Последовательности ампликонов оценивали с использованием программного обеспечения DNAS-TAR Lasergene и идентифицировали мутации замены оснований. Обнаруженные мутации представлены в табл. 11.

Таблица 11. Идентифицированные мутации генов RLK4 и RLK1

| Ген | Мутация | Положение мутации в кДНК RP3HTN1, п.о. | Замена оснований | Положение мутации в последовательности белка RP3HTN1, п.о. | Эффект замены аминокислот |
|------|---------|--|------------------|--|---------------------------|
| RLK4 | RLK4d | 977 в SEQ ID NO: 3 | G > A | 326 в SEQ ID NO: 4 | G > D |
| | RLK4f | 1169 в SEQ ID NO: 3 | C > T | 390 в SEQ ID NO: 4 | T > I |
| RLK1 | RLK1b | 1365 в SEQ ID NO: 1 | G > A | 455 в SEQ ID NO: 2 | M > I |
| | RLK1d | 1490 в SEQ ID NO: 1 | G > A | 497 в SEQ ID NO: 2 | G > E |

Идентифицированные мутанты самоопыляли в условиях теплицы и собирали семена гомозиготных растений с аллелями дикого типа и аллелями, мутантными по событию мутации исследуемого фенотипа.

По 15 гомозиготных растений с аллелем дикого типа и мутантов с мутантным аллелем RLK1b, RLK1d, RLK4d и RLK4f и контрольные образцы RP1 и RP1HTN1 инокулировали *H.turcicum*, как показано выше, в условиях теплицы. Спустя 11-25 дней после инокуляции каждый день определяли поражение.

Значения AUDPC всех анализируемых растений приведены в табл. 12. Ожидалось, что замена аминокислот в устойчивой родительской линии RP3HTN1 популяции TILLING будет делать гомозиготных мутантов чувствительными.

Таблица 12. Значения AUDPC гомозиготных растений с аллелем дикого типа и мутантным аллелем генов RLK1 и RLK4

| Наименование мутанта | Аллели | AUDPC | Фенотип |
|----------------------|------------------|--------|----------------|
| RLK4d | Гом. мутант | 33,3 | устойчивый |
| | Гом. дикого типа | 0,0 | устойчивый |
| RLK4f | Гом. мутант | 46,7 | устойчивый |
| | Гом. дикого типа | 96,7 | устойчивый |
| RLK1b | Гом. мутант | 346,7 | гетерозиготный |
| | Гом. дикого типа | 46,4 | устойчивый |
| RLK1d | Гом. мутант | 406,7 | гетерозиготный |
| | Гом. дикого типа | 83,3 | устойчивый |
| RP1 | | 1030,0 | чувствительный |
| RP1HTN1 | | 0,0 | устойчивый |

В колонке, где указан фенотип, 0-100 означает устойчивый, 101-450 означает гетерозиготный и >450 означает чувствительный.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы донорного сорта *Peritilla*, характеризующееся тем, что указанный фрагмент содержит генетический сегмент донора, содержащий донорные аллели в соответствии с гаплотипом, представленным в табл. 2, и включает полинуклеотид, придающий устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы, при этом данный фрагмент хромосомы:

а) не содержит сегмент донорной ДНК между первым маркерным участком, который фланкирован маркером SYN14136, определяемым в ПЦП с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s 17 и 18 и маркером PZE-108076510, определяемым в ПЦП с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s 20 и 21, и вторым маркерным участком, который фланкирован маркером SYN24931, определяемым в ПЦП с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s 23 и 24 и маркером PZE-108077560, определяемым в ПЦП с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s 26 и 27; и/или

б) не содержит сегмент донорной ДНК между третьим маркерным участком, который фланкирован маркером PZE-108093423, определяемым в ПЦП с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 29 и 30 и маркером PZE-108093748, определяемым в ПЦП с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 32 и 33, и четвертым маркерным участком, который фланкирован маркером MA0004, определяемым в ПЦП с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 41 и 42, и маркером MA0005, определяемым в ПЦП с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 44 и 45; и/или

с) не содержит сегмент донорной ДНК между пятым маркерным участком, который фланкирован маркером MA0006, определяемым в ПЦП с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 47 и 48 и маркером PZE-108097482, определяемым в ПЦП с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 50 и 51, и шестым маркерным участком, который фланкирован маркером PZE-108107671, определяемым в ПЦП с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 35 и 36, и маркером SYN4196, определяемым в ПЦП с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 38 и 39, где полинуклеотид содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая:

- 1) включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1;
- 2) включает нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 по всей ее длине;
- 3) гибридизуется с комплементарной цепью молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с 1) или 2) в жестких условиях;
- 4) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;
- 5) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с 4).

2. Растение кукурузы по п. 1, отличающееся тем, что период цветения растения кукурузы и урожайность растения кукурузы на силос соответствует периоду цветения и урожайности сравняемого растения кукурузы, в геном которого не был встроено фрагмент хромосомы донорного сорта *Peritilla*.

3. Части растения кукурузы по любому из пп. 1, 2, в том числе клетки или ткани растения.

4. Семена растения кукурузы по любому из пп. 1-3.

5. Способ повышения урожайности растения кукурузы по п. 1, устойчивого к *H.turcicum*, геном которого содержит интегрированный в него указанный фрагмент донорного сорта *Peritilla*, характеризующийся тем, что фрагмент хромосомы содержит генетический сегмент донора, содержащий донорные аллели в со-

ответствии с гаплотипом, представленным в табл. 2, и содержит полинуклеотид, придающий устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы, при этом способ включает этапы удаления:

а) сегмента донорной ДНК между первым маркерным участком, который фланкирован маркером SYN14136, определяемым в ПЦР с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 17 и 18, и маркером PZE-108076510, определяемым в ПЦР с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 20 и 21, и вторым маркерным участком, который фланкирован маркером SYN24931, определяемым в ПЦР с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 23 и 24, и маркером PZE-108077560, определяемым в ПЦР с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 26 и 27; и/или

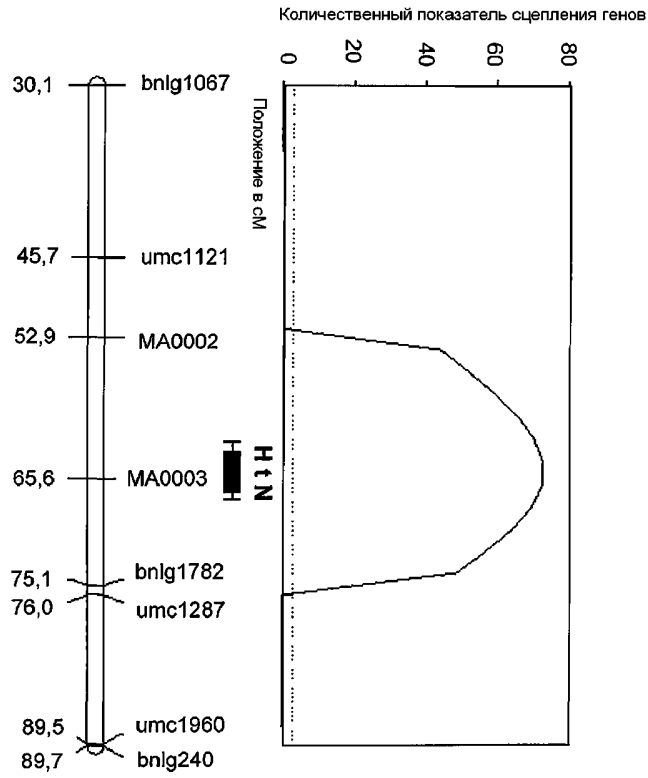
б) сегмента донорной ДНК между третьим маркерным участком, который фланкирован маркером PZE-108093423, определяемым в ПЦР с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 29 и 30, и маркером PZE-108093748, определяемым в ПЦР с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 32 и 33, и четвертым маркерным участком, который фланкирован маркером MA0004, определяемым в ПЦР с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 41 и 42, и маркером MA0005, определяемым в ПЦР с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 44 и 45; и/или

в) сегмента донорной ДНК между пятым маркерным участком, который фланкирован маркером MA0006, определяемым в ПЦР с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 47 и 48, и маркером PZE-108097482, определяемым в ПЦР с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 50 и 51, и шестым маркерным участком, который фланкирован маркером PZE-108107671, определяемым в ПЦР с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 35 и 36, и маркером SYN4196, определяемым в ПЦР с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NO_s: 38 и 39, где полинуклеотид содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая:

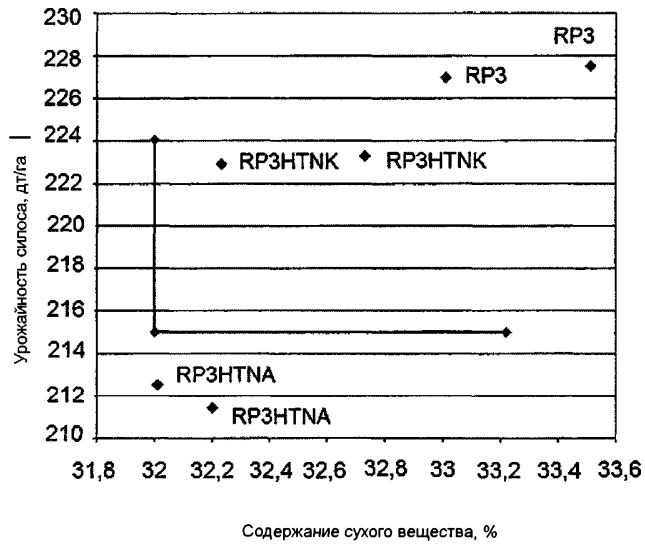
- 1) включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1;
- 2) включает нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 по всей ее длине;
- 3) гибридизуется с комплементарной цепью молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с 1) или 2) в жестких условиях;
- 4) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;
- 5) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с 4);

6. Олигонуклеотид для идентификации растения кукурузы, устойчивого к *Helminthosporium turcicum*, по п.1, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, которая имеет нуклеотидную последовательность, выбираемую из любой одной из SEQ ID NO: 41-49, 53-100 или 229-250.

7. Применение олигонуклеотида, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, которая имеет нуклеотидную последовательность, выбираемую из любой одной из SEQ ID NO: 17-250, для идентификации растения кукурузы, устойчивого к *Helminthosporium turcicum*, по п.1.



Фиг. 1



Фиг. 2

