

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091107** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2020.08.20**

(51) Int. Cl. *C07K 14/415* (2006.01)  
*C12N 15/82* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2018.10.31**

---

(54) **ПШЕНИЦА, СОДЕРЖАЩАЯ АЛЛЕЛИ-ВОССТАНОВИТЕЛИ МУЖСКОЙ  
ФЕРТИЛЬНОСТИ**

---

(31) **17306501.2; 17306500.4; 18305027.7;  
18306114.2**

(32) **2017.10.31; 2017.10.31; 2018.01.12;  
2018.08.14**

(33) **EP**

(86) **PST/EP2018/079816**

(87) **WO 2019/086510 2019.05.09**

(71) Заявитель:  
**ВИЛЬМОРЕН Э СИ; ЛИМАГРЕН  
ЭРОП (FR)**

(72) Изобретатель:  
**Варенн Пьеррик, Комадран Хорди,  
Спесель Себастьян, Муриньо Ален  
(FR), Мелонек Джоанна, Смолл Иан  
(AU), Перес Паскуаль, Дуарте Хорхе,  
Пишон Жан-Филип, Леваду Сильвэн,  
Мартэн Жером (FR), Торнэ Франсуа  
(US)**

(74) Представитель:  
**Фелицына С.Б. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к области генетики растений и селекции растений. Более конкретно, изобретение относится к трансгенным растениям пшеницы, несущим восстановитель генов фертильности, специфичных для цитоплазмы CMS T. timopheevii.

**202091107**  
**A1**

**202091107**

**A1**

## ПШЕНИЦА, СОДЕРЖАЩАЯ АЛЛЕЛИ-ВОССТАНОВИТЕЛИ МУЖСКОЙ ФЕРТИЛЬНОСТИ

Изобретение относится к области генетики растений и селекции растений. Более конкретно, изобретение относится к растениям пшеницы, несущим восстановитель генов фертильности, специфичных для цитоплазмы CMS T. timopheevii.

Предшествующий уровень техники

Получение гибридов основано на скрещивании двух родительских линий для усиления гетерозиса и de facto увеличения генетической изменчивости для создания новых сортов или генотипов с более высокой урожайностью и лучшей адаптацией к стрессам окружающей среды. Исследования показали, что даже у преимущественно аутогамных видов, таких как пшеница, гибридные линии демонстрируют улучшенное качество и большую устойчивость к воздействию окружающей среды и биотическим стрессам.

Чтобы способствовать коммерчески жизнеспособным темпам производства гибридов, необходимо избегать самоопыления, то есть опыления женского органа пыльцой того же растения. Желательно, чтобы женский орган материнской формы исключительно опылялся пыльцой отцовской формы. Чтобы получить надежную и эффективную систему для производства семян, необходимых для производства гибридов, обычно необходимы три основных элемента: средство для индукции мужской стерильности, средство для распространения стерильности и средство для восстановления фертильности. Например, полностью генетическая система состоит из линии мужской стерильности (материнская форма), линии-закрепителя фертильности (отцовская форма, позволяющая распространяться линии мужской стерильности) и линии-восстановителя фертильности (отцовская форма для производства гибрида).

Мужская стерильность может быть достигнута тремя различными способами. Ручная кастрация является самым простым и все еще используется в некоторых разновидностях, где мужские и женские цветы разделены, например, в кукурузе. Однако это нецелесообразно для таких видов, как пшеница, где цветы содержат как женские, так и мужские органы. Мужская стерильность также может быть индуцирована агентами химической гибридизации (СНА) с гаметоцидными эффектами. В настоящее время только несколько коммерческих сортов гибридной пшеницы основаны на этой технологии, поскольку она может нести существенные финансовые риски.

Наконец, мужская стерильность также может быть вызвана генетическими средствами. Есть много примеров гибридных систем в кукурузе или сорго на основе

мужской стерильности, вызванной генетическими средствами, демонстрируя преобладание этой технологии по сравнению с двумя упомянутыми ранее. Однако у других видов, которые преимущественно самоопыляются, например, у пшеницы, производство гибридов все еще остается проблемой (Longin et al, 2012).

Первый случай мужской стерильности у пшеницы наблюдался в 1951 году (Kihara, 1951), где было обнаружено, что стерильность была вызвана несовместимостью между цитоплазмой *Aegilops caudata* L. и ядром *T. aestivum* var. *erythrosperrum*. Впоследствии исследование цитоплазмы *T. timopheevii* показало, что эта цитоплазма способна индуцировать стерильность у пшеницы мягкой (*T. aestivum*) (Wilson and Ross, 1961, *Crop Sci*, 1: 191-193). Orf256 ранее был идентифицирован как ген, специфичный для митохондриального генома *T. timopheevii* (Rathburn and Hedgcoth, 1991; Song and Hedgcoth, 1994), однако, еще предстоит показать, что orf256 является генетической детерминантой CMS *T. timopheevii*. Ожидалось, что такая цитоплазма может быть использована в системе производства гибридов. Однако основные ограничения возникли из-за трудностей с поиском полностью доминантного и стабильного гена-восстановителя фертильности без отрицательных побочных эффектов (особенно в отношении урожайности).

Сообщалось о восстановлении фертильности мужских стерильных растений, несущих цитоплазму CMS *T. timopheevii* (цитоплазма T-CMS), и было идентифицировано восемь локусов основных восстановителей (обозначенных как Rf1-Rf8), которые близко расположены в геноме пшеницы. Одним из наиболее эффективных локусов-восстановителей является Rf3 (Ma and Sorrells, 1995; Kojima et al, 1997; Ahmed et al 2001; Geyer et al 2016). Два маркера SNP позволили определить местоположение локуса Rf3 в пределах фрагмента 2 cM на хромосоме 1B (Geyer et al, 2016). Автор отмечает, что эти маркеры не являются диагностическими маркерами.

Хотя понятно, что для восстановления нормальной фертильности пыльцы могут потребоваться два или более локусов Rf, также хорошо известно, что существуют локусы-модификаторы, которые имеют либо незначительные эффекты с низкой проникающей способностью (Zhou et al 2005, Stojalowski et al 2013), либо ингибирующие эффекты в отношении фертильности в зависимости от условий окружающей среды (Wilson, 1984). Пока еще не ясно, какая комбинация генов или локусов необходима для полного восстановления T-CMS в различных генетических условиях и условиях окружающей среды.

В этом контексте разработка технологий, обеспечивающих полное восстановление фертильности пыльцы, имеет большое значение для пшеницы. Поэтому целью настоящего

изобретения является предложение подходящих генов-восстановителей фертильности в пшенице для разработки системы производства гибридов, полезной для семеноводства.

#### Сущность изобретения

Первый объект настоящего изобретения относится к выделенной нуклеиновой кислоте Rf1, кодирующей белок Rf1, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS T. timopheevii, где соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 361. Пример нуклеиновой кислоты Rf1 включает SEQ ID NO: 3119.

Раскрытие также относится к трансгенному растению пшеницы, содержащему такую нуклеиновую кислоту Rf1 и, необязательно, одну или более нуклеиновых кислот, содержащих аллель (аллели)-восстановители Rf3, Rf4 и/или Rf7, в качестве трансгенного элемента (элементов).

Другой аспект относится к генетически сконструированному растению пшеницы, содержащему такую нуклеиновую кислоту Rf1 и, необязательно, одну или более нуклеиновых кислот, содержащих аллель (аллели)-восстановители Rf3, Rf4 и/или Rf7, в качестве генетически сконструированного элемента (элементов).

В конкретных воплощениях указанный трансгенный элемент (элементы) или генетически сконструированный элемент (элементы) экспрессируют полипептиды, которые восстанавливают или улучшают мужскую фертильность растения по сравнению с родительским растением без такого трансгенного элемента (элементов) или генетически сконструированного элемента (элементов).

Еще один аспект относится к восстановителю фертильности цитоплазмы TMS timopheevii CMS, содержащему такой аллель-восстановитель Rf1 и, по меньшей мере, два аллеля-восстановителя фертильности в локусах-восстановителях, выбранных из числа Rf3, Rf4 и Rf7, где

локус Rf3 находится на расстоянии по большей мере 10 сМ от маркера cfn1249269 SEQ ID NO: 3205 или маркера BS00090770 SEQ ID NO: 3228,

локус Rf7 находится на расстоянии по большей мере 10 сМ от маркера cfn0919993 SEQ ID NO: 3231, и,

локус Rf4 находится на расстоянии по большей мере 10 сМ от маркера cfn0393953 SEQ ID NO: 3233.

Раскрытие также относится к способам получения трансгенного растения пшеницы, как описано выше, где способ включает стадии трансформации исходного растения пшеницы одной или более нуклеиновыми кислотами Rf1, кодирующими белки-

восстановители цитоплазмы CMS *T. timopheevii*, выбора растения, содержащего указанную одну или более нуклеиновых кислот в качестве трансгена (трансгенов), восстановления и выращивания указанного трансгенного растения пшеницы.

Также частью настоящего раскрытия является способ получения генетически модифицированного растения пшеницы, как описано выше, где способ включает стадии генетической модификации родительского растения пшеницы с получением в его геноме одной или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок-восстановитель Rf1 цитоплазмы *T. timopheevii* CMS, предпочтительно путем редактирования генома, стадии выбора растения, содержащего указанную одну или более нуклеотидных последовательностей в качестве генетически сконструированных элементов, стадии восстановления и выращивания указанного генетически сконструированного растения пшеницы.

Раскрытие дополнительно относится к способу получения растения пшеницы путем скрещивания, причем указанный способ включает следующее:

предоставление первого растения пшеницы, содержащего один или два аллеля-восстановителя, выбранные из аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf7,

скрещивание указанного первого растения пшеницы со вторым растением пшеницы, содержащим один или два аллеля-восстановителя, выбранные из аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf7, где аллели-восстановители Rf1, Rf3 и Rf7 представлены, по меньшей мере, один раз на панели аллелей-восстановителей, представленной первым растением и вторым растением,

сбор гибридного семени F1,

получение гомозиготных растений из растений F1,

необязательно детекцию присутствия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf7 в гибридном семени и/или в каждом поколении.

Предпочтительно в таких способах показатель фертильности полученного растения пшеницы будет выше, чем показатель фертильности у родительского растения пшеницы.

Настоящее изобретение также относится к способу получения трансгенного или генетически сконструированного растения пшеницы, в котором уровень фертильности указанного растения изменяется, причем способ включает стадию нокдауна экспрессии аллеля-восстановителя Rf1, где указанный аллель-восстановитель Rf1 включает нуклеиновую кислоту Rf1.

Раскрытие также относится к способу получения гибридного растения пшеницы, включающему стадии:

скрещивание стерильной материнской формы, содержащей цитоплазму *T.*

*timopheevii*, с фертильной отцовской формой растения пшеницы, как описано выше;

сбор гибридных семян;

необязательно детекцию уровня гибридности гибридных семян.

Гибридное растение пшеницы, полученное вышеуказанными способами, также является частью настоящего раскрытия.

Настоящее раскрытие также относится к способу идентификации растения пшеницы, как описано выше, где указанное растение пшеницы идентифицируют путем детекции присутствия, по меньшей мере, одного аллеля-восстановителя Rf1 и, необязательно, одного или более дополнительных аллелей-восстановителей, выбранных из группы, состоящей из Rf3, Rf4 и Rf7.

Соответственно, в данном документе также раскрыты зонды или праймеры нуклеиновых кислот для специфической детекции аллеля-восстановителя Rf1 в растении пшеницы и, необязательно, одного или более из аллелей-восстановителей Rf3, Rf4 и Rf7.

Другой аспект изобретения относится к рекомбинантной нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеиновую кислоту Rf1, кодирующую белок-восстановитель Rf1 цитоплазмы CMS T. *timopheevii*, функционально связанный с регуляторными элементами, и к векторам для применения при трансформации растения пшеницы, содержащего такие рекомбинантные нуклеиновые кислоты.

Подробное описание изобретения

Нуклеиновые кислоты по настоящему раскрытию

Аспект настоящего раскрытия относится к клонированию и характеристике генов, кодирующих белки-восстановители фертильности, которые действуют на цитоплазму CMS T. *timopheevi* (далее называемые генами Rf или нуклеиновыми кислотами) в растениях пшеницы, и к использованию соответствующих нуклеиновых кислот Rf для получения трансгенных растений пшеницы, для модификации растений пшеницы путем редактирования генома и/или для детекции таких генов Rf в растениях пшеницы.

Когда упоминаются «растение» или «растения», подразумевается, что, если не указано иное, то в настоящий документ включены также части растения (клетки, ткани или органы, семенные коробочки, семена, отсеченные части, такие как корни, листья, цветы, пыльца и т. д.), потомство растений, которые сохраняют отличительные признаки родителей (особенно мужскую фертильность, связанную с заявленными нуклеиновыми кислотами Rf), такое как семена, полученные путем самоопыления или скрещивания, например гибридные семена (полученные скрещиванием двух инбредных родительских растений), гибридные растения и полученные из них части растений.

Используемый в настоящем описании термин «растение пшеницы» относится к

видам рода *Triticum*, таким как, например, *T. aestivum*, *T. aethiopicum*, *T. araraticum*, *T. boeoticum*, *T. carthlicum*, *T. compactum*, *T. dicoccoides*, *T. dicoccon*, *T. durum*, *T. ispananicum*, *T. karamyshevii*, *T. macha*, *T. Milinae*, *T. monococcum*, *T. polonicum*, *T. spelta*, *T. sphaerococcum*, *T. timopheevii*, *T. turanicum*, *T. turgidum*, *T. urartu*, *T. vavilovii*, *T. zhukovskyi* Faegi. Растение пшеницы также относится к видам родов *Aegilops* и *Triticale*.

Используемый в настоящем описании термин «восстановитель фертильности цитоплазмы CMS *T. timopheevii*» относится к белку, экспрессия которого в растении пшеницы, содержащем цитоплазму CMS *T. timopheevii*, способствует восстановлению продукции пыльцы в системе CMS *Triticum timopheevii*.

Используемый в настоящем описании термин «аллель (аллели)» означает любую из одной или более альтернативных форм гена в конкретном локусе. В диплоиде аллели данного гена расположены в определенном месте или локусе хромосомы. Один аллель присутствует на каждой хромосоме пары гомологичных хромосом. Такое же определение используется для растений, имеющих более высокий уровень пloidности, как у рода *Triticum*, где, например, *T. aestivum* является гексаплоидным растением.

Используемый в настоящем описании термин «аллель-восстановитель цитоплазмы CMS *T. timopheevii*» относится к аллелю, который способствует восстановлению продукции пыльцы в системе CMS *Triticum timopheevii*.

Восстановление фертильности пыльцы может быть частичным или полным. Фертильность пыльцы может быть оценена с помощью тестов на фертильность пыльцы, как описано в примерах ниже. В частности, показатель фертильности растений пшеницы F1, имеющих цитоплазму CMS-T *timopheevii* (из тестируемой линии-восстановителя с гибридами CMS), может быть рассчитан путем деления общего количества семян, обмолоченных из колоса, на количество подсчитанных колосьев, и может быть сравнено с показателями фертильности группы контрольных фертильных растений, например элитных инбредных линий, несущих нормальную цитоплазму пшеницы, выращенных в той же области и в тех же агроэкологических условиях. Предпочтительно, чтобы такие панели линий содержали набор, по меньшей мере, из 5 элитных инбредных линий, где эти линии представляют область, где проводится тест на фертильность. Кроме того, предпочтительно, чтобы для данного эксперимента было оценено, по меньшей мере, 10 колосьев от разных отдельных растений F1.

Если показатель фертильности не равен нулю, то растение приобрело частичное или полное восстановление фертильности. Для каждого показателя фертильности рассчитывается статистический тест для получения р-значения. Примерами статистических тестов являются дисперсионный анализ или сравнения средних значений.

P-значение ниже 5% порога будет указывать, что эти два распределения статистически различны. Следовательно, значительное снижение показателя фертильности тестируемого растения пшеницы по сравнению с показателем фертильности полностью фертильного контрольного растения свидетельствует о том, что растение F1 не достигло полного восстановления фертильности (то есть частичное восстановление). Аналогичный или более высокий показатель фертильности свидетельствует о том, что растение F1 приобрело полное восстановление фертильности. В предпочтительном воплощении растение пшеницы, такое как трансгенное или генетически сконструированное растение пшеницы, согласно настоящему раскрытию, приобрело полное восстановление фертильности.

Локусы аллелей-восстановителей цитоплазмы CMS T. timopheevi в Rf1, Rf3, Rf4 и Rf7 были картированы в настоящем описании. Соответствующие аллели восстановителей обозначены аллелями-восстановителями Rf1, Rf3, Rf4 и Rf7 и описаны в данной области. В частности, источник пшеницы для аллеля-восстановителя Rf3 включает следующие коммерческие линии: Allezy, Altigo, Altamira, см. Таблицу 15. Источник пшеницы для аллеля-восстановителя Rf4 включает следующие линии: R113 или L13.

В конкретных воплощениях репрезентативные аллели-восстановители Rf1, Rf3, Rf4 и Rf7 представлены образцом семян, выбранным среди: NCIMB 42811, NCIMB 42812, NCIMB 42813, NCIMB 42814, NCIMB 42815, NCIMB 42816 и NCIMB 42817.

Используемый в настоящем описании термин «сантиморган» («сМ») представляет собой единицу измерения частоты рекомбинации. Один сМ равен 1% вероятности того, что маркер в одном генетическом локусе будет располагаться отдельно от маркера во втором локусе из-за кроссинговера в одном поколении.

Используемый в настоящем описании термин «хромосомный интервал» обозначает непрерывный линейный промежуток геномной ДНК, который находится *in planta* на одной хромосоме. Генетические элементы или гены, расположенные на одном хромосомном интервале, физически сцеплены. Размер хромосомного интервала особенно ничем не ограничен. В некоторых аспектах генетические элементы, расположенные в пределах одного хромосомного интервала, генетически связаны, как правило, с расстоянием генетической рекомбинации, например, менее чем или равным 20 сМ или, альтернативно, менее чем или равным 10 сМ. То есть два генетических элемента в пределах одного хромосомного интервала подвергаются рекомбинации с частотой, меньшей или равной 20% или 10%.

Настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам и их рекомбинантным формам, содержащим кодирующую последовательность белков-восстановителей

фертильности, Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или Rf-*g*<sub>ye</sub>, активных в цитоплазме CMS *T. timopheevii*.

Используемый в настоящем описании термин «рекомбинантная нуклеиновая кислота» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, предпочтительно молекулу ДНК, содержащую комбинацию молекул нуклеиновой кислоты, которые не встречаются в природе вместе, и является результатом вмешательства человека, например молекулы ДНК, которая состоит из комбинации, по меньшей мере, двух молекул ДНК, гетерологичных друг другу, и/или молекулы ДНК, которая искусственно синтезирована и содержит полинуклеотидную последовательность, которая отклоняется от полинуклеотидной последовательности, которая обычно существует в природе.

Такие нуклеиновые кислоты, кодирующие кандидатные восстановители белков фертильности цитоплазмы CMS *T. timopheevii*, были выделены, как описано в приведенных ниже примерах. Соответственно, первым аспектом раскрытия являются нуклеиновые кислоты, кодирующие белок-восстановитель фертильности *T. timopheevii*, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную, обычно, по меньшей мере, на 96% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной среди любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 1554.

Процент идентичности последовательности, как используется в настоящем описании, определяется путем подсчета количества совпадающих положений в выровненных аминокислотных последовательностях, деления количества совмещенных положений на общее количество выровненных аминокислот и умножения на 100. Соответствующее положение относится к положению, в котором идентичные аминокислоты находятся в одном и том же положении в выровненных аминокислотных последовательностях. Например, аминокислотные последовательности можно выравнивать, используя CD-hit (настройки -c 0,96 -n 5 -G 0 -d 0 -AS 60 -A 105 -g 1, см. <http://weizhongli-lab.org/cd-hit/>).

Вышеуказанные кандидатные нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из полипептидов SEQ ID NO: 1-1554, могут быть дополнительно оценены по их способности восстанавливать фертильность стерильного растения пшеницы, как описано ниже.

Поэтому в данном документе раскрыт способ оценки способности нуклеиновой кислоты восстанавливать фертильность, где способ включает стадии:

- a. введения одной или более кандидатных нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-*g*<sub>ye</sub>, кодирующих предполагаемую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO1 - SEQ ID NO1554, в родительское стерильное растение пшеницы и цитоплазму *T. timopheevii* CMS,
- b. выбора трансгенного растения, несущего одну или более кандидатных

нуклеиновых кислот, в качестве трансгена (трансгенов), и

с. оценки фертильности трансгенных растений по сравнению со стерильным родительским растением пшеницы на основе анализа восстановления фертильности,

где улучшение восстановления фертильности указывает на то, что указанная нуклеиновая кислота обладает способностью восстанавливать фертильность.

В конкретном воплощении родительское стерильное растение пшеницы представляет собой линию Fielder, несущую цитоплазму CMS T. timopheevii.

В другом конкретном воплощении вышеупомянутого способа последовательность кандидатной нуклеиновой кислоты Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-rye выбрана из тех, которые кодируют аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности, например, 100% идентичности с любой из SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:1554.

Обычно кандидатные нуклеиновые кислоты Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-rye выбирают среди следующих нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 1555 - SEQ ID NO: 3107 и 3133.

В дополнительном конкретном воплощении, где это целесообразно, последовательность нуклеиновой кислоты может быть оптимизирована для повышенной экспрессии в трансформированном растении. Существует ряд оптимизаций, которые могут быть выполнены на уровне ДНК без изменения последовательности белка путем консервативного обмена кодонов, который заменяет один кодон другим кодоном, кодирующим ту же аминокислоту. Кроме того, последовательность нуклеиновой кислоты может быть модифицирована для целей клонирования. Как и для оптимизации, такая модификация достигается без изменения последовательности белка.

Нуклеиновые кислоты Rf1

В конкретном воплощении нуклеиновая кислота по настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту Rf1.

Используемый в настоящем описании термин «нуклеиновая кислота Rf1» относится к нуклеиновой кислоте, содержащей ген, кодирующий белок Rf1, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS T. timopheevii, где соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-2, SEQ ID NO: 288-290, SEQ ID NO: 293-296, SEQ ID NO: 343-346, SEQ ID NO: 349-354, SEQ ID NO: 359, 361 и 362, SEQ ID NO: 396 и 397, SEQ ID NO: 428-430, SEQ ID NO: 517 и 519, SEQ ID NO: 752-754, SEQ ID NO: 1092, 1093 и 1095, как правило, SEQ ID NO: 359 361 и 362 и SEQ ID

NO: 428-430. В особенно предпочтительном воплощении нуклеиновая кислота Rf1 кодирует аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 361. Примеры соответствующих специфических нуклеиновых кислот Rf1 приведены в Таблице 7.

В частности, как показано в Примере 6, авторы изобретения определили, что последовательность RFL79 SEQ ID NO: 361 (как показано в Таблице 7) может восстанавливать мужскую фертильность растений CMS-Fielder. Соответственно, в предпочтительном воплощении примеры нуклеиновых кислот Rf1 включают раскрытые последовательности нуклеиновых кислот Rf1 SEQ ID NO: 1913, SEQ ID NO: 1914, SEQ ID NO: 1915, SEQ ID NO: 1916 или SEQ ID NO: 3119, предпочтительно нуклеиновая кислота Rf1 содержит SEQ ID NO: 3119.

#### Нуклеиновые кислоты Rf3

В конкретном воплощении нуклеиновая кислота по настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту Rf3.

Используемый в настоящем описании термин «нуклеиновая кислота Rf3» относится к нуклеиновой кислоте, содержащей ген, кодирующий белок Rf3, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS T. timopheevii, где соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 124 и 125, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 315-321, SEQ ID NO: 379-381, SEQ ID NO: 553 и 554, SEQ ID NO: 557 и 558, SEQ ID NO: 676 и 677, SEQ ID NO: 684 и 685, SEQ ID NO: 696 и 697, SEQ ID NO: 938 и 939 и SEQ ID NO: 1038 и 1039, как правило, SEQ ID NO: 315-321, SEQ ID NO: 379-381, SEQ ID NO: 147 и 150, SEQ ID NO: 156 и 158, SEQ ID NO: 297 и 299. Предпочтительные нуклеиновые кислоты Rf3 кодируют белок Rf3, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS T. timopheevii, с соответствующей аминокислотной последовательностью, имеющей, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 676 и SEQ ID NO: 684. Примеры соответствующих специфических нуклеиновых кислот Rf3 приведены в Таблице 7 или дополнительно описаны в Примере 12. Как правило, примеры конкретных нуклеиновых кислот Rf3 включают SEQ ID NO: 1712, SEQ ID NO: 2230, SEQ ID NO: 2238, SEQ ID NO: 3146, SEQ ID NO: 3147 или SEQ ID NO: 3148.

#### Нуклеиновые кислоты Rf4

В конкретном воплощении нуклеиновая кислота по настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту Rf4.

Используемый в настоящем описании термин «нуклеиновая кислота Rf4» относится к нуклеиновой кислоте, содержащей ген, кодирующий белок Rf4, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS T. timopheevii, где соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 477 и SEQ ID NO: 3135-3138, обычно SEQ ID NO: 477 и SEQ ID NO: 3136-3138. Примеры соответствующих специфических нуклеиновых кислот Rf4 перечислены в Таблице 7 и дополнительно включают любую из SEQ ID NO: 2031 и SEQ ID NO: 3140-3142.

#### Нуклеиновые кислоты Rf7

В конкретном воплощении нуклеиновая кислота по настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту Rf7.

Используемый в настоящем описании термин «нуклеиновая кислота Rf7» относится к нуклеиновой кислоте, содержащей ген, кодирующий белок Rf7, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS T. timopheevii, где соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 240-243, SEQ ID NO: 303-305, SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 375-377, SEQ ID NO: 497-499, SEQ ID NO: 516, SEQ ID NO: 709-711, SEQ ID NO: 768, как правило, SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 516 и SEQ ID NO: 768. Примеры соответствующих специфических нуклеиновых кислот Rf7 приведены в Таблице 7.

#### Нуклеиновые кислоты Rf-Rye

В конкретном воплощении нуклеиновая кислота по настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту Rf-Rye.

Используемый в настоящем описании термин «нуклеиновая кислота Rf-Rye» относится к нуклеиновой кислоте, содержащей ген, кодирующий белок Rf-Rye, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS T. timopheevii, где соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 378 и SEQ ID NO: 859. Примеры соответствующих специфических нуклеиновых кислот

Rf-Rye приведены в Таблице 7.

#### Нуклеиновые кислоты Rf в качестве трансгенов

Более конкретно, настоящее раскрытие относится к молекулам ДНК, включающим одну или более нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или Rf-rye. В частности, раскрытие относится к любой молекуле ДНК, полученной в результате вставки трансгена в растение пшеницы, причем указанный трансген включает одну или более из описанных выше нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или Rf-rye, и раскрытие относится к тому, к каким результатам экспрессии соответствующей РНК и/или белка в растении пшеницы приводят вставки.

Также частью настоящего раскрытия является нуклеиновая кислота, которая была выделена из клеток или тканей, или гомогената из растения или семян или растительной ткани; или может быть получена в виде ампликона из экстрагированной ДНК или РНК из клеток или тканей, или гомогената из растения, семени или ткани растения, любой из которых получен из таких материалов, полученных из растения, содержащего такую нуклеиновую кислоту, как описано выше.

Используемый в настоящем описании термин «трансген» или «трансгенный элемент» относится к нуклеиновой кислоте (например, молекуле ДНК), включенной в геном клетки-хозяина. Термин «трансген» или «трансгенный элемент» относится, в частности, к последовательности, которая обычно не присутствует в данном геноме хозяина в генетическом контексте, в котором эта последовательность находится в настоящее время. В этом отношении последовательность может быть нативной для генома хозяина, но может быть перегруппирована относительно других генетических последовательностей в геномной последовательности хозяина. Например, трансген перегруппирован в другом локусе по сравнению с нативным геном.

Указанный один или более трансгенных элементов позволяет экспрессировать полипептиды, которые восстанавливают или улучшают мужскую фертильность, в растении, имеющем цитоплазму CMS T. timopheevii, по сравнению с родительским растением, которое не содержит трансгенного элемента.

Конкретным трансгенным элементом является рекомбинантная нуклеиновая кислота, как определено выше, например, нуклеиновые кислоты Rf1, как определено выше. В конкретных воплощениях трансгенный элемент включает нуклеиновую кислоту Rf под контролем конститутивного промотора, такого как промотор ZmUbi.

Рекомбинантные нуклеиновые кислоты для применения в трансформации растений пшеницы

Такие нуклеиновые кислоты Rf, как определено выше, также полезны для

трансформации или генетической модификации растения пшеницы, в частности, растения пшеницы, которое не имеет одного или более аллелей восстановления фертильности Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и Rf-rye.

Другой аспект настоящего изобретения относится к вектору для применения в трансформации растения пшеницы, содержащему одну или более нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и Rf-rye, как описано выше.

Векторы для применения в трансформации растения пшеницы включают, по меньшей мере, кодирующую последовательность соответствующего белка-восстановителя фертильности (либо встречающуюся в природе кодирующую последовательность, либо улучшенную последовательность, такую как кодон-оптимизированная последовательность), причем такая кодирующая последовательность функционально связана с регуляторным элементом, таким как промотор.

Используемый в настоящем описании термин «промотор» относится к области ДНК перед кодирующей последовательностью (в 5'-области от стартового кодона) и включает области ДНК для распознавания и связывания РНК-полимеразы и других белков для инициации транскрипции в стартовом кодоне. Примеры конститутивных промоторов, пригодных для экспрессии, включают промотор 35S или промотор 19S (Kay et al, 1987), промотор актина риса (McElroy et al, 1990), промотор pCRV (Depigny-This et al, 1992), CsVMV промотор (Verdaguer et al. 1996), промотор убиквитина 1 кукурузы (Christensen and Quail, 1996), регуляторные последовательности Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens*, включая маннопинсинтазу, нопалинсинтазу, октопинсинтазу.

Промоторы могут быть «предпочтительными для ткани», то есть инициировать транскрипцию в определенных тканях или «тканеспецифичными», то есть инициировать транскрипцию только в определенных тканях. Примерами таких промоторов являются DHN12, LTR1, LTP1, специфичные для эмбриона, SS1, специфичный для флоэмы, OSG6B, специфичный для тапетума (Gotz et al 2011 и Jones 2015).

Могут быть использованы другие подходящие промоторы. Это может быть индуцируемый промотор, регулируемый в процессе развития промотор. «Индукцируемый» промотор иницирует транскрипцию при некотором контроле окружающей среды или индуцируется любым стрессом, например, индуцируемые абиотическим стрессом RD29, COR14b (Gotz et al, 2011).

Можно использовать конститутивные промоторы, такие как промотор ZmUbi, обычно промотор ZmUbi SEQ ID NO: 3134. Наконец, также можно использовать промотор SEQ ID NO: 3114, SEQ ID NO: 3123 и SEQ ID NO: 3113, соответствующий pTaRFL46, 79 и 104.

В конкретных воплощениях нуклеиновые кислоты Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или Rf-*guc* по настоящему изобретению функционально связаны с гетерологичными промоторами, т.е. промотором, который не является природным промотором соответствующих нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или Rf-*guc*, которые содержатся в пшенице. Типичные рекомбинантные конструкции нуклеиновых кислот Rf3 с гетерологичными промоторами включают любую из SEQ ID NO: 3150-3153 и любую из SEQ ID NO: 3156 - SEQ ID NO: 3159. Типичные рекомбинантные конструкции нуклеиновых кислот Rf1 с гетерологичными промоторами включают SEQ ID NO: 3122 или нуклеиновую кислоту SEQ ID NO: 3119 под регуляцией промотора SEQ ID NO: 2123.

Вектор может дополнительно содержать дополнительные элементы, включая ген маркера селекции, функционально связанный с регуляторным элементом, который позволяет выбирать трансформированные клетки растений, содержащие вектор, содержащий нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению в качестве трансгена.

Вектор может дополнительно включать дополнительные элементы, включая ген маркера противоселекции, функционально связанный с регуляторным элементом, который позволяет встречно отобрать трансформированные клетки растения, которые не сохранили маркер гена противоселекции в своем геноме.

В конкретном воплощении вектор согласно настоящему раскрытию может представлять собой вектор, подходящий для трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, в частности трансформации, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*, или *Agrobacterium rhizogenes*, как описано в следующем разделе.

#### Способы получения трансгенного растения пшеницы

Другой аспект настоящего раскрытия относится к применению описанных выше нуклеиновых кислот для получения трансгенного растения пшеницы, экспрессирующего белок-восстановитель фертильности.

Термин «трансгенное растение» относится к растению, содержащему такой трансген. «Трансгенное растение» включает растение, часть растения, растительную клетку или семя, геном которых был изменен в результате стабильной интеграции рекомбинантной ДНК. Трансгенное растение включает растение, регенерированное из первоначально трансформированной растительной клетки, и потомство трансгенных растений из более поздних поколений или скрещиваний трансформированного растения. В результате такого геномного изменения трансгенное растение заметно отличается от дикого родича. Примером трансгенного растения является растение, описанное в настоящем документе как содержащее одну или более нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или Rf-*guc*, обычно в качестве трансгенных элементов. Например, трансгенное

растение включает одну или более нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или Rf-*gus* в качестве трансгена, вставленных в локусы, отличные от нативного локуса соответствующего гена (генов) Rf. Соответственно, в данном документе раскрыт способ получения трансгенного растения пшеницы, где способ включает стадии:

- (i) трансформации родительского растения пшеницы с помощью нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-*gus*,
- (ii) отбора растения, содержащего указанную одну или более нуклеиновых кислот в качестве трансгена,
- (iii) восстановления и
- (iv) выращивания указанного трансгенного растения пшеницы.

Для методов трансформации в растительной клетке можно привести методы прямой передачи генов, такие как прямая микроинъекция в эмбрионы растений, вакуумная инфльтрация или электропорация, прямое осаждение с помощью ПЭГ или бомбардировка пушкой частиц, покрытых плазмидной ДНК, представляющей интерес.

Предпочтительно трансформировать растительную клетку бактериальным штаммом, в частности *Agrobacterium*, в частности *Agrobacterium tumefaciens*. В частности, можно использовать метод, описанный Ishida et al. (*Nature Biotechnology*, 14, 745-750, 1996) для трансформации однодольных растений.

Описания векторных систем на основе *Agrobacterium* и методов для *Agrobacterium*-опосредованного переноса генов предоставлены Moloney et al., *Plant Cell Reports* 8: 238 (1989). См. также, Патент США № 5591616, от 7 января 1997 года.

Альтернативно, может быть использован прямой перенос гена. Общеизвестным методом трансформации растений является трансформация, опосредованная микрочастицами, при которой ДНК переносится на поверхности микрочастиц размером от 1 до 4 микрон. Экспрессирующий вектор вводится в ткани растений с помощью биолистического устройства, которое ускоряет микрочастицы до скоростей от 300 до 600 м/с, что достаточно для проникновения через стенки и мембраны клеток растений. Sanford et al., *Part. Sci. Technol.* 5:27 (1987), Sanford, J.C., *Trends Biotech.* 6: 299 (1988), Klein et al., *BioTechnology* 6: 559-563 (1988), Sanford, J.C., *Physiol Plant* 7: 206 (1990), Klein et al., *BioTechnology* 10: 268 (1992). Несколько тканей-мишеней можно бомбардировать микрочастицами, покрытыми ДНК, для получения трансгенных растений, включая, например, каллус (тип I или тип II), незрелые зародыши и меристемную ткань.

После трансформации тканей-мишеней пшеницы экспрессия генов маркера селекции позволяет осуществлять предпочтительный отбор трансформированных клеток, тканей и/или растений с использованием методов восстановления и селекции, хорошо

известных в данной области.

Указанные выше способы трансформации обычно используются для получения трансгенного растения, включающего одну или более нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или RfRye в качестве трансгенного элемента (элементов).

Затем трансгенное растение может быть скрещено с другой (нетрансформированной или трансформированной) инбредной линией для получения новой трансгенной линии. Альтернативно, генетический признак, который был интегрирован в конкретную линию с использованием вышеупомянутых методов трансформации, может быть перемещен в другую линию с использованием традиционных методов возвратного скрещивания, которые хорошо известны в области селекции растений. Например, подход возвратного скрещивания может использоваться для перемещения сконструированного признака из общедоступной неэлитной инбредной линии в элитную инбредную линию или из инбредной линии, содержащей чужеродный ген в своем геноме, в инбредную линию или линии, которые не содержат этот ген. Используемый в настоящем описании термин «скрещивание» может относиться к простому скрещиванию X с Y или процессу возвратного скрещивания в зависимости от контекста.

Когда термин трансгенное растение пшеницы используется в контексте настоящего раскрытия, он также включает любое растение пшеницы, включающее в качестве трансгенного элемента одну или более нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или Rf-rye, и где один или более желаемых признаков были дополнительно введены с помощью методов возвратного скрещивания, независимо от того, является ли такой признак встречающимся в природе или трансгенным. Способы возвратного скрещивания могут использоваться с настоящим изобретением для улучшения или введения одной или более характеристик в инбредной линии. Используемый в настоящем описании термин «возвратное скрещивание» относится к повторному скрещиванию гибридного потомства с одним из родительских растений пшеницы. Родительское растение пшеницы, которое вносит ген или гены желаемой характеристики, называется нерекуррентным или донорным родителем. Эта терминология относится к тому факту, что нерекуррентный родитель используется один раз в протоколе возвратного скрещивания и поэтому не повторяется. Родительское растение пшеницы, которому передаются ген или гены от нерекуррентного родителя, известно как рекуррентный родитель, поскольку оно используется для нескольких раундов в протоколе возвратного скрещивания (Fehr et al, 1987).

В типичном протоколе возвратного скрещивания рекуррентный родитель

скрещивается со вторым нереккуррентным родителем, который несет ген или интересующие гены, подлежащие переносу. Полученное потомство от этого скрещивания затем снова скрещивается с рекуррентным родителем, и процесс повторяется до тех пор, пока не будет получено растение пшеницы, в котором все желаемые морфологические и физиологические характеристики рекуррентного родителя восстанавливаются в преобразованном растении в дополнение к гену или генам, переданным от нереккуррентного родителя. Следует отметить, что некоторые процессы, один, два, три или более, самоопыление и рост популяции могут быть включены между двумя последовательными возвратными скрещиваниями.

Способы получения генетически сконструированного растения пшеницы

Аспект настоящего раскрытия относится к фрагменту ДНК соответствующего белка-восстановителя фертильности (либо встречающейся в природе кодирующей последовательности, либо улучшенной последовательности, такой как кодон-оптимизированная последовательность) в комбинации с инструментами редактирования генома (такими как TALEN, CRISPR-Cas, Cpf1 или инструменты нуклеазы цинкового пальца) для нацеливания на соответствующие аллели-восстановители Rf в геноме растения пшеницы путем вставки в любой локус генома или путем частичной или полной замены аллеля в соответствующем локусе.

В частности, настоящее изобретение относится к генетически модифицированному (или сконструированному) растению пшеницы, где способ включает стадии генетической модификации родительского растения пшеницы с получением в их геноме одной или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок-восстановитель цитоплазмы CMS *T. timopheevii* Cf Rf1, Rf3, Rf4 или Rf7, как описано в данном документе, предпочтительно путем редактирования генома, отбора растения, содержащего указанные одну или более нуклеотидных последовательностей в качестве генетически сконструированных элементов, для восстановления и выращивания указанного генетически сконструированного растения пшеницы.

Используемый в настоящем описании термин «генетически сконструированный элемент» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, присутствующей в геноме растения и модифицированной мутагенезом или средствами редактирования генома, предпочтительно средствами редактирования генома. В конкретных воплощениях генетически сконструированный элемент относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая обычно не присутствует в геноме данного хозяина в генетическом контексте, в котором последовательность в настоящее время обнаружена, но включена в геном растения с использованием инструментов редактирования генома. В этом

отношении последовательность может быть нативной для генома хозяина, но может быть перегруппирована относительно других генетических последовательностей в геномной последовательности хозяина. Например, генетически сконструированный элемент представляет собой ген, который перегруппирован в другом локусе по сравнению с нативным геном. Альтернативно, последовательность представляет собой нативную кодирующую последовательность, которая была помещена под контроль гетерологичных регуляторных последовательностей. Другие конкретные примеры описаны ниже.

Термин «генетически сконструированное растение» или «генетически модифицированное растение» относится к растению, содержащему такой генетически сконструированный элемент. «Генетически сконструированное растение» включает растение, часть растения, растительную клетку или семя, геном которых был изменен в результате стабильной интеграции рекомбинантной ДНК. Используемый в настоящем описании термин «генетически сконструированное растение» дополнительно включает растение, часть растения, растительную клетку или семя, геном которых был изменен методами редактирования генома. Генетически сконструированное растение включает растение, регенерированное из первоначально сконструированной растительной клетки, и потомство генетически сконструированных растений более поздних поколений или скрещиваний генетически сконструированного растения. В результате такого геномного изменения генетически сконструированное растение заметно отличается от родственного растения дикого типа. Примером генетически сконструированного растения является растение, описанное в настоящем документе как содержащее одну или более нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или Rf-gye. Например, генетически сконструированное растение включает одну или более нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или Rf-gye в качестве генетически сконструированных элементов, вставленных в локусы, отличные от нативного локуса соответствующего гена (генов) Rf.

В конкретных воплощениях указанные генетически сконструированные растения не включают растения, которые могут быть получены исключительно посредством в основном биологического процесса.

Указанные один или более генетически сконструированные элементы позволяют экспрессировать полипептиды, которые восстанавливают или улучшают мужскую фертильность в растении, имеющем цитоплазму CMS T. timopheevii, по сравнению с родительским растением, которое не содержит генетически сконструированный элемент (элементы).

Конкретным генетически сконструированным элементом является нуклеиновая кислота Rf, как определено выше, например нуклеиновые кислоты Rf1, как определено

выше. В конкретных воплощениях генетически сконструированный элемент включает нуклеиновую кислоту Rf под контролем элементов экспрессии в качестве промотора и/или терминатора. Подходящим промотором может быть конститутивный промотор, такой как промотор ZmUbi или эндогенный промотор Rf, нативный или модифицированный.

Другой аспект изобретения относится к генетически сконструированному растению пшеницы, которое включает модификацию путем вставки точечной мутации или делеции одного или более нуклеотидов последовательности аллеля rf или Rf, в качестве генетически сконструированного элемента, в аллеле Rf или rf, соответственно, с помощью любого из инструментов редактирования генома, включая инструмент на основе редактирования, как описано в WO2015089406 или путем мутагенеза.

Настоящее раскрытие дополнительно включает способы изменения уровня фертильности в растении путем редактирования генома, включающие предоставление инструмента редактирования генома, способного заменить частично или полностью последовательность или форму аллеля-не восстановителя rf1, rf3, rf7 или Rf-rye в растении пшеницы на соответствующую последовательность аллеля-восстановителя Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или Rf-rye, как описано в настоящем документе.

Термин «последовательность или форма аллеля-невосстановителя rf», может быть связан с наличием в геноме аллеля-невосстановителя rf или с отсутствием в геноме любого аллеля rf или Rf. Например, в системе rf3/Rf3 одна линия пшеницы-не восстановитель может характеризоваться наличием последовательности аллеля rf3, тогда как другая линия-невосстановитель характеризуется отсутствием какой-либо аллельной последовательности Rf3 или rf3. Растение с восстановителем Rf3 будет характеризоваться наличием последовательности аллеля Rf3 в геноме. В случае системы rf4/Rf4 растение без восстановителя характеризуется отсутствием каких-либо аллельных форм rf4 или Rf4, тогда как растение с восстановителем Rf4 будет характеризоваться присутствием в геноме последовательности гена Rf4.

В конкретных воплощениях способы модификации уровня фертильности в растении путем редактирования генома включают предоставление инструмента редактирования генома, способного заменить или модифицировать аллель не являющегося восстановителем rf3, для получения аллеля-восстановителя Rf3, содержащего SEQ ID NO: 3146 (RFL29a). В других конкретных воплощениях аллель-невосстановитель rf3 может содержать RFL29c, характеризующийся сдвигом рамки по сравнению с нуклеотидной последовательностью RFL29a, как показано в Примере 22 и на Фигуре12 и SEQ ID NO: 3457.

Раскрытие дополнительно включает способы модификации уровня фертильности в растении путем введения эндогенного промотора гена-восстановителя Rf для увеличения экспрессии соответствующего эндогенного гена Rf либо путем редактирования генома, либо путем мутагенеза.

В конкретном воплощении раскрытие включает способы изменения уровня фертильности в растении путем редактирования генома слабого фертильного растения путем модификации 5'UTR-последовательности «слабого» аллеля RFL29b Rf3, чья область 5'UTR, включающая вставку 163 п.н., подлежит удалению, как показано в Примере 15.

В дополнительном конкретном воплощении изобретение включает способ изменения уровня фертильности в растении путем мутагенеза или редактирования генома эндогенного промотора гена-восстановителя Rf с целью увеличения экспрессии эндогенного гена Rf. В качестве примера, последовательность ргoTaRFL79, представленная в SEQ ID NO: 3123, может быть мутирована или отредактирована для увеличения уровня белка RFL79.

В другом конкретном воплощении всякий раз, когда более сильный промотор расположен в 5'-области от промотора гена-восстановителя Rf, может быть достигнута делеция этого промотора и 5'-области для соединения более сильного промотора с геном Rf.

В конкретном воплощении один аллель-невосстановитель rf частично или полностью заменен любым из аллелей-восстановителей Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или Rf-rye. В таком раскрытии аллель-невосстановитель rf1 может быть заменен, например, аллелем Rf3, или Rf4, или Rf7, или Rf-rye.

В другом аспекте изобретения, по меньшей мере, один аллель-восстановитель из Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и Rf-Rye может быть интегрирован в один или более сайтов-мишеней в геноме растения пшеницы, обычно для того, чтобы получить экспрессию указанных аллелей-восстановителей. Указанная экспрессия может быть достигнута либо посредством использования присутствия в нацеливаемом локусе промотора, более конкретно сильного промотора и/или терминатора, и путем нацеливания указанных элементов экспрессии аллеля Rf. В конкретном воплощении эндогенный аллель Rf удаляется из одного первого локуса и дополнительно интегрируется в 3'-область от подходящего промотора во второй локус в геноме того же растения.

В конкретном воплощении изобретения сайты-мишени могут быть расположены в локусах Rf1, Rf3, Rf4 и/или Rf7, как определено в Примере 17. В более конкретном воплощении сайты-мишени могут быть последовательностями эндогенных генов Rf1, Rf3,

Rf4, Rf7 или Rf-Rye или любыми другими сайтами-мишенями, отличными от последовательностей эндогенных генов Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или Rf-Rye.

В предпочтительном аспекте изобретения растение пшеницы может содержать в своем геноме только в одном локусе аллели-восстановители Rf1, Rf3 и Rf7.

Такой инструмент редактирования генома включает без ограничения направленную модификацию последовательности, обеспечиваемую технологиями двухцепочечного разрыва, такими как, но не ограничиваясь этим, мегануклеазы, ZFN, TALEN (WO2011072246) или система CRISPR CAS (включая CRISPR Cas9, WO2013181440), Cpf1 или их следующие поколения на основе технологий двухцепочечного разрыва с использованием сконструированных нуклеаз.

Способ снижения уровня фертильности растений пшеницы:

В качестве альтернативы настоящее раскрытие дополнительно включает способы изменения уровня фертильности растения путем возвращения линии-восстановителя, содержащей аллель Rf, к состоянию линии-закрепителя, содержащей аллель rf. Такой способ может быть использован для любого растения, содержащего аллель Rf, включая Rf1. Особый интерес представляет гибридная система продуцирования на основе аллеля-восстановителя Rf3, в которой, например, последовательность Rf3 представляет собой RFL29a, а последовательность rf3 представляет собой RFL29c.

Снижение фертильности может быть достигнуто путем нокаута гена Rf или аллеля, как описано ниже.

Более конкретно, способ может в первую очередь соответствовать ингибированию экспрессии с помощью РНКи, направленной против представляющего интерес аллеля Rf, или путем нарушения функции промотора аллеля Rf либо путем мутагенеза, либо путем редактирования генома.

В другом аспекте снижение уровня фертильности достигается путем мутагенеза, классически индуцированного мутагенными агентами, или с помощью технологий редактирования генома для нарушения функции белка, путем полного или частичного удаления гена или путем модификации рамки считываемые фрагменты последовательности гена для нарушения трансляции белка.

В дополнительном аспекте раскрытие относится к трансгенному или генетически сконструированному растению пшеницы с пониженным уровнем фертильности, полученным способами, описанными выше.

Трансгенное или генетически сконструированное растение пшеницы по настоящему раскрытию

Другой аспект настоящего раскрытия относится к трансгенному или генетически

сконструированному растению пшеницы, содержащему одну или более нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или Rf-rye, как описано в предыдущих разделах, в качестве трансгенных или генетически сконструированных элементов, соответственно.

Указанное трансгенное или генетически сконструированное растение может быть получено способами, описанными в предыдущем разделе.

Трансгенные или генетически сконструированные растения по настоящему изобретению могут преимущественно использоваться в качестве родительского растения для получения фертильного растения пшеницы, трансгенного или генетически сконструированного растения-восстановителя цитоплазмы CMS T. timopheevii. В частности, в конкретном воплощении трансгенное или генетически сконструированное растение пшеницы представляет собой фертильное растение пшеницы, трансгенное или генетически сконструированное растение-восстановитель цитоплазмы CMS T. timopheevii. Как правило, трансгенное или генетически сконструированное растение пшеницы в соответствии с настоящим изобретением содержит комбинацию, по меньшей мере, двух разных трансгенных или генетически сконструированных элементов, выбранных из группы, состоящей из нуклеиновых кислот, кодирующих Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и Rf-rye.

Трансгенное или генетически сконструированное растение пшеницы, как раскрыто в настоящем документе, может экспрессировать такой белок-восстановитель фертильности Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-Rye как совместный результат экспрессии трансгена или экспрессии генетически сконструированного элемента и может дополнительно экспрессировать другой белок-восстановитель фертильности, как результат встречающихся в природе аллелей.

В одном воплощении указанная комбинация, по меньшей мере, двух, трех или четырех нуклеинов Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и Rf-rye обнаружена в одном и том же локусе в геноме трансгенного или генетически сконструированного растения. В других воплощениях соответствующие нуклеиновые кислоты комбинации находятся в разных локусах. В одном конкретном воплощении указанная комбинация может быть получена путем скрещивания трансгенных растений по настоящему изобретению, каждое из которых несет одну нуклеиновую кислоту комбинации в качестве трансгена в определенном локусе.

Как правило, указанное трансгенное или генетически сконструированное растение включает следующую комбинацию нуклеиновых кислот в качестве трансгенных или генетически сконструированных элементов:

а. нуклеиновую кислоту Rf1, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей

мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 359, 361, 362 или SEQ ID NO: 428-430, предпочтительно, SEQ ID NO: 361, обычно нуклеиновая кислота Rf1 содержит SEQ ID NO: 3119, и нуклеиновую кислоту Rf3, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 315-321, SEQ ID NO: 379-381, SEQ ID NO: 147 и 150, SEQ ID NO: 156 и 158, SEQ ID NO: 297 и 299, SEQ ID NO: 676 и SEQ ID NO: 684,

b. нуклеиновую кислоту Rf1, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 359, 361, 362 или SEQ ID NO: 428-430, предпочтительно, SEQ ID NO: 361, обычно нуклеиновая кислота Rf1 содержит SEQ ID NO: 3119, и нуклеиновую кислоту Rf7, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 516 и SEQ ID NO: 768,

c. нуклеиновую кислоту Rf1, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 359, 361, 362 или SEQ ID NO: 428-430, предпочтительно, SEQ ID NO: 361, обычно нуклеиновая кислота Rf1 содержит SEQ ID NO: 3119, и нуклеиновую кислоту Rf-гуе, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 378 и SEQ ID NO: 859,

d. нуклеиновую кислоту Rf3, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 315-321, SEQ ID NO: 379-381, SEQ ID NO: 147 и 150, SEQ ID NO: 156 и 158, SEQ ID NO: 297 и 299, SEQ ID NO: 676 и SEQ ID NO: 684, и нуклеиновую кислоту Rf7, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 516 и SEQ ID NO: 768,

e. нуклеиновую кислоту Rf3, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 315-321, SEQ ID NO: 379-381, SEQ ID NO: 147 и 150, SEQ ID NO: 156 и 158, SEQ ID NO: 297 и 299, SEQ ID NO: 676 и SEQ ID NO: 684, и нуклеиновую кислоту Rf-гуе, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере,

мере, 96 % идентичности с любым из SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 378 и SEQ ID NO: 859,

f. нуклеиновую кислоту Rf7, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 516 и SEQ ID NO: 768, и нуклеиновую кислоту Rf-7ye, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любым из SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 378 и SEQ ID NO: 859,

g. нуклеиновую кислоту Rf1, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 359, 361, 362 или SEQ ID NO: 428-430, предпочтительно, SEQ ID NO: 361, обычно нуклеиновая кислота Rf1 содержит SEQ ID NO: 3119, и нуклеиновую кислоту Rf3, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 315-321, SEQ ID NO: 379. -381, SEQ ID NO: 147 и 150, SEQ ID NO: 156 и 158, SEQ ID NO: 297 и 299, SEQ ID NO: 676 и SEQ ID NO: 684, и нуклеиновую кислоту Rf7, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любым из SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 516 и SEQ ID NO: 768;

h. нуклеиновую кислоту Rf1, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 359, 361, 362 или SEQ ID NO: 428-430, предпочтительно, SEQ ID NO: 361, обычно нуклеиновая кислота Rf1 содержит SEQ ID NO: 3119, и нуклеиновую кислоту Rf3, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 315-321, SEQ ID NO: 379. -381, SEQ ID NO: 147 и 150, SEQ ID NO: 156 и 158, SEQ ID NO: 297 и 299, SEQ ID NO: 676 и SEQ ID NO: 684, и нуклеиновую кислоту Rf-7ye, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности по любому из SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 378 и SEQ ID NO: 859;

i. нуклеиновую кислоту Rf1, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности, например, по меньшей мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 359, 361, 362 или SEQ ID NO: 428-430, предпочтительно SEQ ID NO: 361, обычно нуклеиновая кислота Rf1 содержит SEQ ID NO: 3119, и нуклеиновую кислоту Rf7 по п. 4, предпочтительно кодирующую

аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 516 и SEQ ID NO: 768, и нуклеиновую кислоту Rf-rye, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности, с любой из SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 378 и SEQ ID NO: 859; или,

j. нуклеиновую кислота Rf3, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 315-321, SEQ ID NO: 379-381, SEQ ID NO: 147 и 150, SEQ ID NO: 156 и 158, SEQ ID NO: 297 и 299, SEQ ID NO: 676 и SEQ ID NO: 684, и нуклеиновую кислота Rf7, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 516 и SEQ ID NO: 768, и нуклеиновую кислоту Rf-rye, предпочтительно кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности или, по меньшей мере, 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 378 и SEQ ID NO: 859.

В других конкретных воплощениях указанное трансгенное или генетически сконструированное растение дополнительно включает нуклеиновую кислоту Rf4, кодирующую аминокислотную последовательность, обладающую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 477 и SEQ ID NO: 3135-3138 в дополнение к любой из определенных выше комбинаций нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf7 и/или Rf-Rye, как определено в предыдущем разделе, в качестве трансгенных элементов.

Раскрытие также относится к гибридным растениям пшеницы, которые могут быть получены путем скрещивания трансгенных или генетически сконструированных растений пшеницы, восстанавливающих фертильность, согласно настоящему раскрытию, как описано выше, со вторым растением.

В некоторых воплощениях растение пшеницы согласно изобретению является аллоплазматическим и содержит цитоплазму *T. timopheevii*.

Например, гибридное растение пшеницы может быть получено путем скрещивания растения пшеницы, восстанавливающего фертильность, согласно настоящему раскрытию, как описано выше, предпочтительно содержащего нуклеиновые кислоты Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или Rf-rye, и растения пшеницы, которое не экспрессирует соответствующий белок-восстановитель фертильности, Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 или Rf-rye.

В данном документе также раскрыт способ получения гибридного трансгенного или генетически сконструированного растения пшеницы, включающий стадии:

a. скрещивания стерильного женского растения пшеницы, содержащего цитоплазму *T.timopheevii*, с фертильным мужским трансгенным или генетически сконструированным растением пшеницы, восстанавливающим фертильность по настоящему изобретению, как описано выше;

b. сбора гибридных семян;

c. необязательно детекции присутствия цитоплазмы *T.timopheevii* и/или, по меньшей мере, одной или более нуклеиновых кислот Rf, выбранных из числа Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и Rf-*guc*, в гибридном семени, в качестве трансгенных элементов или генетически сконструированных элементов; и

d. необязательно детекции уровня гибридности гибридного семени.

Следовательно, в данном документе также раскрыты трансгенные или генетически сконструированные растения или линии пшеницы согласно настоящему раскрытию, разработанные для получения таких гибридных растений. Такие трансгенные или генетически сконструированные растения или линии обычно содержат цитоплазматические элементы, необходимые для реализации соответствующей гибридной системы. Предпочтительно трансгенные или генетически сконструированные растения или линии содержат комбинацию, по меньшей мере, двух, трех или четырех нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и Rf-*guc* и цитоплазмы *T. timopheevii*.

В качестве альтернативы детекцию присутствия цитоплазмы *T. timopheevii* и, по меньшей мере, одной или более нуклеиновых кислот Rf, выбранных из числа Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и Rf-*guc* (стадия «с» описанного выше способа), может выполняться для родительских линий, чтобы проверить их генотип, прежде чем начинать скрещивание (стадия «а»).

В некоторых воплощениях раскрытия мужское растение пшеницы выше, чем женское растение пшеницы. Это может быть достигнуто с помощью мужского растения, несущего аллели *Rht*, что позволяет получить различия в размерах. Необязательно, раскрытие дополнительно включает стадию применения гербицида к фертильным растениям, которые выше высоты более коротких женских растений, и дополнительно необязательно включает стадию сбора семян и выбора семян для удаления нежелательных самоопыляющихся мужских семян с использованием морфологического признака и/или фенотипического признака, такого как размер, форма, цвет и т. д. Пример такого способа для производства гибридов описан в WO2015135940.

Цитоплазма T-CMS может быть детектирована либо фенотипически, где растение, несущее гены *rf* и цитоплазму T-CMS, будет стерильным, либо молекулярными средствами, способными детектировать ген *orf256*, как описано в Rathburn and Hedgcoth,

1991 и в Song and Hedgcoth, 1994.

Настоящее изобретение также относится к способу улучшения уровня восстановления фертильности исходного растения пшеницы, имеющего уровень фертильности ниже уровня полного восстановления, включающему стадии трансформации указанного родительского растения пшеницы вектором, содержащим нуклеиновые кислоты Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-*gus*, как описано выше, или генетического конструирования указанных нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-*gus* в указанном растении пшеницы. Способ дополнительно включает стадию выбора трансгенного или генетически сконструированного растения пшеницы, содержащего указанные нуклеиновую кислоту (кислоты) Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-*gus* в качестве трансгенного или генетически сконструированного элемента, предпочтительно Rf1, Rf3 и Rf4, восстановления и выращивания указанного трансгенного или генетически сконструированного растения пшеницы, где указанное трансгенное или генетически сконструированное растение пшеницы имеет улучшенный уровень восстановления фертильности по сравнению с исходным растением.

Раскрытие изобретения дополнительно относится к способу восстановления фертильности стерильного растения пшеницы, несущего цитоплазму TMS timopheevii CMS, включающему стадию трансформации исходного стерильного растения пшеницы, несущего цитоплазму TMS timopheevii CMS, нуклеиновой кислотой Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-*gus*, как описано выше, или генетического конструирования указанного стерильного растения для экспрессии нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-*gus*.

Применение нуклеиновых кислот по настоящему изобретению для идентификации аллелей-восстановителей Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и Rf-*Gus* или трансгенных элементов

Настоящее раскрытие дополнительно обеспечивает способы идентификации соответствующих аллелей-восстановителей Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-*gus* и/или нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-*gus*, как раскрыто в предыдущих разделах, и, в более общем смысле, способы селекции или скрещивания растений пшеницы на наличие или отсутствие аллелей-восстановителей фертильности Rf1, Rf4, Rf4, Rf7 и/или Rf-*gus*, и/или соответствующих нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-*gus*.

Такие способы идентификации, отбора или селекции растений пшеницы включают получение одного или более растений пшеницы и оценку их ДНК для определения наличия или отсутствия аллелей-восстановителей фертильности Rf1, Rf7, Rf7 и/или Rf-*gus* и/или соответствующих нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-*gus*.

Такие методы могут быть использованы, например, для определения того, какое потомство, полученное в результате скрещивания, имеет требуемый аллель-

восстановитель фертильности или нуклеиновые кислоты Rf (или их комбинацию) и, соответственно, для подготовки растений, имеющих необходимый аллель-восстановитель фертильности или нуклеиновые кислоты Rf в комбинации с присутствием или отсутствием других желательных признаков.

Способ будет состоять из идентификации присутствия в фертильном растении аллеля Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-gye или нуклеиновых кислот, причем указанное растение является либо фертильным трансгенным, либо нетрансгенным растением. Необязательно, способ дополнительно состоит в идентификации отсутствия аллеля или нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-gye в растениях-невосстановителях и/или стерильных растениях.

Соответственно, в данном документе раскрыты способы специфической детекции нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-gye в растении пшеницы.

Такие средства включают, например, пару праймеров для специфической амплификации фрагмента нуклеотидной последовательности нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-gye из геномной ДНК растений пшеницы.

Используемый в данном документе праймер охватывает любую нуклеиновую кислоту, которая способна инициировать синтез зарождающейся нуклеиновой кислоты в процессе, зависимом от матрицы, таком как ПЦР. Как правило, праймеры представляют собой олигонуклеотиды от 10 до 30 нуклеотидов, но можно использовать более длинные последовательности. Праймеры могут быть предоставлены в двухцепочечной форме, хотя предпочтительной является одноцепочечная форма.

Альтернативно, зонд нуклеиновой кислоты можно использовать для специфической детекции любой из нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf4, Rf7 и/или Rf-gye.

При использовании в настоящем документе, зонд нуклеиновой кислоты включает любую нуклеиновую кислоту, по меньшей мере, из 30 нуклеотидов и которая может специфически гибридизоваться в стандартных жестких условиях с определенной нуклеиновой кислотой. Стандартные жесткие условия, используемые в настоящем документе, относятся к условиям гибридизации, описанным, например, в Sambrook et al., 1989, которые могут включать 1) иммобилизацию фрагментов геномной ДНК растения или ДНК библиотеки на фильтре, 2) предварительную гибридизацию фильтра в течение 1-2 часов при температуре 65 °C, 6x SSC 5x реагент Денхардта, 0,5% SDS и 20 мг/мл денатурированной ДНК-носителя 3) добавление зонда (меченного) 4) инкубацию в течение 16-24 часов 5) отмывание фильтра один раз в течение 30 минут при 68 °C в 6x SSC, 0,1% SDS 6) отмывание фильтра три раза (два раза в течение 30 минут в 30 мл и один раз в течение 10 минут в 500 мл) при 68 °C в 2x SSC 0,1% SDS. Зонд нуклеиновой кислоты

может дополнительно содержать метящий агент, такой как флуоресцентные агенты, ковалентно связанные с частью нуклеиновой кислоты зонда.

Способы получения растения пшеницы с модифицированным восстановителем фертильности Rf3

Авторы изобретения также идентифицировали два типа восстановителя фертильности Rf3, один с сильным восстановлением фертильности, например, способный обеспечивать растения с показателем фертильности выше 1, например, от 1 до 2, а другой со слабым восстановлением фертильности, например, способный обеспечить растения, имеющие показатель фертильности ниже 0,1, например, от 0,5 до 1.

Удивительно, но сильное восстановление фертильности коррелирует с отсутствием в геноме растения пшеницы, несущего Rf3, фрагмента 163 п.н. SEQ ID NO: 3174, расположенного в 5'UTR кодирующей последовательности Rf3.

Соответственно, раскрытие относится к способу получения растения пшеницы, несущего восстановитель фертильности Rf3, причем указанный способ включает (i) обеспечение родительского растения пшеницы, содержащего в своем геноме, по меньшей мере, фрагмент 163 п.н. SEQ ID NO: 3174, и (ii) удаление фрагмента, по меньшей мере, 10 п.н. из указанного фрагмента SEQ ID NO: 3174, например, по меньшей мере, 20 п.н., 30 п.н., 40 п.н., 50 п.н., 70 п.н., 80 п.н., 90 п.н., 100 п.н., 110 п.н., 120 п.н., 130 п.н., 140 п.н., 150 п.н., 160 п.н. или всего фрагмента SEQ ID NO: 3174 в геноме указанного растения пшеницы, с получением, таким образом, указанного растения пшеницы, несущего восстановитель фертильности Rf3.

Преимущественно, показатель фертильности полученного растения пшеницы выше, чем у родительского растения пшеницы, благодаря удалению указанного фрагмента, представленного в SEQ ID NO: 3174. Специалист может выбрать делецию так, чтобы получить увеличение восстановления фертильности по сравнению с родительским растением пшеницы с полным фрагментом SEQ ID NO: 3174 в своем геноме.

В конкретных воплощениях родительское растение пшеницы имеет показатель фертильности ниже 1, например, он составляет от 0,5 до 1, и полученное растение пшеницы имеет показатель фертильности выше 1, например, составляет от 1 до 2.

Также возможно восстановить фертильность растений, имеющих аллель-невосстановитель rF3, демонстрируя сдвиг рамки вследствие делеции или вставки нуклеотидов по сравнению с последовательностью RLF29a аллеля-восстановителя Rf3 SEQ ID NO: 3146 (см. также Пример 22).

Такое удаление геномного фрагмента или коррекция сдвига рамки могут быть получены любыми подходящими способами, известными специалисту в данной области,

включая инструменты редактирования генома, такие как, но не ограничиваясь этим, мегануклеазы, ZFN, TALEN (WO2011072246) или система CRISPR CAS (включая CRISPR Cas9, WO2013181440) или их последующие поколения, основанные на технологиях двухцепочечного разрыва с использованием сконструированных нуклеаз. Примеры таких способов также описаны в Примере 15 и Примере 22.

Растения пшеницы, полученные способом, описанным выше, также являются частью раскрытия. Как правило, такое растение пшеницы, полученное указанным выше способом или полученное таким способом, несет восстановитель фертильности Rf3, где в геноме указанного растения пшеницы удалена только часть, а не весь геномный фрагмент SEQ ID NO: 3174. Как правило, фрагмент от 10 до 162 п.н. SEQ ID NO: 3174 удаляется в геноме указанного растения пшеницы. Ожидается, что полученное растение пшеницы с геномной делецией имеет показатель фертильности выше, чем показатель фертильности, измеренный для родительского растения пшеницы с идентичным геномом, за исключением полной последовательности SEQ ID NO: 3174 в его геноме. В качестве альтернативы, такое растение пшеницы, полученное вышеуказанным способом или полученное таким способом, несет восстановитель фертильности Rf3, где нуклеотиды RFL29с были удалены или добавлены для восстановления трансляции в рамке.

#### Методы оценки восстановления фертильности в растении пшеницы

Раскрытие также включает способ оценки восстановления фертильности у растения пшеницы, причем указанный способ включает определение наличия или отсутствия фрагмента SEQ ID NO: 3174 в геноме указанного растения, где наличие всего фрагмента свидетельствует о слабом восстановлении фертильности и удаление, по меньшей мере, части такого фрагмента свидетельствует о сильном восстановлении фертильности. Обычно указанный способ выполняется в растении пшеницы, которое может нести восстановитель фертильности Rf3.

В данном документе также раскрыты зонды нуклеиновой кислоты для применения в вышеупомянутых способах оценки восстановления фертильности у растения пшеницы, где указанный зонд нуклеиновой кислоты состоит из нуклеиновой кислоты, по меньшей мере, из 10 нуклеотидов в SEQ ID NO: 3174.

Как правило, указанный зонд нуклеиновой кислоты представляет собой фрагмент, состоящий, по меньшей мере, из 20 п.н., 30 п.н., 40 п.н., 50 п.н., 60 п.н., 60 п.н., 80 п.н., 90 п.н., 100 п.н., 120 п.н., 130 п.н., 140 п.н., 150 п.н., 160 п.н., или весь фрагмент SEQ ID NO: 3174.

Восстановитель фертильности растения пшеницы цитоплазмы CMS T. timopheevii, по меньшей мере, с тремя специфическими аллелями-восстановителями фертильности.

Авторы изобретения показали, что комбинация, по меньшей мере, 3 специфических аллелей-восстановителей фертильности в локусах восстановителей Rf1, Rf3, Rf4 и Rf7 позволяет получить растения с полным восстановлением фертильности цитоплазмы CMS T. timopheevii.

Следовательно, первый аспект настоящего изобретения относится к восстановителю фертильности растения пшеницы цитоплазмы CMS T. timopheevii, в котором растение содержит, по меньшей мере, три аллеля-восстановителя фертильности в локусах-восстановителях, выбранных из числа Rf1, Rf3, Rf4 и Rf7.

В конкретных воплощениях растение содержит, по меньшей мере, три аллеля-восстановителя фертильности Rf1, Rf3, Rf4.

В конкретных воплощениях растение содержит, по меньшей мере, три аллеля-восстановителя фертильности Rf1, Rf4, Rf7.

В конкретных воплощениях растение содержит, по меньшей мере, три аллеля-восстановителя фертильности Rf1, Rf3, Rf7.

В конкретных воплощениях растение содержит, по меньшей мере, три аллеля-восстановителя фертильности Rf3, Rf4, Rf7.

Используемый в настоящем описании термин «локус Rf1» относится к локусу аллеля-восстановителя Rf1, локус которого расположен на расстоянии по большей мере 10 сМ, предпочтительно по большей мере 7 сМ, более предпочтительно по большей мере 2 сМ от маркера cfn0522096 SEQ ID NO: 4 и/или от маркера cfn05277067 SEQ ID NO: 10. В конкретном воплощении восстановитель фертильности растения пшеницы согласно настоящему раскрытию включает, по меньшей мере, один аллель-восстановитель Rf1, причем указанный аллель-восстановитель Rf1 расположен в хромосомном интервале между маркерами SNP cfn0522096 SEQ ID NO: 3190 и cfn05277067 SEQ ID NO: 3196. В конкретных воплощениях восстановитель фертильности растения пшеницы включает один аллель-восстановитель Rf1 в локусе Rf1, характеризующийся наличием одного или более SNP аллелей, как показано в Таблице 1.

SNP#	Название маркера	SEQ ID NO: маркера	Аллель-восстановитель
SNP1	cfn523072	3187	T
SNP2	cfn0523109	3188	A
SNP3	276I13_96B22_97797	3189	C
SNP4	cfn0522096	3190	C
SNP5	cfn0527763	3191	C
SNP6	104A4_105172	3192	TG
SNP7	104A4_105588	3193	A
SNP8	cfn0373248	3194	T
SNP9	cfn1097828	3195	C

SNP10	cfn0527067	3196	A
SNP11	cfn0528390	3197	G
SNP12	BWS0267	3198	A
SNP13	cfn0527718	3199	T
SNP14	cfn0524469	3200	G
SNP15	cfn0524921	3201	G
SNP16	cfn1122326	3202	C

Таблица 1: SNP-маркеры для картирования локуса Rf1

Предпочтительно, восстановитель фертильности растения пшеницы согласно настоящему раскрытию включает один аллель-восстановитель Rf1 в локусе Rf1, характеризующийся наличием аллелей-восстановителей SNP3 и/или SNP7, как описано в Таблице 1. Более предпочтительно восстановитель фертильности растения пшеницы характеризуется гаплотипами аллелей-восстановителей SNP3 и SNP7 «С» и «А». В конкретных воплощениях восстановитель фертильности растения пшеницы с аллелем-восстановителем Rf1 содержит нуклеиновую кислоту Rf1 по настоящему изобретению, как описано выше. Примеры нуклеиновых кислот Rf1 включают раскрытые последовательности нуклеиновых кислот Rf1 SEQ ID NO: 1913, SEQ ID NO: 1914, SEQ ID NO: 1915, SEQ ID NO: 1916 или SEQ ID NO: 3119, предпочтительно нуклеиновая кислота Rf1 содержит SEQ ID NO: 3119.

Используемый в настоящем описании термин «локус Rf3» относится к локусу аллеля-восстановителя Rf3, локус которого находится на расстоянии по большей мере 10 сМ, предпочтительно по большей мере 7 сМ, более предпочтительно по большей мере 2 сМ от маркера cfn1249269 SEQ ID NO: 3205 и/или от маркера BS00090770 SEQ ID NO: 3228. В конкретном воплощении изобретения, восстановитель фертильности растения пшеницы включает, по меньшей мере, один аллель-восстановитель Rf3 в локусе Rf3, причем указанный аллель-восстановитель Rf3 расположен в хромосомном фрагменте между маркерами SNP cfn1249269 и BS00090770. В конкретном воплощении изобретения, восстановитель фертильности растения пшеницы включает один аллель-восстановитель Rf3 в локусе Rf3, характеризующийся наличием одного или более SNP аллелей, как показано в Таблице 2.

SNP#	Название маркера	SEQ ID NO: маркера	Аллель- восстановитель
SNP17	cfn1252000	3203	A
SNP18	IWB14060*	3204	G
SNP19	cfn1249269	3205	G
SNP20	219K1_166464	3206	T

SNP21	219K1_158251	3207	G
SNP22	219K1_111446	3208	A
SNP23	219K1_110042	3209	T
SNP24	219K1_110005	3210	C
SNP25	219K1_107461	3211	A
SNP26	219K1_99688	3212	T
SNP27	219K1_37	3213	C
SNP28	cfn1270524	3214	T
SNP29	136H5_3M5_7601	3215	T
SNP30	cfn1288811	3216	G
SNP31	136H5_3M5_89176	3217	A
SNP32	136H5_3M5_89263	3218	T
SNP33	136H5_3M5_138211	3219	T
SNP34	cfn0556874	3220	C
SNP35	136H5_3M5_64154	3221	C
SNP36	136H5_3M5_68807	3222	G
SNP37	136H5_3M5_77916	3223	A
SNP38	cfn1246088	3224	A
SNP39	cfn1287194	3225	G
SNP40	cfn1258380	3226	A
SNP41	IWB72107*	3227	A
SNP42	BS00090770	3228	T
SNP43	cfn1239345	3229	A

Таблица 2: SNP-маркеры для картирования локуса Rf3

Предпочтительно, восстановитель фертильности растения пшеницы в соответствии с настоящим изобретением включает один аллель-восстановитель Rf3 в локусе Rf3, характеризующийся наличием аллелей-восстановителей SNP29 и/или SNP31, как описано в Таблице 2. Более предпочтительно восстановитель фертильности растения пшеницы характеризуется гаплотипом аллелей-восстановителей SNP29 и SNP31 «Т» и «А», соответственно.

В другом конкретном воплощении, который можно объединить с предыдущими вариантами воплощениями, восстановитель фертильности растения пшеницы согласно настоящему изобретению включает один аллель-восстановитель Rf3 в локусе Rf3, характеризующийся наличием аллелей-восстановителей SNP38 и SNP41 «А» и «А»,

соответственно.

Предпочтительно, восстановитель фертильности растения пшеницы согласно настоящему раскрытию включает нуклеиновую кислоту Rf3, содержащую SEQ ID NO: 1712, SEQ ID NO: 2230, SEQ ID NO: 2238, SEQ ID NO: 3146, SEQ ID NO: 3147 или SEQ ID NO: 3148, предпочтительно SEQ ID NO: 3146.

Как использовано в данном описании, локус Rf7 находится на расстоянии по большей мере 10 сМ от маркера cfn0919993 SEQ ID NO: 3231. В конкретном воплощении изобретения, восстановитель фертильности растения пшеницы включает один аллель-восстановитель Rf7 в локусе Rf7, характеризующийся наличием одного или более SNP аллелей, как показано в Таблице 3:

SNP#	Название маркера	SEQ ID NO: маркера	Аллель-восстановитель
SNP44	cfn0917304	3230	T
SNP45	cfn0919993	3231	G
SNP46	cfn0920459	3232	C
SNP49	cfn0915987	3445	G
SNP50	cfn0920253	3446	A
SNP51	cfn0448874	3447	T

SNP52	cfn0923814	3448	C
SNP53	cfn0924180	3449	G
SNP54	cfn0919484	3450	G

Таблица 3: SNP-маркеры локуса Rf7

Предпочтительно, восстановитель фертильности растения пшеницы согласно настоящему раскрытию включает один аллель-восстановитель Rf7 в локусе Rf7, характеризующийся наличием девяти аллелей-восстановителей SNP, SNP44-SNP46 и SNP49-54 гаплотипа «аллель-восстановитель», как описано в Таблице 3.

Как использовано в данном описании, локус Rf4 находится на расстоянии по большей мере 10 сМ от маркера cfn0393953 SEQ ID NO: 3233. В конкретном воплощении изобретения, восстановитель фертильности растения пшеницы включает один аллель-восстановитель Rf4 в локусе Rf4, характеризующийся наличием одного или более аллелей SNP, как показано в Таблице 4.

SNP#	Название маркера	SEQ ID NO: маркера	Аллель-восстановитель
SNP47	cfn0393953	3233	C
SNP48	cfn0856945	3234	G

Таблица 4: SNP-маркеры локуса Rf4

Предпочтительно, восстановитель фертильности растения пшеницы согласно настоящему раскрытию включает один аллель-восстановитель Rf4 в локусе Rf4, характеризующийся наличием двух аллелей-восстановителей SNP, SNP47 и SNP48, гаплотипа «С» и «G», соответственно, как описано в Таблице 4.

В конкретных воплощениях восстановитель фертильности растения пшеницы с аллелем-восстановителем Rf4 содержит нуклеиновую кислоту Rf4 по настоящему изобретению, как описано выше. Примеры нуклеиновых кислот Rf4 включают раскрытые последовательности нуклеиновых кислот Rf4 SEQ ID NO: 2031, SEQ ID NO: 3140-3142.

В конкретном воплощении настоящего изобретения восстановитель фертильности растения пшеницы цитоплазмы CMS T. timopheevii содержит один аллель-восстановитель Rf3 и два других аллеля-восстановителя фертильности, выбранных из числа аллелей-восстановителей Rf1, Rf4 и Rf7. Предпочтительно восстановитель фертильности цитоплазмы CMS T. timopheevii CMS по настоящему изобретению содержит аллели-восстановители Rf1, Rf3 и Rf7.

В частности, он включает растение пшеницы, содержащее аллели-восстановители Rf1, Rf3 и Rf7, которые обеспечиваются образцами семян, депонированными 25 сентября 2017 года под депозитным номером NCIMB 42811, NCIMB 42812, NCIMB 42813, NCIMB 42814, NCIMB 42815, NCIMB 42816 и NCIMB 42817 в коллекции NCIMB.

Раскрытие также относится к гибридным растениям пшеницы, которые могут быть получены путем скрещивания восстановителя фертильности растения пшеницы согласно настоящему раскрытию, как описано выше, со вторым растением.

В некоторых воплощениях растение пшеницы согласно изобретению является аллоплазматическим и содержит цитоплазму T. timopheevii.

Например, гибридное растение пшеницы может быть получено путем скрещивания восстановителя фертильности растения пшеницы согласно настоящему раскрытию, как описано выше, предпочтительно содержащего аллели-восстановители Rf1, Rf3 и Rf7, и растения пшеницы, которое не имеет указанных аллелей-восстановителей фертильности.

В данном документе также раскрыт способ получения гибридного растения пшеницы, включающий стадии:

- a. скрещивания стерильного женского растения пшеницы, содержащего цитоплазму T. timopheevii, с фертильным мужским растением пшеницы по настоящему изобретению, как описано выше;
- b. сбора гибридных семян;
- c. необязательно детекции присутствия цитоплазмы T. timopheevii и/или, по меньшей мере, трех локусов Rf, выбранных из числа Rf1, Rf3, Rf4 и Rf7 в гибридном семени;
- d. необязательно детекции уровня гибридности гибридного семени.

Следовательно, в данном документе также раскрыты растения или линии пшеницы согласно настоящему раскрытию, разработанные для получения таких гибридных

растений. Такие растения или линии обычно содержат цитоплазматические элементы, необходимые для реализации соответствующей гибридной системы. Предпочтительно растения или линии содержат аллели-восстановители фертильности Rf1, Rf3 и Rf7 и цитоплазму T. timopheevii. В конкретных воплощениях такие растения или линии содержат аллель-восстановитель фертильности Rf1, содержащий нуклеиновую кислоту Rf1 по настоящему изобретению, как описано выше.

В качестве альтернативы, детекцию присутствия цитоплазмы T. timopheevii и, по меньшей мере, трех из локуса Rf, выбранных из числа Rf1, Rf3, Rf4 и Rf7 (стадия «с» описанного выше способа), может быть выполнено в родительских линиях с целью проверки их генотипа до начала скрещивания (стадия «а»).

Цитоплазма T-CMS может быть детектирована либо фенотипически, где растение, несущее гены rf и цитоплазму T-CMS, будет стерильным, либо молекулярными средствами, способными детектировать ген of256, как описано в Rathburn and Hedgcoth, 1991 и в Song and Hedgcoth, 1994.

Способ получения и выбора растения пшеницы раскрытия

Настоящее раскрытие также относится к способам получения растения пшеницы с аллелями-восстановителями фертильности, как описано в предыдущем разделе.

В одном воплощении указанный способ получения растения пшеницы включает следующую стадию:

a. предоставление первого растения пшеницы, содержащего один или два аллеля-восстановителя, выбранные из аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf7,

b. скрещивание указанного первого растения пшеницы со вторым растением пшеницы, содержащим один или два аллеля-восстановителя, выбранные из аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf7, где аллели-восстановители Rf1, Rf3 и Rf7 представлены, по меньшей мере, один раз на панели аллелей-восстановителей, представленной первым растением и вторым растением,

c. сбор гибридного семени F1,

d. получение гомозиготных растений из растений F1,

e. необязательно детекцию присутствия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf7 в гибридном семени и/или в каждом поколении.

Предпочтительно, женское растение на стадии b) несет цитоплазму T-CMS. В этом случае присутствие аллелей-восстановителей оценивается на каждом поколении от стадии b) до стадии d) с использованием маркеров и, необязательно, путем дальнейшего определения уровня фертильности.

Способ получения гомозиготных растений обычно хорошо известен специалистам

в данной области. Он может быть осуществлен либо с помощью повторяющегося возвратного скрещивания, либо с помощью метода двойных гаплоидов, либо с помощью метода индивидуального отбора от одного семени (Single Seeds Descent) (SSD).

Заявитель депонировал образец семян раскрытого растения пшеницы с указанными аллелями-восстановителями Rf1, Rf3 и Rf7 25 сентября 2017 года по Будапештскому договору в коллекции NCIMB под номером NCIMB 42811, NCIMB 42812, NCIMB 42813, NCIMB 42814, NCIMB 42815, NCIMB 42816 и NCIMB 42817.

Настоящее раскрытие дополнительно включает и предоставляет способы идентификации соответствующих аллелей-восстановителей Rf1, Rf3, Rf4 и/или Rf7, как раскрыто в предыдущих разделах, и более общие способы отбора или селекции растений пшеницы на наличие или отсутствие аллелей-восстановителей фертильности Rf1, Rf3, Rf4 и/или Rf7. Такие способы идентификации, отбора или селекции растений пшеницы включают получение одного или более растений пшеницы и оценку их ДНК для определения наличия или отсутствия аллелей-восстановителей фертильности Rf1, Rf3, Rf4 и/или Rf7, содержащихся в соответствующем локусе.

Такие способы могут использоваться, например, для определения того, какое потомство, полученное в результате скрещивания, имеет требуемую комбинацию аллелей-восстановителей фертильности, и, соответственно, для руководства подготовки растений, имеющих требуемую комбинацию, в комбинации с наличием или отсутствием других желательных признаков.

Соответственно, растения могут быть идентифицированы или отобраны путем оценки их на наличие одного или более отдельных SNP, указанных в приведенных выше Таблицах 1, 2, 3 и 4, а также SNP в Таблице 19 для оценки наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3, Rf7 или Rf4, соответственно.

В более общем смысле в данном документе раскрыты конкретные средства для детекции аллелей-восстановителей в растении пшеницы, более конкретно, аллелей-восстановителей Rf1, Rf3, Rf4 и Rf7 и их комбинации.

Таким образом, указанные средства включают любые средства, подходящие для детекции следующих маркеров SNP в одном или более из следующих маркеров: SEQ ID NO: 3187-3235.

Любой способ, известный в данной области техники, может быть использован в данной области для оценки наличия или отсутствия SNP. Некоторые подходящие способы включают, без ограничения указанным, секвенирование, анализы гибридизации, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), лигазную цепную реакцию (LCR) и генотипирование на основе отдельных нуклеотидных последовательностей (GBS) или их

комбинации.

Специалисту в данной области доступны различные способы на основе ПЦР. Можно использовать метод RT-PCR или метод Kaspar от KBioscience (LGC Group, Теддингтон, Мидлсекс, Великобритания).

Система генотипирования KASP™ использует три целевых специфических праймера: два праймера, каждый из которых специфичен для SNP каждой аллельной формы (Single Nucleotide Polymorphism) и один отличный праймер для достижения обратной амплификации, который является общим для обеих аллельных форм. Каждый целевой специфический праймер также имеет хвостовую последовательность, которая соответствует одному из двух зондов FRET: одна метка с красителем FAM®, а другая с красителем HEX®.

Выполняются последовательные реакции ПЦР. Характер испускаемой флуоресценции используется для идентификации аллельной формы или форм, присутствующих в смеси из исследуемой ДНК.

Праймеры, указанные в Таблице 5, особенно подходят для применения с системой генотипирования KASP™. Конечно, специалист в данной области может использовать варианты праймеров или праймеры в виде зондов нуклеиновой кислоты, как указано в Таблице 5, причем указанные варианты праймеров или зонды нуклеиновой кислоты имеют, по меньшей мере, 90% и предпочтительно 95% идентичности последовательности с любым одним из праймеров, идентифицированных в Таблице 5, или с геномным фрагментом ДНК, амплифицированным соответствующим набором праймеров, как указано в Таблице 5.

Процент идентичности последовательностей, как используется в данном документе, определяется путем вычисления количества совпадающих положений в выровненных последовательностях нуклеиновых кислот, деления количества совпадающих положений на общее количество выровненных нуклеотидов и умножения на 100. Совпадающее положение относится к положению, в котором идентичные нуклеотиды находятся в одном и том же положении в выровненных последовательностях нуклеиновых кислот. Например, последовательности нуклеиновых кислот могут быть выровнены с использованием последовательностей BLAST 2 (Bl2seq) с использованием алгоритмов BLASTN ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Используемый в данном документе праймер охватывает любую нуклеиновую кислоту, которая способна инициировать синтез зарождающейся нуклеиновой кислоты в процессе, зависящем от матрицы, таком как ПЦР. Как правило, праймеры представляют собой олигонуклеотиды от 10 до 30 нуклеотидов, но можно использовать более длинные

последовательности. Праймеры могут быть предоставлены в двухцепочечной форме, хотя предпочтительной является одноцепочечная форма. Альтернативно, может быть использован зонд нуклеиновой кислоты. Зонд нуклеиновой кислоты охватывает любую нуклеиновую кислоту, по меньшей мере, из 30 нуклеотидов и которая может специфически гибридизоваться в стандартных жестких условиях с определенной нуклеиновой кислотой. Стандартные жесткие условия, используемые в настоящем документе, относятся к условиям гибридизации, описанным, например, в Sambrook et al., 1989, которые могут включать 1) иммобилизацию фрагментов геномной ДНК растения или ДНК библиотеки на фильтре, 2) предварительную гибридизацию фильтра в течение 1-2 часов при температуре 65 °С, 6х SSC 5х реагент Денхардта, 0,5% SDS и 20 мг/мл денатурированной ДНК-носителя 3) добавление зонда (меченного) 4) инкубацию в течение 16-24 часов 5) отмывание фильтра один раз в течение 30 минут при 68 °С в 6х SSC, 0,1% SDS 6) отмывание фильтра три раза (два раза в течение 30 минут в 30 мл и один раз в течение 10 минут в 500 мл) при 68 °С в 2х SSC 0,1% SDS.

В конкретных воплощениях указанные праймеры для обнаружения маркеров SNP по настоящему изобретению (специфичные для каждого аллеля «X» или «Y» или общие) такие, как перечислены в следующей Таблице 5:

Таблица 5: Праймеры для применения при обнаружении маркеров SNP восстановителя фертильности по изобретению (как указано в названии праймера)

SEQ ID NO	ID	Последовательность
3253	cfn0238384 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTAAAAAGATGTC TGTGTGTCTAGC
3254	cfn0523109 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTGAACAAAAC AGGCCTACAATCA
3255	cfn0560679 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAATGATGTTTAAC ATTGGAACGGTCC

3256	cfn0917304 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTGGTGGCGCTCT ACCCG
3257	cfn0919993 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAGTCATCGACTT ACATGCTTCTTTG
3258	cfn0920459 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGCCAAGGAAGC CCAGATTTTC
3259	cfn1087371 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGGGGAACTTTGG GTATACACCA
3260	cfn1252000 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTTAATGCTGTAG CCATTCTTGCAA
3261	BWS0267 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCAGCTGCATAAA AAMCAGAATACCA
3262	cfn0524469 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCACGTAGTAAGT ATTGATTTTTCTGTG
3263	cfn0527067 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAAATTACTTTTG TTCTTTTATTTTTTTCGAAT
3264	cfn0527718 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAATTGTTCCACAAC ATGGACATGAGAAC

3265	cfn1082074 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTACTGATAAAATC CGGTTCAAATATATAAC
3266	cfn1239345 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGCTTCTTTTTTCT CCCTATAATATGGA
3267	cfn0554333 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAGAGGCATCACA TAGGCATAG
3268	cfn0436720 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATTCTTCATTCTT ACAACAAATATACCAAATT
3269	cfn0522096 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGTAGAATACCAC CCAATAAATCACTG
3270	cfn0523072 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTAGCGCATGAGG TCTATCG
3271	cfn0523990 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACATGAAGAGTGC AGGCACACG
3272	cfn0524921 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATTGTTTCCATGTT AAGCTTATATTGTGCA
3273	cfn0528390 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAAAACATCTATT CCAAGCAAGTATTAGTAAT

3274	cfn0530841 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCTTGTTTATATAT TCTCTTATCAGAAGTC
3275	cfn1122326 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAATCTGATTAAG ACGCTGGAGAAC
3276	cfn1249269 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGATTCAAAGAGGT GACAAATATGTGTACT
3277	contig46312_253_BS 00090770 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTCGTAGCACAT AGCCGTTTAC
3278	219K1_110042 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACGGAATCGAGTC AACCAATTCT
3279	cfn0373248 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAACAACAATTAYG AGGATCAAATGGTCA
3280	cfn0527763 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATCTAGCCACGCA AATGCCCGT
3281	cfn0556874 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAAGAGCATGTCA GACACAATGCAG
3282	cfn1097828 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTTCCTGAGAGA GCAACCA

3283	cfn1246088 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGACATCTGATGAG CCAGCATACA
3284	cfn1258380 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATCTACTCATCTA TTGCAGATGCTCTT
3285	cfn1270524 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAATGCCTAGTCT ATACCTGATAAACTAAA
3286	cfn1287194 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACCTCCTCCGTAT CTGATGGC
3287	cfn1288811 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTAATTTGGTTAAC CAAATCCTTTTTGATTTTT
3288	cfn1291249 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCCCAGATTTAGC ATGTGCATT
3289	cfn0231871 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACTGTATTAATTA AGCTAGTGTGGCG
3290	cfn0393953 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAAAACAAGTTGT CACCCAGATGAATC
3291	cfn0867742 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCATCCTCGACAA TGATTTTCATCG

3292	cfn3126082 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGATTTTAGCACC TAACGCCGCAA
3293	104A4_105172 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTCGMACCCAATG ATAATGTTT
3294	104A4_105588 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTTCCCTTGAGACA TGTACTCATAA
3295	136H5_3M5_138211 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACTGGGTGCAAAG CCAAGATGATT
3296	136H5_3M5_64154 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGCGAAACTTCGC CGCGATAAAT
3297	136H5_3M5_68807 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAAGTTGCTCTTA ATTATCTGTGCGTA
3298	136H5_3M5_7601 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCGTCCCCCATGGC ACCTGT
3299	136H5_3M5_77916 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATAGCAAGTAGAG TTAACTTATCAAGTTATA

3300	136H5_3M5_89176 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGATTTTCTCACC GGCATCTCCA
3301	136H5_3M5_89263 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCCCATGTTCTTTT TTTGCTCAAAAC
3302	219K1_107461 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATATTGTTTGTATT AAAAAGTTGTGTGTTTTGA
3303	219K1_110005 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCCTTTTCTTCTTC CAGCATCTAC
3304	219K1_111446 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGAATCGTTCTTC GAGAAGCACTCA
3305	219K1_158251 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCTGGAGATGGAT CCGGTCAG
3306	219K1_166464 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCTGAGCTGGGCT GCACC
3307	219K1_37	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAAGGGCTATCCT GGTGAACAAC

3308	219K1_99688 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTTGCCCTGCGCA AAATCAAACCTT
3309	276I13_96B22_97797 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTACTATGGCTAT GTCTCTGAATGC
3310	CAP7_c3847_204 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCATTCGACGCGTC TTCCGCAATA
3311	Tdurum_contig50667 _306 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGATGACATGGAGG ATTATATCGACGA
3312	cfn0856945 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCACATGCTTTAT TACTGATCTGATTTG
3313	S100067637 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCAAATGTCCGAA TTCAGAGCAG
3404	S100069923 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACATATACGCGAG CGCTCCTG
3315	S3045171 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTTCTTGGCACA CTCCCCAG

3316	S3045222 AlleleX	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAACCTAAGTAGTA AGCTTGCTGGGT
3317	cfn0238384 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTAAAAAGATGTC TGTGTGTCTAGG
3318	cfn0523109 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTGAACAAAACA GGCCTACAATCC
3319	cfn0560679 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCAATGATGTTTAA CATTGGAACGGTCT
3320	cfn0917304 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGTGGTGGCGCTC TACCCT
3321	cfn0919993 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCAAGTCATCGACT TACATGCTTCTTTT
3322	cfn0920459 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAGCCAAGGAAGC CCAGATTTTG
3323	cfn1087371 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGGGAACTTTGGG TATACACCG
3324	cfn1252000 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTTAATGCTGTAG CCATTCTTGCAG

3325	BWS0267 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCAGCTGCATAAA AAMCAGAATACCG
3326	cfn0524469 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCACGTAGTAAGT ATTGATTTTTCTGTT
3327	cfn0527067 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCAAATTACTTTTG TTCTTTTATTTTTTTCGAAC
3328	cfn0527718 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATAAATTGTTAC AACATGGACATGAGAAT
3329	cfn1082074 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTTACTGATAAAA TCCGGTTCAAATATATAAT
3330	cfn1239345 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCTTCTTTTTTCTC CCTATAATATGGG
3331	cfn0554333 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAGAGGCATCAC ATAGGCATAC
3332	cfn0436720 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTTCATTCCTTAC AACAAATATACCAAATC
3333	cfn0522096 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAGTAGAATACCA CCCAATAAATCACTC

3334	cfn0523072 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTA ACTCTAGCGCAT GAGGTCTATCA
3335	cfn0523990 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATACATGAAGAGT GCAGGCACACT
3336	cfn0524921 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTTTCCATGTTAA GCTTATATTGTGCG
3337	cfn0528390 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTA AACATCTATTCC AAGCAAGTATTAGTAAC
3338	cfn0530841 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTTCTTGTTTATAT ATTCTCTTATCAGAAGTT
3339	cfn1122326 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGAATCTGATTAA GACGCTGGAGAAT
3340	cfn1249269 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCAAAGAGGTGAC AAATATGTGTACC
3341	contig46312 Allele Y_253_BS00090770	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAGGTCGTAGCAC ATAGCCGTTTAT
3342	219K1_110042 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCGGAATCGAGTC AACCAATTCCC

3343	cfn0373248 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAACAACAATTAY GAGGATCAAATGGTCT
3344	cfn0527763 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTAGCCACGCAA ATGCCCCG
3345	cfn0556874 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAAAGAGCATGT CAGACACAATGCAA
3346	cfn1097828 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGTTCCTGAGAGA GCAACCG
3347	cfn1246088 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGACATCTGATGAG CCAGCATACC
3348	cfn1258380 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTACTCATCTATT GCAGATGCTCTG
3349	cfn1270524 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAATGCCTAGTCT ATACCTGATAAACTAAT
3350	cfn1287194 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCACCTCCTCCGTA TCTGATGGT
3351	cfn1288811 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAATTTGGTTAACC AAATCCTTTTTGATTTG

3352	cfn1291249 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTTCCCAGATTTA GCATGTGCATG
3353	cfn0231871 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTACTGTATTAAA TTAGCTAGTGTGGCT
3354	cfn0393953 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAAAAAAACAAGT TGTCACCCAGATGAATT
3355	cfn0867742 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGCATCCTCGACA ATGATTTTCATCT
3356	cfn3126082 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTAGCACCTAACG CCGCAAC
3357	104A4_105172 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTGTCGMACCCA ATGAATAATGTTC
3358	104A4_105588 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTTTCCTTGTGACA TGTAATCATAAC
3359	136H5_3M5_138211 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACTGGGTGCAAA GCCAAGATGATA
3360	136H5_3M5_64154	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCGAAACTTCGCC GCGATAAAC

	Allele Y	
3361	136H5_3M5_68807 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAAGTTGCTCTTAA TTATCTGTGCGTG
3362	136H5_3M5_7601 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTCCCCCATGGCA CCTGC
3363	136H5_3M5_77916 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAGCAAGTAGAGTT AACTTATCAAGTTATTG
3364	136H5_3M5_89176 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTCTCACCGGCAT CTCCG
3365	136H5_3M5_89263 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTTCCCATGTTCT TTTTTGCTCAAAT
3366	219K1_107461 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATATTGTTTGTAT TAAAAGTTGTGTGTTTGC
3367	219K1_110005 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCGCCTTTTCTTCTT CCAGCATCTAT
3368	219K1_111446 Allele	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAATCGTTCTTCGA GAAGCACTCC

	Y	
3369	219K1_158251 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCTGGAGATGGAT CCGGTCAA
3370	219K1_166464 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCCTGAGCTGGGC TGCACT
3371	219K1_37 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACAAAGGGCTAT CCTGGTGAACAAT
3372	219K1_99688 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCCCTGCGCAA ATCAAATC
3373	276I13_96B22_97797 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAAGTACTATGGCT ATGTCTCTGAATGT
3374	CAP7_c3847_204 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCGACGCGTCTTCC GCAATG
3375	Tdurum_contig50667_306 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATGACATGGAGG ATTATATCGACGG

3376	cfn0856945 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGCACATGCTTTA TTACTGATCTGATTTT
3377	S100067637 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCAAATGTCCGAA TTCAGAGCAC
3378	S100069923 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTACATATACGCG AGCGCTCCTA
3379	S3045171 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGTTCTTGGCACA CTCCCAA
3380	S3045222 Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCTAAGTAGTAAG CTTGCTGGGC
3381	cfn0238384 Common	AGGGGGGCGTACGGGGTGA
3382	cfn0523109 Common	GTGTGTGCTAATGTGGATATACGTAAGTT
3383	cfn0560679 Common	GACGTTGAAGGGGGCATAGATCAA
3384	cfn0917304 Common	CAACTGCTTGGAGAAAGGCAACACAA

3385	cfn0919993 Common	CCATTAACAAGTACTGCATAGGTGCATAT
3386	cfn0920459 Common	CCTCCTCCTAATTAAGCTCCTATAGATA
3387	cfn1087371 Common	CCCCCTTCTTCTTTCACTAGGGTAA
3388	cfn1252000 Common	GTGCCCATAAGACGACTGGGACAA
3389	BWS0267 Common	CTGCGTTAAGGTTTCAGGCAACTGAT
3390	cfn0524469 Common	GCCAATTTTCAAATCTAAGTCCACAGAGA
3391	cfn0527067 Common	ATATGATTCACCCTAGATCCTTCACCTTA
3392	cfn0527718 Common	GTTTCCTCCAATGTTCTTCCC
3393	cfn1082074 Common	TGTCTCGCCTCGCTCTGGTTAATTT

3394	cfn1239345 Common	ACCCTCGCTGCAGTTCCTTCTTAAA
3395	cfn0554333 Common	AAATTCACACCATCATTGATCTGGGGTAT
3396	cfn0436720 Common	GTCCACTGAGAATTAAGGATGCATTCTTT
3397	cfn0522096 Common	AAGTAGTACTCGTAGAGAGTTAACACAGA
3398	cfn0523072 Common	GCTTGACAATGATAATGCCCCCGAA
3399	cfn0523990 Common	AATAACTCTTGTACTTCAGGATGAACGTTT
3400	cfn0524921 Common	GCCCTTTGGTAATTCCATTTCAATCTTTT
3401	cfn0528390 Common	GATGAGGAAGGTCTTCATGTTGGGTT
3402	cfn0530841 Common	GAGCAGCACATCGTTAGCTGTTCTA

3403	cfn1122326 Common	CAGATGGCCTAGTCGTGACATATCTT
3404	cfn1249269 Common	TAAAAGAACACAAATGTGGCCCTAGTGAT
3405	contig46312 _253_BS00090770 Common	GAAACATTCTTCGGACAACACTATGCATTA
3406	219K1_110042 Common	GCATCTTCAAGGGAGCCACTCAAAA
3407	cfn0373248 Common	ATCATTGCCACGRAAAAAATCTCACAAGAT
3408	cfn0527763 Common	CCTTGTCACCGAGACATGTACAAA
3409	cfn0556874 Common	CCTGCTGGAAATGGGATTTCTTGTTTATT
3410	cfn1097828 Common	GCTTCCTCTCGGTAGCGATGGAT

3411	cfn1246088 Common	GGGACGTGGAATTTGGAAAGACACAT
3412	cfn1258380 Common	TATAGGAGTGATAGCACACACAATTCAT
3413	cfn1270524 Common	TGTACCGAAACTCAACCAAATGACCATTT
3414	cfn1287194 Common	CAGAAGGCACTGGGAGGGGATT
3415	cfn1288811 Common	GCACAATGTTTGACATTCGGTTTTCTAGTT
3416	cfn1291249 Common	CTGACTGTCGTATCTTCAACATACTGATT
3417	cfn0231871 Common	CCAAGGTATATGTGCCATTATCCTCAA
3418	cfn0393953 Common	CACTCACCGTCGACATTGACATAGTT
3419	cfn0867742 Common	AGCCTCCGCGTCGTGATGGAAT

3420	cfn3126082 Common	AAAGGGACAGCGATTTGATCTGG
3421	104A4_105172 Common	GCCATCCTCTCGGAGCCAGAA
3422	104A4_105588 Common	CAAGGATGGGGAGTATATGGCTCTT
3423	136H5_3M5_138211 Common	CCTCCCAACGGCCATCAATCAATT
3424	136H5_3M5_64154 Common Common	GATCATCGGGGAACCTGATGATAGTT
3425	136H5_3M5_68807 Common	TTGGTTGGTTACGTCAGGTTAAGACTTA
3426	136H5_3M5_7601 Common	CTTCTCTGTGGCCGAAAACCTCTT
3427	136H5_3M5_77916 Common	GCTKTAGACTCTAAGTACCACAGAAGAA

3428	136H5_3M5_89176 Common	CCTACCATCCTTAAATACTCTTGCTCAA
3429	136H5_3M5_89263 Common	AAGCAACTAGAAAAATATTGGACTAGCAT
3430	219K1_107461 Common	GTTGATGCGAATTTGAAAATGACATAATA
3431	219K1_110005 Common	TTGACTCGATTCCGTGTGAGGCTAA
3432	219K1_111446 Common	AATATGATACAGACCCAAGACAAACCATT
3433	219K1_158251 Common	TCCTCACAAATCACGGGCCCT
3434	219K1_166464 Common	GACCGTGGTATATGCCACCACGTT
3435	219K1_37 Common	GGCTTCATTATCAAATTCTGACCCATCTT

3436	219K1_99688 Common	GGGCGGGACCTGACTTGATGAT
3437	276I13_96B22_97797 Common	ACGACAATATAGACAAATAAAACCAAACAA
3438	CAP7_c3847_204 Common	CCGCGGCCGAAGCAGGCAA
3439	Tdurum_contig50667 _306 Common	ATACATGTCGGCGTCCCAGTCC
3440	cfn0856945 Common	GGTGTAGGCAAACCTAAAATAAACAGTCAA
3441	S100067637 Common	CAACGCCAAACGCCAACGCCAT
3442	S100069923 Common	GCCTTGTACTIONGCAGTGAAGTGTGAT
3443	S3045171 Common	TGACGGCTGCGAGGACGAGAAT

3444	S3045222 Common	AGTCCAGAGTTACAGGACATGGCTA
------	-----------------	---------------------------

#### Применение растений пшеницы раскрытия

Растение в соответствии с настоящим раскрытием можно скрещивать с любой другой инбредной линией, чтобы получить новую линию, содержащую либо увеличение, либо уменьшение уровня фертильности. Альтернативно, генетический признак, который был интегрирован в конкретную линию с использованием вышеупомянутых методов, может быть перемещен в другую линию с использованием традиционных методов возвратного скрещивания, которые хорошо известны в области селекции растений. Например, подход возвратного скрещивания может использоваться для перемещения сконструированного признака из общедоступной неэлитной инбредной линии в элитную инбредную линию или из инбредной линии, содержащей чужеродный ген в своем геноме, в инбредную линию или линии, которые не содержат этот ген. Используемый в настоящем описании термин «скрещивание» может относиться к простому скрещиванию X с Y или процессу возвратного скрещивания в зависимости от контекста.

Растение пшеницы по настоящему изобретению также представляет собой растение пшеницы, в котором один или более желательных признаков были дополнительно введены посредством способов возвратного скрещивания, независимо от того, является ли такой признак встречающимся в природе или нет.

Раскрытие также относится к использованию растения пшеницы, как описано выше, или его семян, для пищевых применений, предпочтительно для производства муки и для продуктов питания, или для селекционных применений, например, для применения в качестве родительского растения в селекции для повышения агрономической ценности растения, линии, гибрида или сорта пшеницы.

При использовании в настоящем документе, селекционные применения охватывают селекционное разведение для улучшения агрономической ценности растения, линии, гибрида или сорта.

Растения пшеницы, раскрытые в настоящем описании, также полезны, например, для производства муки или для продуктов питания.

Семена, собранные с растений, описанных в настоящем документе, можно использовать для приготовления муки любыми доступными в данной области способами. Растения пшеницы или их мука также полезны в качестве пищевых композиций для человека или животных.

Приведенные ниже примеры приведены только для иллюстрации.

## ОСОБЫЕ ВОПЛОЩЕНИЯ

1. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая белок-восстановитель фертильности *T. timopheevii*, в котором соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной среди любой из последовательностей от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 1554.

2. Нуклеиновая кислота по воплощению 1, кодирующая белок Rf1, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS *T. timopheevii*, отличающаяся тем, что соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 99% или 100 % идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NOs 1-2, SEQ ID NO: 288-290, SEQ ID NO: 293-296, SEQ ID NO: 343-346, SEQ ID NO: 349-354, SEQ ID NO: 359, 361 и 362, SEQ ID NO: 396 и 397, SEQ ID NO: 428-430, SEQ ID NO: 517 и 519, SEQ ID NO: 752-754, SEQ ID NO: 1092, 1093 и 1095.

3. Нуклеиновая кислота по воплощению 1, кодирующая белок Rf1, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS *T. timopheevii*, отличающаяся тем, что соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 99% или 100 % идентичности с SEQ ID NO: 361.

4. Нуклеиновая кислота по п. 1, кодирующая белок Rf3, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS *T. timopheevii*, отличающаяся тем, что соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 99% или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 124 и 125, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 315-321, SEQ ID NO: 379-381, SEQ ID NO: 553 и 554, SEQ ID NO: 557 и 558, SEQ ID NO: 676 и 677, SEQ ID NO: 684 и 685, SEQ ID NO: 696 и 697, SEQ ID NO: 938 и 939 и SEQ ID NO: 1038 и 1039.

5. Нуклеиновая кислота по воплощению 4, кодирующая белок Rf3, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS *T. timopheevii*, отличающаяся тем, что соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 676 и SEQ ID NO: 684.

6. Нуклеиновая кислота по воплощению 1, кодирующая белок Rf4, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS T. timopheevii, отличающаяся тем, что соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 99% или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 477 и SEQ ID NO: 3135-3138.

7. Нуклеиновая кислота по воплощению 1, кодирующая белок Rf7, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS T. timopheevii, отличающаяся тем, что соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 99% или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 240-243, SEQ ID NO: 303-305, SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 373-377, SEQ ID NO: 497-499, SEQ ID NO: 516, SEQ ID NO: 709-711, SEQ ID NO: 768.

8. Нуклеиновая кислота по воплощению 1, кодирующая белок Rf-гусе, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS T. timopheevii, отличающаяся тем, что соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 378 и SEQ ID NO: 859.

9. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-восстановитель цитоплазмы CMS T. timopheevii по любому из воплощений 1-8, функционально связанную с регуляторными элементами.

10. Вектор для применения в трансформации растения пшеницы, содержащий рекомбинантную нуклеиновую кислоту воплощения 9.

11. Трансгенное растение пшеницы, содержащее одну или более нуклеиновых кислот любого из воплощений 1-9 в качестве трансгенного элемента (элементов).

12. Трансгенное растение пшеницы по воплощению 11, которое представляет собой восстановитель фертильности растения пшеницы цитоплазмы CMS T. timopheevii и содержит комбинацию, по меньшей мере, из двух различных трансгенных элементов, выбранных из группы, состоящей из нуклеиновых кислот Rf1, Rf3, Rf7 и Rf-гусе любого из воплощений 1-9.

13. Трансгенное растение пшеницы по воплощению 11 или 12, отличающееся тем, что указанное трансгенное растение включает следующую комбинацию нуклеиновых кислот в качестве трансгенных элементов:

а. нуклеиновая кислота Rf1, кодирующая аминокислотную последовательность,

имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 359, 361, 362 или SEQ ID NO: 428-430, и нуклеиновая кислота Rf3, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 315-321, SEQ ID NO: 379-381, SEQ ID NO: 147 и 150, SEQ ID NO: 156 и 158, SEQ ID NO: 297 и 299, SEQ ID NO: 676 и SEQ ID NO: 684,

b. нуклеиновая кислота Rf1, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 359, 361, 362 или SEQ ID NOs428-430, и нуклеиновая кислота Rf7, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 516 и SEQ ID NO: 768,

c. нуклеиновая кислота Rf1, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 359, 361, 362 или SEQ ID NOs428-430, и нуклеиновая кислота Rf-гье, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую по, меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 378 и SEQ ID NO: 859,

d. нуклеиновая кислота Rf3, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 315-321, SEQ ID NO: 379-381, SEQ ID NO: 147 и 150, SEQ ID NO: 156 и 158, SEQ ID NO: 297 и 299, SEQ ID NO: 676 и SEQ ID NO: 684, и нуклеиновая кислота Rf7, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 516 и SEQ ID NO: 768,

e. нуклеиновая кислота Rf3, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 315-321, SEQ ID NO: 379-381, SEQ ID NO: 147 и 150, SEQ ID NO: 156 и 158, SEQ ID NO: 297 и 299, SEQ ID NO: 676 и SEQ ID NO: 684, и нуклеиновая кислота Rf-гье, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 378 и SEQ ID NO: 859,

f. нуклеиновая кислота Rf7, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 516 и SEQ ID NO: 768, и нуклеиновая кислота Rf-гье, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 378 и SEQ ID NO: 859,

g. нуклеиновая кислота Rf1, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 359, 361, 362 или SEQ ID NO: 428-430, и нуклеиновая кислота Rf3, кодирующая аминокислотную

последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 315-321, SEQ ID NO: 379-381, SEQ ID NO: 147 и 150, SEQ ID NO: 156 и 158, SEQ ID NO: 297 и 299, SEQ ID NO: 676 и SEQ ID NO: 684, и нуклеиновая кислота Rf7, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 516 и SEQ ID NO: 768;

h. нуклеиновая кислота Rf1, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 359, 361, 362 или SEQ ID NO: 428-430, и нуклеиновая кислота Rf3, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 315-321, SEQ ID NO: 379-381, SEQ ID NO: 147 и 150, SEQ ID NO: 156 и 158, SEQ ID NO: 297 и 299, SEQ ID NO: 676 и SEQ ID NO: 684, и нуклеиновая кислота Rf-rye, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 378 и SEQ ID NO: 859;

i. нуклеиновая кислота Rf1, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 359, 361, 362 или SEQ ID NO: 428-430, и нуклеиновая кислота Rf7 по воплощению 4, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 516 и SEQ ID NO: 768, и нуклеиновая кислота Rf-rye, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 378 и SEQ ID NO: 859; или

j. нуклеиновая кислота Rf3, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 315-321, SEQ ID NO: 379-381, SEQ ID NO: 147 и 150, SEQ ID NO: 156 и 158, SEQ ID NO: 297 и 299, SEQ ID NO: 676 и SEQ ID NO: 684, и нуклеиновая кислота Rf7, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 516 и SEQ ID NO: 768, и нуклеиновая кислота Rf-rye, кодирующая аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 378 и SEQ ID NO: 859.

24. Трансгенное растение пшеницы по воплощению 13, которое дополнительно содержит нуклеиновую кислоту Rf4, кодирующую белок Rf4, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS T. timopheevii, в комбинации с одной, двумя, тремя или четырьмя из любой нуклеиновой кислоты-восстановителя, кодирующей белок Rf1, Rf3, Rf7 или Rf-rye, где соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из

группы, состоящей из SEQ ID NO: 477 и SEQ ID NO: 3135-3138.

25. Трансгенное растение пшеницы по любому из воплощений 11-14, отличающееся тем, что указанный один или более трансгенных элементов экспрессируют полипептиды, которые восстанавливают или улучшают мужскую фертильность растения по сравнению с родительским растением без такого трансгенного элемента (элементов).

26. Способ получения трансгенного растения пшеницы по любому из воплощений 11-15, отличающийся тем, что способ включает стадии трансформации исходного растения пшеницы одной или более нуклеиновыми кислотами, кодирующими белок-восстановитель цитоплазмы CMS T. timopheevii, в соответствии с любым из воплощений 1-9, выбора растения, содержащего указанную одну или более нуклеиновых кислот в качестве трансгена (трансгенов), восстановления и выращивания указанного трансгенного растения пшеницы.

27. Способ получения растения пшеницы, несущего восстановитель фертильности Rf3, при этом указанный способ включает (i) предоставление родительского растения пшеницы, содержащего в своем геноме, по меньшей мере, 163 п.н. фрагмента SEQ ID NO: 3174, и (ii) удаление области, по меньшей мере, 10 п.н. в указанном фрагменте SEQ ID NO: 3174, например, по меньшей мере, 20 п.н., 30 п.н., 40 п.н., 50 п.н., 60 п.н., 70 п.н., 80 п.н., 90 п.н., 100 п.н., 110 п.н., 120 п.н., 130 п.н., 140 п.н., 150 п.н., 160 п.н. или всего фрагмента SEQ ID NO: 3174 в геноме указанного растения пшеницы с получением указанного растения пшеницы, несущего восстановитель фертильности Rf3.

28. Способ по воплощению 17, отличающийся тем, что показатель фертильности полученного растения пшеницы имеет показатель фертильности выше, чем у исходного растения пшеницы.

29. Способ по воплощению 17 или 18, отличающийся тем, что исходное растение пшеницы имеет показатель фертильности ниже 1, например, составляет от 0,5 до 1, и полученное растение пшеницы имеет показатель фертильности выше 1, например, составляет от 1 до 2.

30. Растение пшеницы, несущее восстановитель фертильности Rf3, полученное способом по любому из воплощений 17-19, отличающееся тем, что в геноме указанного растения пшеницы удалена только часть, а не весь геномный фрагмент SEQ ID NO: 3174.

31. Способ оценки восстановления фертильности у растения пшеницы, причем указанный способ включает определение наличия или отсутствия фрагмента SEQ ID NO: 3174 в геноме указанного растения, причем наличие всего фрагмента свидетельствует о слабом восстановлении фертильности, и делеция, по меньшей мере, части такого фрагмента или всего фрагмента SEQ ID NO: 3174 свидетельствует о сильном

восстановлении фертильности.

32. Зонд нуклеиновой кислоты для применения в способе по любому из воплощений 17-21, отличающийся тем, что он состоит из нуклеиновой кислоты, по меньшей мере, из 10 нуклеотидов в пределах SEQ ID NO: 3174.

33. Растение пшеницы, восстанавливающее фертильность цитоплазмы CMS T. timopheevii, где растение содержит, по меньшей мере, три аллеля, восстанавливающих фертильность, в локусах восстановления, выбранных из числа Rf1, Rf3, Rf4 и Rf7, где:

a. locus Rf1 находится на расстоянии по большей мере 10 cM от маркера cfn0522096 SEQ ID NO: 3190 или маркера cfn05277067 SEQ ID NO: 3196,

b. locus Rf3 находится на расстоянии по большей мере 10 cM от маркера cfn1249269 SEQ ID NO: 3205 или маркера BS00090770 SEQ ID NO: 3228,

c. locus Rf7 находится на расстоянии по большей мере 10 cM от маркера cfn0919993 SEQ ID NO: 3231, и

d. locus Rf4 находится на расстоянии по большей мере 10 cM от маркера cfn0393953 SEQ ID NO: 3233.

34. Растение пшеницы по воплощению 23, отличающееся тем, что растение содержит аллели-восстановители Rf1, Rf3 и Rf7.

35. Растение пшеницы по любому из воплощений 23-24, отличающееся тем, что оно включает, по меньшей мере, один аллель-восстановитель Rf1 в локусе Rf1, причем указанный аллель-восстановитель Rf1 находится в хромосомном интервале между маркерами SNP cfn0522096 SEQ ID NO: 3190 и cfn05277067 SEQ ID NO: 3196.

36. Растение пшеницы по воплощению 25, отличающееся тем, что указанный locus Rf1 характеризуется наличием одного или более из следующих аллелей SNP:

SNP#	Название маркера	SEQ ID NO: маркера	Аллель-восстановитель
SNP1	cfn523072	3187	T
SNP2	cfn0523109	3188	A
SNP3	276I13_96B22_97797	3189	C
SNP4	cfn0522096	3190	C
SNP5	cfn0527763	3191	C
SNP6	104A4_105172	3192	TG
SNP7	104A4_105588	3193	A
SNP8	cfn0373248	3194	T
SNP9	cfn1097828	3195	C
SNP10	cfn0527067	3196	A
SNP11	cfn0528390	3197	G
SNP12	BWS0267	3198	A
SNP13	cfn0527718	3199	T
SNP14	cfn0524469	3200	G
SNP15	cfn0524921	3201	G

SNP16	cfn122326	3202	C
-------	-----------	------	---

37. Растение пшеницы по воплощению 26, отличающееся тем, что локус Rf1 характеризуется гаплотипом «С» и «А» аллелей-восстановителей SNP3 и SNP7, как описано в Таблице воплощения 5.

38. Растение пшеницы по любому из воплощений 23-27, отличающееся тем, что оно включает, по меньшей мере, один аллель-восстановитель Rf3 в локусе Rf3, причем указанный аллель-восстановитель Rf3 расположен в хромосомном фрагменте между маркерами SNP cfn1249269 и BS00090770.

39. Растение пшеницы по воплощению 28, отличающееся тем, что указанный локус Rf3 характеризуется наличием одного или более из следующих аллелей SNP:

SNP#	Название маркера	SEQ ID NO: маркера	Аллель-восстановитель
SNP17	cfn1252000	3203	A
SNP18	IWB14060*	3204	G
SNP19	cfn1249269	3205	G
SNP20	219K1_166464	3206	T
SNP21	219K1_158251	3207	G
SNP22	219K1_111446	3208	A
SNP23	219K1_110042	3209	T
SNP24	219K1_110005	3210	C
SNP25	219K1_107461	3211	A
SNP26	219K1_99688	3212	T
SNP27	219K1_37	3213	C
SNP28	cfn1270524	3214	T
SNP29	136H5_3M5_7601	3215	T
SNP30	cfn1288811	3216	G
SNP31	136H5_3M5_89176	3217	A
SNP32	136H5_3M5_89263	3218	T
SNP33	136H5_3M5_138211	3219	T
SNP34	cfn0556874	3220	C
SNP35	136H5_3M5_64154	3221	C
SNP36	136H5_3M5_68807	3222	G
SNP37	136H5_3M5_77916	3223	A
SNP38	cfn1246088	3224	A
SNP39	cfn1287194	3225	G
SNP40	cfn1258380	3226	A
SNP41	IWB72107*	3227	A
SNP42	BS00090770	3228	T
SNP43	cfn1239345	3229	A

40. Растение пшеницы по воплощению 29, отличающееся тем, что локус Rf3 характеризуется гаплотипом «Т» и «А» аллелей-восстановителей SNP29 и SNP31, как описано в таблице Воплощения 7.

41. Растение пшеницы по любому из воплощений 23-30, отличающееся тем, что локус Rf7 характеризуется наличием одного или более из следующих аллелей-

восстановителей SNP:

SNP#	Название маркера	SEQ ID NO: маркера	Аллель-восстановитель
SNP44	cfn0917304	3230	T
SNP45	cfn0919993	3231	G
SNP46	cfn0920459	3232	C
SNP49	cfn0915987	3445	G
SNP50	cfn0920253	3446	A
SNP51	cfn0448874	3447	T
SNP52	cfn0923814	3448	C
SNP53	cfn0924180	3449	G

SNP54	cfn0919484	3450	G
-------	------------	------	---

42. Растение пшеницы по любому из воплощений 23-31, отличающееся тем, что локус Rf4 характеризуется присутствием одного или более из следующих аллелей SNP, предпочтительно гаплотипа «С» и «G» аллелей-восстановителей SNP47 и SNP48:

SNP#	Название маркера	SEQ ID NO: маркера	Аллель-восстановитель
SNP47	cfn0393953	3233	C
SNP48	cfn0856945	3234	G

43. Растение пшеницы по любому из воплощений 23-32, отличающееся тем, что репрезентативные аллели аллелей-восстановителей Rf1, Rf3, Rf4 и Rf7 представлены образцами семян, выбранным среди: NCIMB 42811, NCIMB 42812, NCIMB 42813, NCIMB 42814, NCIMB 42815, NCIMB 42816 и NCIMB 42817.

44. Растение пшеницы по любому из воплощений 23-33, отличающееся тем, что указанное растение пшеницы является аллоплазматическим и содержит цитоплазму *T. timopheevii*.

45. Способ идентификации растения пшеницы по любому из воплощений 23-34, отличающийся тем, что указанное растение пшеницы идентифицируют путем детекции присутствия, по меньшей мере, одного аллеля-восстановителя, генетически связанного с локусами-восстановителями, выбранными из локусов Rf1, Rf3, Rf4 и Rf7.

46. Средства для детекции одного или более SNP с SEQ ID NO: 3187-3235.

47. Средство по воплощению 36, состоящее из одного или более праймеров, включая любой из следующих: SEQ ID NO: 3253-3444.

48. Способ производства гибридного растения пшеницы, включающий стадии:

a. скрещивания стерильного женского растения пшеницы, содержащего цитоплазму *T. timopheevii*, с фертильным мужским растением пшеницы в соответствии с любым из воплощений 23-34;

b. сбора гибридных семян;

c. необязательно детекции присутствия цитоплазмы *T. timopheevii* и/или, по

меньшей мере, трех локусов Rf, выбранных из числа Rf1, Rf3, Rf4 и Rf7 в гибридном семени; и

d. необязательно детекции уровня гибридности гибридного семени.

Подписи к чертежам

Фигуры 1А и 1В представляют собой таблицу, демонстрирующую сводку геномов растений, использованных в исследовании, и количество идентифицированных RFL. В целом, анализ включал 16 наборов данных генома из Triticeae и 13 из Oryzeae, соответственно, а также отдельные наборы данных из Brachypodium distachyon, тефа (*Eragrostis tef*), ржи (*Secale cereale*), проса лисохвоста (*Setaria italica*), сорго (*Sorghum bicolor*) и кукурузы (*Zea mays*). Также использовались наборы данных транскриптома *Lolium perenne* и *Triticum turgidum*.

Фигура 2: Процессинг *orf256* в митохондриях пшеницы с T-CMS (А) Структура *orf256*, выявленная в митохондриальном геноме *T. timopheevii*. Указан сайт связывания зонда WOLF256 (Song and Hedgoth 1994), используемого в анализе Нозерн-блоттинга. (В) Процесс дифференцировки *orf256* в линиях пшеницы с различными способностями восстановления. В линиях *T. aestivum*, *Primepii*, *Anapurna* и *Wheat-Rye-6R (WR\_6R)* транскрипт *orf256* не детектировался. Дополнительная третья полоса, обнаруженная в образцах R197 и R0934F, отмечена звездочками. В качестве контроля для загрузки геля показана картина агарозного геля, окрашенного бромистым этидием (EtBr).

Фигура 3: Фигура 3 демонстрирует список групп RFL, потенциально соответствующих гену Rf4.

Фигуры 4а и 4b: Фигуры 4А и 4В демонстрируют, соответственно, выравнивание между нуклеотидной и аминокислотной последовательностями RFL120-spelt (Субъект) с RFL120-timo (Запрос).

Фигура 5А: Фигура 5А демонстрирует выравнивание белковой последовательности RFL29a, RFL29b, RFL29c\_1 и RFL29c\_2.

Фигуры 5В и 5С: Фигуры 5В и 5С, соответственно, демонстрируют выравнивания белковых последовательностей RFL164a и RFL164b и RFL166a и RFL166b.

Фигура 6: Фигура 6 демонстрирует выравнивание 5'UTR-областей, идентифицированных в генах RFL29a и RFL29b.

Фигура 7: Фигура 7 демонстрирует положение различных последовательностей-мишеней вокруг и внутри области 163 п.н., идентифицированной для разных эндонуклеаз.

Фигура 8: Фигура 8 демонстрирует относительное положение интервалов картирования Rf1, определенных на нашей внутренней генетической карте консенсусов.

Фигура 9: Фигура 9 демонстрирует относительное положение интервалов

картирования Rf3, определенных на нашей внутренней генетической карте консенсусов.

Фигура 10: Фигура 10А демонстрирует положение маркеров в хромосомном интервале локуса Rf1. Слева и справа обозначены положения маркеров относительно интервала, определенного маркерами SNP cfn0522096 и cfn0527067. Интервал относится к маркерам, расположенным в интервале картирования. Физические положения соответствуют внутреннему упорядочению LG каркасов сборки полного генома IWGSC, «IWGSC WGA».

Фигуры 10B, 10C, 10D демонстрируют подмножество панели разнообразия, на которой показаны гаплотипы в локусе Rf1 для линий-восстановителей, используемых в генетическом картировании (R197, R204, R0932E), производных линий LGWR16-0016 и LGWR16-0026 и коллекции линий-закрепителей. «-»: соответствуют доминантным маркерам без усиления в нескольких линиях-закрепителях. «Н»: означает гетерозиготный статус, при котором детектировали два аллеля.

Фигура 11: Фигура 11А демонстрирует положение маркеров в хромосомном интервале локуса Rf3. Левый и правый относятся к положениям маркера относительно интервала, определенного маркерами cfn1249269 и BS00090770. Интервал относится к маркерам, расположенным в интервале картирования. Физические положения соответствуют внутреннему упорядочению LG каркасов сборки полного генома IWGSC, «IWGSC WGA». \* IWB14060 и IWB72107 описаны в Geyer and al, 2016.

Фигуры 11B, 11C, 11D демонстрируют подмножество панели разнообразия, показывающее гаплотипы в локусе Rf3 для линий-восстановителей LGWR16-0016 и LGWR16-0026, линии TJB155, используемой в качестве родительской линии-восстановителя в картировании RT3 QTL, и серии линий-закрепителей.

«-» соответствует доминантным маркерам без усиления в нескольких линиях-закрепителях. «Н» означает гетерозиготный статус, при котором детектируются два аллеля.

Фигура 12: Фигура 12 демонстрирует выравнивание нуклеотидных последовательностей между последовательностями фрагментов RFL29a и RFL29c. Мотив РАМ и последовательность-мишень для редактирования CRISPR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

#### ПРИМЕРЫ

Пример 1: идентификация 1188 последовательностей RFL-PPR в злаках:

32 набора геномных и два транскриптомных данных от 27 видов растений злаков и их диких сородичей загружали из открытых депозитариев последовательностей и проанализированы. Полный список файлов и баз данных, из которых они были

загружены, представлен на Фигуре 1.

Последовательности ДНК подвергали скринингу на наличие открытых рамок считываемые фрагменты (ORF) в шестирамочных трансляциях с помощью программы *getorf* из пакета EMBOSS 6.6.0 (Rice et al., 2000). Предсказанные ORF длиной более 92 кодонов проверяли на наличие мотивов пентатрикопептидного повтора (PPR) класса P- и PLS с использованием *hmmsearch* из пакета HMMER 3.1b ([hmmerrg.org](http://hmmerrg.org)) и скрытых моделей Маркова, определенных *hmmbuild* (Cheng et al., 2016). Последующая обработка результатов *hmmsearch* проводилась в соответствии с правилами, описанными ранее (Cheng et al., 2016). Последовательности, содержащие 10 или более PPR-мотивов P-класса, сохраняли для дальнейшего анализа, так как предыдущее исследование показало, что гены, подобные восстановителям фертильности (RFL), в основном состоят из тандемных массивов из 15-20 PPR-мотивов (Fujii et al., 2011).

Для идентификации последовательностей RFL среди PPR P-класса алгоритм OrthoMCL (Li et al., 2003) использовался через веб-сайт OrthoMCL-DB для кластеризации белков PPR P-класса из каждого набора данных (<http://www.orthomcl.org/orthomcl/>). Полученные выходные файлы проверяли на группы, содержащие эталонные RFL (Fujii et al., 2011).

В общей сложности идентифицировали 633 RFL в 34 наборах данных по зерновым с помощью анализа OrthoMCL (см. Таблицу на Фигурах 1A и 1B). Кроме того, были проанализированы наборы данных WGS по 44 образцам сорго, включая местные сорта и диких сородичей (Mace et al., 2013), и было идентифицировано 517 дополнительных последовательностей RFL, которые были включены в исследование (см. Таблицу на Фигурах 1A и B).

Пример 2: идентификация полноразмерных генов RFL PPR, потенциально участвующих в восстановлении фертильности CMS T. *timopheevii* у пшеницы путем направленного захвата генов RFL.

#### А. Подбор образцов зародышевой плазмы:

Шесть образцов пшеницы идентифицировали как потенциальные линии-восстановители CMS типа *Timopheevii* (T-CMS), полученные из межвидового скрещивания между *Triticum timopheevi* и *Triticum aestivum*.

Первым образцом является добавочная линия пшеница-рожь «Wheat-Rye-6R», где ген *Rf* был картирован на дополнительном длинном плече 6R-хромосомы ржи *Secale cereale* (Curtis and Lukaszewski, 1993). Четыре других образца пшеницы характеризуются наличием, по меньшей мере, одного из картированных генов-восстановителей в пшенице: *Rf1*, *Rf3* и *Rf7*. Коммерческий сорт *Primepii* несет ген *Rf3*, а три линии *Limagrain R197*,

R0934F и R0932E, соответственно, несут оба гена Rf1 и Rf7, Rf3 или Rf1.

Шестой образец, названный Anapurna, является линией-закрепителем, не способной восстановить T-CMS, и не несет никаких известных генов Rf. Anapurna считается отрицательным контролем в этом эксперименте. Кроме того, линия *T. timopheevii* была включена в исследование, поскольку она является фертильной линией, которая, как ожидается, будет содержать более одного гена Rf, способного восстанавливать CMS T-типа (Wilson and Ross, 1962). В некоторой степени эта линия считается положительным контролем в этом эксперименте.

Все шесть образцов проверяли на предмет их статуса восстановителя с помощью генетического анализа.

Анализ Нозерн-блоттинга проводили с использованием образцов восстановителей и стерильных образцов с использованием специфичного для *orf256* зонда (Фигура 2A). *Orf256* ранее был идентифицирован как ген, специфичный для митохондриального генома *T. timopheevii* (Rathburn and Hedgcoth, 1991; Song and Hedgcoth, 1994). Последовательность от -228 до +33 *orf256* (нумерация относительно стартового кодона) идентична гомологичной области гена *coxI* (кодирующей субъединицу 1 митохондриального комплекса IV) в *T. aestivum*, тогда как остальная часть *orf256*, включая 3'-фланкирующую область, не связана с *coxI* (Фигура 2A). Наблюдаются различные закономерности процессинга транскриптов *orf256* в фертильной линии *T. timopheevii* и в фертильных линиях-восстановителях, несущих цитоплазму *T. timopheevii*, по сравнению со схемой стерильной линии CMS, которая согласуется с генетическим анализом (Фигура 2B). Различные профили процессинга соответствуют (но не являются убедительным доказательством того), что *orf256* участвует в создании CMS.

В. Дизайн приманки и RFL-захват от разных генотипов пшеницы:

1188 последовательностей RFL PPR, идентифицированных нашим биоинформатическим анализом, прошли процесс предварительной обработки, который включал маскировку последовательностей-мишеней против последовательностей митохондриального и генома пшеницы и генома хлоропластов (образцы NC\_007579.1 и AB042240), а также повторяющихся элементов генома пшеницы. Маскированные последовательности-мишени использовали для разработки зонда захвата. Вкратце, были разработаны зонды для покрытия последовательностей-мишеней с использованием алгоритма маскирования частоты, предназначенным для исключения зондов, которые соответствуют последовательностям с большим числом копий в целевом геноме (геномах). Конечные зонды синтезировали в виде пула зондов.

Семена каждого образца высевали, а ростки выращивали в этиолированных

условиях. После выделения ДНК, библиотеки Illumina (называемые библиотеками NGS) готовили из фрагментов ДНК размером около 600 п.н. с использованием химических соединений KAPA Biosystems в соответствии с рекомендациями производителя.

Затем библиотеки NGS специально обогащали последовательностями RFL с использованием пула зондов и протокола захвата. Эффективность захвата подтверждали специфическим анализом кПЦР, и в конечном итоге библиотеки объединяли и секвенировали в режиме спаренных концов с длиной чтения 300 н.т. на платформе MiSeq.

С. Сборка полноразмерных последовательностей генов, кодирующих белки RFL и идентификация предполагаемых ортологичных групп:

Считываемые фрагменты последовательностей из эксперимента по захвату RFL собирали в полноразмерные контиги, охватывающие одну или более последовательностей, кодирующих белки RFL, как описано ниже. Перекрывающиеся парные считываемые фрагменты объединяли в одну последовательность с использованием `bbmerge` из пакета `bbmap` (<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>) с параметрами `qtrim2 = t trimq = 10,15,20 minq = 12 mininsert = 150`. Прочитанные пары, которые не удалось объединить, отбрасывали. Совмещенные считываемые фрагменты сокращали до 300000 считываний с использованием файла `reformat.sh` в пакете `bbmap` (`samplereadtarget = 300000`). Совмещенные и сокращенные данные собирали с помощью `Geneious 8` (установлен на `Medium Sensitivity/Fast`) (<http://www.geneious.com/>). Наконец, контиги, состоящие из более чем 100 совмещенных считываемых фрагментов, сохраняли для дальнейшего анализа, причем большинство из них составило более 1000 считываемых фрагментов. Таким образом, всего получили 1457 контигов (Таблица 6).

От каждого образца получили приблизительно 220 контигов, за исключением *Triticum timopheevii*, для которого собрали только 138 контигов. Это согласуется с тетраплоидной природой генома *Triticum timopheevii*. Согласованность результатов указывает на то, что эксперимент по захвату RFL был априори всесторонним.

Название образца	Количество собранных контигов, состоящих из > 100 считанных фрагментов	Количество идентифицированных RFL ORF >210 ак*	Количество ортологичных групп, по меньшей мере, с одним RFL из образца	Количество RFL ORF > 350 ак, присвоенных ортологичным группам
Anapurna	211	221	202	156
Primepii	226	234	215	162
R197	219	241	219	174
R0932E	221	245	221	183
R0934F	223	237	215	174
Triticum	138	143	129	114

timopheevi				
Wheat-Rye-6R	219	233	212	163
Всего	1457	1554	397 (неизбыточные)	1254

Таблица 6: Количество контигов RFF и ORF, идентифицированных для каждого образца, и количество ортологичных групп, ORF которым были присвоены CD-hit.

Последовательности, кодирующие белки RFL, идентифицировали в этих контигах следующим образом.

Открытые рамки считываемые фрагменты (ORF) внутри контигов идентифицировали с помощью *getorf* из пакета EMBOSS (Rice et al. 2000) с использованием параметров `-minsize 630 -find 0 -reverse true`. Таким образом, для дальнейшего анализа использовали только ORF длиной более чем 210 аминокислот. Всего на семи образцах выявили 1554 ORF (Таблица 6). Количество ORF на один образец варьировалось от 143 ORF у *T. timopheevii* до 245 в R0934F (Таблица 6). ORF дополнительно проанализировали с использованием *hmmsearch* (с параметрами `-E 0.1 --domE 100`) из пакета HMMER (v3.1b1) для обнаружения PPR-мотивов с использованием скрытых моделей Маркова, разработанных Cheng et al. (2016), и стадий последующего процессирования, описанных в той же статье. Наконец, чтобы идентифицировать предположительно ортологичные последовательности RFL во всех семи образцах, ORF 1554 RFL сгруппировали с использованием CD-hit (установки `-c 0,96 -n 5 -G 0 -d 0 -AS 60 -A 105 -g 1`). Во всех образцах получили 397 избыточных RFL-кластеров, представляющих предположительно ортологичные группы (Таблица 6). Мы определяем ортологичную группу RFL как набор, по меньшей мере, из одной ORF RFL, по меньшей мере, из одного образца, и при этом, если присутствуют, по меньшей мере, две последовательности, эти последовательности имеют, по меньшей мере, 96% идентичности последовательностей по всей длине выравнивания. Некоторые высококонсервативные гены RFL присутствуют во всех семи образцах, другие встречаются только в подмножестве образцов или в одном образце. В большинстве случаев каждая ортологичная группа RFL содержит только один белок RFL из каждого образца.

Таблица 7 ниже показывает различные группы RFL, соответствующие названия ORF и соответствующий номер последовательности белка и номер ДНК, кодирующей белок.

Тем не менее, мы обнаружили, что гены, кодирующие белки RFL-PPR, часто инактивируются вставками-делециями, создавая сдвиги рамок, которые нарушают непрерывность ORF, что приводит к двум более коротким ORF, соответствующим одной более длинной ORF в другом образце. В этих случаях обе более короткие ORF могут быть

в пределах одной ортологичной группы. В нашем анализе только ORF, кодирующая более 350 аминокислот, рассматривалась как возможно функциональная. Этот порог был использован, поскольку он соответствует 10 мотивам PPR (каждый по 35 аминокислот), и все известные активные белки Rf содержат, по меньшей мере, это количество мотивов (обычно 15-20).

Наконец, набор из 397 ортологичных групп RFL был идентифицирован и пронумерован от 1 до 397 (см. Таблицу 7 ниже).

RFL-название	Название	SEQID-PRT1	SEQID-ДНК
RFL 1	R0932E.300k_Assembly_Contig_60_2	1	1555
RFL 1	R197.300k_Assembly_Contig_73_2	2	1556
RFL 2	R0934F.300k_Assembly_Contig_11_2	3	1557
RFL 2	Anapurna.300k_Assembly_Contig_47_1	4	1558
RFL 2	Primepii.300k_Assembly_Contig_16_2	5	1559
RFL 2	R0932E.300k_Assembly_Contig_39_1	6	1560
RFL 2	R197.300k_Assembly_Contig_31_1	7	1561
RFL 2	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_13_1	8	1562
RFL 3	R0934F.300k_Assembly_Contig_34_2	9	1563
RFL 3	R0932E.300k_Assembly_Contig_41_1	10	1564
RFL 3	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_44_1	11	1565
RFL 3	Primepii.300k_Assembly_Contig_27_2	12	1566
RFL 3	R197.300k_Assembly_Contig_34_1	13	1567
RFL 3	Anapurna.300k_Assembly_Contig_21_1	14	1568
RFL 4	R197.300k_Assembly_Contig_38_2	15	1569
RFL 4	Anapurna.300k_Assembly_Contig_48_2	16	1570
RFL 4	Primepii.300k_Assembly_Contig_39_2	17	1571
RFL 4	R0932E.300k_Assembly_Contig_47_1	18	1572
RFL 4	R0934F.300k_Assembly_Contig_44_1	19	1573
RFL 4	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_32_2	20	1574
RFL 4	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_19_2	21	1575
RFL 5	Primepii.300k_Assembly_Contig_9_3	22	1576
RFL 5	R0934F.300k_Assembly_Contig_7_3	23	1577
RFL 5	Anapurna.300k_Assembly_Contig_15_3	24	1578
RFL 5	R197.300k_Assembly_Contig_12_3	25	1579
RFL 5	R0932E.300k_Assembly_Contig_11_2	26	1580
RFL 5	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_9_2	27	1581
RFL 5	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_9_2	28	1582
RFL 6	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_99_1	29	1583
RFL 6	Primepii.300k_Assembly_Contig_109_1	30	1584
RFL 6	Anapurna.300k_Assembly_Contig_99_2	31	1585
RFL 6	Anapurna.300k_Assembly_Contig_99_1	32	1586
RFL 7	Anapurna.300k_Assembly_Contig_82_1	33	1587
RFL 7	Primepii.300k_Assembly_Contig_25_1	34	1588
RFL 7	R0934F.300k_Assembly_Contig_86_1	35	1589
RFL 7	R197.300k_Assembly_Contig_11_1	36	1590
RFL 7	R0932E.300k_Assembly_Contig_61_1	37	1591
RFL 7	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_34_1	38	1592

RFL 8	R0932E.300k_Assembly_Contig_85_1	39	1593
RFL 8	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_79_2	40	1594
RFL 8	R0934F.300k_Assembly_Contig_87_2	41	1595
RFL 8	Primepii.300k_Assembly_Contig_64_1	42	1596
RFL 8	R197.300k_Assembly_Contig_71_2	43	1597
RFL 8	Anapurna.300k_Assembly_Contig_54_2	44	1598
RFL 9	R0932E.300k_Assembly_Contig_66_1	45	1599
RFL 9	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_69_1	46	1600
RFL 9	Primepii.300k_Assembly_Contig_59_1	47	1601
RFL 9	R197.300k_Assembly_Contig_51_1	48	1602
RFL 9	R0934F.300k_Assembly_Contig_89_1	49	1603
RFL 9	Anapurna.300k_Assembly_Contig_66_1	50	1604
RFL 10	Primepii.300k_Assembly_Contig_62_2	51	1605
RFL 10	Anapurna.300k_Assembly_Contig_179_1	52	1606
RFL 10	Anapurna.300k_Assembly_Contig_70_1	53	1607
RFL 10	R0932E.300k_Assembly_Contig_34_2	54	1608
RFL 10	Primepii.300k_Assembly_Contig_191_1	55	1609
RFL 10	R197.300k_Assembly_Contig_189_1	56	1610
RFL 10	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_13_1	57	1611
RFL 10	R197.300k_Assembly_Contig_64_1	58	1612
RFL 10	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_62_2	59	1613
RFL 10	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_190_1	60	1614
RFL 10	R0934F.300k_Assembly_Contig_29_1	61	1615
RFL 11	Anapurna.300k_Assembly_Contig_14_2	62	1616
RFL 11	R0934F.300k_Assembly_Contig_14_2	63	1617
RFL 11	R0934F.300k_Assembly_Contig_14_1	64	1618
RFL 11	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_22_1	65	1619
RFL 11	Primepii.300k_Assembly_Contig_38_2	66	1620
RFL 11	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_22_2	67	1621
RFL 11	R197.300k_Assembly_Contig_33_1	68	1622
RFL 11	R0932E.300k_Assembly_Contig_27_2	69	1623
RFL 11	R197.300k_Assembly_Contig_33_2	70	1624
RFL 11	R0932E.300k_Assembly_Contig_27_1	71	1625
RFL 11	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_12_2	72	1626
RFL 12	R197.300k_Assembly_Contig_119_1	73	1627
RFL 12	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_115_1	74	1628
RFL 12	R0932E.300k_Assembly_Contig_120_2	75	1629
RFL 13	Anapurna.300k_Assembly_Contig_8_3	76	1630
RFL 13	Primepii.300k_Assembly_Contig_8_2	77	1631
RFL 13	R0932E.300k_Assembly_Contig_8_2	78	1632
RFL 13	R197.300k_Assembly_Contig_25_2	79	1633
RFL 13	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_21_2	80	1634
RFL 13	R0934F.300k_Assembly_Contig_18_2	81	1635
RFL 14	R0932E.300k_Assembly_Contig_24_1	82	1636
RFL 14	R0934F.300k_Assembly_Contig_10_1	83	1637
RFL 14	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_26_1	84	1638
RFL 14	R197.300k_Assembly_Contig_23_1	85	1639

RFL 14	Primepii.300k_Assembly_Contig_11_1	86	1640
RFL 14	Anapurna.300k_Assembly_Contig_13_1	87	1641
RFL 15	R197.300k_Assembly_Contig_29_1	88	1642
RFL 15	Anapurna.300k_Assembly_Contig_28_1	89	1643
RFL 15	R0934F.300k_Assembly_Contig_20_1	90	1644
RFL 15	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_11_2	91	1645
RFL 15	R0932E.300k_Assembly_Contig_38_1	92	1646
RFL 15	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_6_1	93	1647
RFL 15	Primepii.300k_Assembly_Contig_22_1	94	1648
RFL 16	Primepii.300k_Assembly_Contig_23_2	95	1649
RFL 16	R197.300k_Assembly_Contig_43_2	96	1650
RFL 16	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_11_2	97	1651
RFL 16	Anapurna.300k_Assembly_Contig_10_2	98	1652
RFL 16	R0932E.300k_Assembly_Contig_18_2	99	1653
RFL 16	R0934F.300k_Assembly_Contig_15_2	100	1654
RFL 17	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_7_1	101	1655
RFL 17	R197.300k_Assembly_Contig_58_1	102	1656
RFL 17	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_59_1	103	1657
RFL 17	R0934F.300k_Assembly_Contig_51_1	104	1658
RFL 17	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_29_2	105	1659
RFL 18	R0934F.300k_Assembly_Contig_25_2	106	1660
RFL 18	R0932E.300k_Assembly_Contig_21_2	107	1661
RFL 18	R197.300k_Assembly_Contig_14_2	108	1662
RFL 18	Anapurna.300k_Assembly_Contig_6_2	109	1663
RFL 18	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_16_3	110	1664
RFL 18	Primepii.300k_Assembly_Contig_20_2	111	1665
RFL 18	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_8_2	112	1666
RFL 19	Anapurna.300k_Assembly_Contig_68_1	113	1667
RFL 20	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_47_1	114	1668
RFL 21	R197.300k_Assembly_Contig_18_1	115	1669
RFL 21	Anapurna.300k_Assembly_Contig_16_1	116	1670
RFL 21	R0932E.300k_Assembly_Contig_58_1	117	1671
RFL 21	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_23_3	118	1672
RFL 21	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_23_2	119	1673
RFL 21	Primepii.300k_Assembly_Contig_42_2	120	1674
RFL 21	R0934F.300k_Assembly_Contig_28_3	121	1675
RFL 21	Primepii.300k_Assembly_Contig_42_3	122	1676
RFL 21	R0934F.300k_Assembly_Contig_28_2	123	1677
RFL 22	Primepii.300k_Assembly_Contig_63_1	124	1678
RFL 22	R0934F.300k_Assembly_Contig_61_1	125	1679
RFL 23	R0934F.300k_Assembly_Contig_46_2	126	1680
RFL 23	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_30_1	127	1681
RFL 23	R197.300k_Assembly_Contig_15_3	128	1682
RFL 23	R0932E.300k_Assembly_Contig_40_1	129	1683
RFL 23	R0934F.300k_Assembly_Contig_46_1	130	1684
RFL 23	R197.300k_Assembly_Contig_15_2	131	1685

RFL 23	Anapurna.300k_Assembly_Contig_42_1	132	1686
RFL 23	Primepii.300k_Assembly_Contig_14_2	133	1687
RFL 24	Anapurna.300k_Assembly_Contig_17_1	134	1688
RFL 24	R0934F.300k_Assembly_Contig_22_1	135	1689
RFL 24	R0932E.300k_Assembly_Contig_44_1	136	1690
RFL 24	Primepii.300k_Assembly_Contig_46_1	137	1691
RFL 24	R197.300k_Assembly_Contig_30_1	138	1692
RFL 24	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_40_1	139	1693
RFL 25	R197.300k_Assembly_Contig_92_2	140	1694
RFL 25	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_109_2	141	1695
RFL 26	Anapurna.300k_Assembly_Contig_38_1	142	1696
RFL 26	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_41_1	143	1697
RFL 27	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_63_3	144	1698
RFL 28	R0932E.300k_Assembly_Contig_23_2	145	1699
RFL 28	R0932E.300k_Assembly_Contig_23_3	146	1700
RFL 28	Primepii.300k_Assembly_Contig_13_1	147	1701
RFL 28	R197.300k_Assembly_Contig_10_3	148	1702
RFL 28	R197.300k_Assembly_Contig_10_2	149	1703
RFL 28	R0934F.300k_Assembly_Contig_17_1	150	1704
RFL 28	Anapurna.300k_Assembly_Contig_2_3	151	1705
RFL 28	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_7_3	152	1706
RFL 28	Anapurna.300k_Assembly_Contig_2_2	153	1707
RFL 28	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_7_2	154	1708
RFL 29	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_77_2	155	1709
RFL 29	R0934F.300k_Assembly_Contig_78_1	156	1710
RFL 29	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_77_1	157	1711
RFL 29	Primepii.300k_Assembly_Contig_67_1	158	1712
RFL 30	Primepii.300k_Assembly_Contig_91_1	159	1713
RFL 30	R0934F.300k_Assembly_Contig_64_1	160	1714
RFL 30	R0932E.300k_Assembly_Contig_110_1	161	1715
RFL 31	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_14_1	162	1716
RFL 32	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_6_2	163	1717
RFL 32	Primepii.300k_Assembly_Contig_6_2	164	1718
RFL 32	R0934F.300k_Assembly_Contig_31_2	165	1719
RFL 32	R197.300k_Assembly_Contig_7_2	166	1720
RFL 32	Anapurna.300k_Assembly_Contig_31_2	167	1721
RFL 32	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_5_2	168	1722
RFL 32	R0932E.300k_Assembly_Contig_29_2	169	1723
RFL 33	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_8_1	170	1724
RFL 33	Anapurna.300k_Assembly_Contig_5_2	171	1725
RFL 33	R197.300k_Assembly_Contig_6_3	172	1726
RFL 33	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_25_1	173	1727
RFL 33	R0932E.300k_Assembly_Contig_19_1	174	1728
RFL 33	Primepii.300k_Assembly_Contig_21_2	175	1729
RFL 33	R0934F.300k_Assembly_Contig_104_1	176	1730
RFL 34	R0932E.300k_Assembly_Contig_5_1	177	1731

RFL 34	R0932E.300k_Assembly_Contig_2_4	178	1732
RFL 35	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_21_2	179	1733
RFL 36	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_20_2	180	1734
RFL 37	Anapurna.300k_Assembly_Contig_37_2	181	1735
RFL 37	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_19_2	182	1736
RFL 37	R0932E.300k_Assembly_Contig_12_2	183	1737
RFL 37	R197.300k_Assembly_Contig_20_2	184	1738
RFL 37	R0934F.300k_Assembly_Contig_37_2	185	1739
RFL 37	Primepii.300k_Assembly_Contig_10_2	186	1740
RFL 38	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_43_2	187	1741
RFL 39	R0932E.300k_Assembly_Contig_53_2	188	1742
RFL 39	Anapurna.300k_Assembly_Contig_29_2	189	1743
RFL 39	R0932E.300k_Assembly_Contig_22_1	190	1744
RFL 39	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_28_2	191	1745
RFL 39	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_25_2	192	1746
RFL 39	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_15_1	193	1747
RFL 39	R0934F.300k_Assembly_Contig_27_1	194	1748
RFL 39	R0934F.300k_Assembly_Contig_26_2	195	1749
RFL 39	Primepii.300k_Assembly_Contig_40_2	196	1750
RFL 39	Primepii.300k_Assembly_Contig_30_1	197	1751
RFL 39	R197.300k_Assembly_Contig_36_2	198	1752
RFL 39	R197.300k_Assembly_Contig_27_1	199	1753
RFL 39	Anapurna.300k_Assembly_Contig_43_1	200	1754
RFL 40	R0934F.300k_Assembly_Contig_12_1	201	1755
RFL 40	Primepii.300k_Assembly_Contig_18_1	202	1756
RFL 40	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_5_1	203	1757
RFL 40	R0932E.300k_Assembly_Contig_7_1	204	1758
RFL 40	Anapurna.300k_Assembly_Contig_20_1	205	1759
RFL 40	R197.300k_Assembly_Contig_32_1	206	1760
RFL 41	R0934F.300k_Assembly_Contig_24_2	207	1761
RFL 41	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_45_2	208	1762
RFL 41	Anapurna.300k_Assembly_Contig_39_2	209	1763
RFL 41	R0932E.300k_Assembly_Contig_56_2	210	1764
RFL 41	Primepii.300k_Assembly_Contig_47_2	211	1765
RFL 41	R197.300k_Assembly_Contig_40_2	212	1766
RFL 42	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_10_3	213	1767
RFL 43	R0934F.300k_Assembly_Contig_8_1	214	1768
RFL 43	R0932E.300k_Assembly_Contig_13_1	215	1769
RFL 43	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_12_2	216	1770
RFL 43	R197.300k_Assembly_Contig_22_1	217	1771
RFL 43	Primepii.300k_Assembly_Contig_31_1	218	1772
RFL 43	Anapurna.300k_Assembly_Contig_23_1	219	1773
RFL 43	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_10_1	220	1774
RFL 44	R0932E.300k_Assembly_Contig_32_1	221	1775
RFL 44	Primepii.300k_Assembly_Contig_7_1	222	1776
RFL 44	Anapurna.300k_Assembly_Contig_33_1	223	1777

RFL 45	R0932E.300k_Assembly_Contig_73_2	224	1778
RFL 45	R197.300k_Assembly_Contig_70_2	225	1779
RFL 45	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_72_2	226	1780
RFL 46	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_35_1	227	1781
RFL 47	R0934F.300k_Assembly_Contig_57_2	228	1782
RFL 47	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_67_2	229	1783
RFL 47	Anapurna.300k_Assembly_Contig_85_2	230	1784
RFL 47	R0932E.300k_Assembly_Contig_71_2	231	1785
RFL 47	R197.300k_Assembly_Contig_62_2	232	1786
RFL 47	Primepii.300k_Assembly_Contig_86_3	233	1787
RFL 48	Primepii.300k_Assembly_Contig_51_1	234	1788
RFL 48	R197.300k_Assembly_Contig_57_1	235	1789
RFL 48	Anapurna.300k_Assembly_Contig_74_1	236	1790
RFL 48	R0934F.300k_Assembly_Contig_71_1	237	1791
RFL 48	R0932E.300k_Assembly_Contig_72_1	238	1792
RFL 48	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_82_1	239	1793
RFL 49	R197.300k_Assembly_Contig_83_1	240	1794
RFL 49	R197.300k_Assembly_Contig_95_2	241	1795
RFL 49	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_37_1	242	1796
RFL 49	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_38_1	243	1797
RFL 50	Anapurna.300k_Assembly_Contig_24_2	244	1798
RFL 50	Primepii.300k_Assembly_Contig_24_2	245	1799
RFL 50	R0932E.300k_Assembly_Contig_25_2	246	1800
RFL 50	R197.300k_Assembly_Contig_21_2	247	1801
RFL 50	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_22_2	248	1802
RFL 50	R0934F.300k_Assembly_Contig_39_2	249	1803
RFL 51	Anapurna.300k_Assembly_Contig_35_2	250	1804
RFL 51	R0934F.300k_Assembly_Contig_5_4	251	1805
RFL 51	Primepii.300k_Assembly_Contig_17_3	252	1806
RFL 51	Anapurna.300k_Assembly_Contig_109_1	253	1807
RFL 51	Primepii.300k_Assembly_Contig_19_2	254	1808
RFL 51	R0932E.300k_Assembly_Contig_55_1	255	1809
RFL 51	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_2_1	256	1810
RFL 51	R0934F.300k_Assembly_Contig_55_2	257	1811
RFL 51	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_4_2	258	1812
RFL 51	R197.300k_Assembly_Contig_46_2	259	1813
RFL 51	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_37_2	260	1814
RFL 51	Anapurna.300k_Assembly_Contig_106_1	261	1815
RFL 51	R197.300k_Assembly_Contig_5_3	262	1816
RFL 51	R0932E.300k_Assembly_Contig_6_2	263	1817
RFL 52	R197.300k_Assembly_Contig_37_1	264	1818
RFL 52	R197.300k_Assembly_Contig_37_2	265	1819
RFL 52	R0932E.300k_Assembly_Contig_45_1	266	1820
RFL 52	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_39_1	267	1821
RFL 52	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_39_2	268	1822
RFL 52	Primepii.300k_Assembly_Contig_49_1	269	1823

RFL 52	Anapurna.300k_Assembly_Contig_22_1	270	1824
RFL 52	R0934F.300k_Assembly_Contig_49_1	271	1825
RFL 52	R0934F.300k_Assembly_Contig_49_2	272	1826
RFL 52	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_29_1	273	1827
RFL 53	R0934F.300k_Assembly_Contig_75_2	274	1828
RFL 53	R0932E.300k_Assembly_Contig_64_2	275	1829
RFL 53	Anapurna.300k_Assembly_Contig_72_2	276	1830
RFL 53	Primepii.300k_Assembly_Contig_57_2	277	1831
RFL 53	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_55_3	278	1832
RFL 54	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_80_1	279	1833
RFL 54	R0932E.300k_Assembly_Contig_209_1	280	1834
RFL 54	Anapurna.300k_Assembly_Contig_77_1	281	1835
RFL 55	R0932E.300k_Assembly_Contig_54_1	282	1836
RFL 55	R197.300k_Assembly_Contig_39_1	283	1837
RFL 55	R0934F.300k_Assembly_Contig_54_1	284	1838
RFL 55	Anapurna.300k_Assembly_Contig_41_1	285	1839
RFL 55	Primepii.300k_Assembly_Contig_44_1	286	1840
RFL 55	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_31_1	287	1841
RFL 56	R197.300k_Assembly_Contig_86_1	288	1842
RFL 56	R0932E.300k_Assembly_Contig_74_1	289	1843
RFL 56	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_39_1	290	1844
RFL 58	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_66_1	291	1845
RFL 58	Anapurna.300k_Assembly_Contig_12_1	292	1846
RFL 59	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_60_1	293	1847
RFL 59	R197.300k_Assembly_Contig_115_1	294	1848
RFL 59	R0932E.300k_Assembly_Contig_161_1	295	1849
RFL 59	R0932E.300k_Assembly_Contig_48_1	296	1850
RFL 60	Primepii.300k_Assembly_Contig_94_1	297	1851
RFL 60	R197.300k_Assembly_Contig_95_1	298	1852
RFL 60	R0934F.300k_Assembly_Contig_73_2	299	1853
RFL 60	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_48_2	300	1854
RFL 61	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_48_1	301	1855
RFL 62	R0934F.300k_Assembly_Contig_138_1	302	1856
RFL 63	R197.300k_Assembly_Contig_84_1	303	1857
RFL 63	R197.300k_Assembly_Contig_84_2	304	1858
RFL 63	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_34_1	305	1859
RFL 64	Primepii.300k_Assembly_Contig_50_1	306	1860
RFL 64	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_54_1	307	1861
RFL 64	R0934F.300k_Assembly_Contig_45_1	308	1862
RFL 64	Anapurna.300k_Assembly_Contig_61_1	309	1863
RFL 64	R197.300k_Assembly_Contig_42_1	310	1864
RFL 64	R0932E.300k_Assembly_Contig_59_1	311	1865
RFL 65	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_42_2	312	1866
RFL 66	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_27_1	313	1867
RFL 66	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_80_1	314	1868
RFL 67	Primepii.300k_Assembly_Contig_213_1	315	1869
RFL 67	Primepii.300k_Assembly_Contig_80_2	316	1870

RFL 67	Primepii.300k_Assembly_Contig_80_1	317	1871
RFL 67	R0934F.300k_Assembly_Contig_111_2	318	1872
RFL 67	Primepii.300k_Assembly_Contig_2_1	319	1873
RFL 67	R0934F.300k_Assembly_Contig_111_1	320	1874
RFL 67	R0934F.300k_Assembly_Contig_4_1	321	1875
RFL 68	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_53_1	322	1876
RFL 68	R0932E.300k_Assembly_Contig_68_1	323	1877
RFL 68	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_53_3	324	1878
RFL 68	R197.300k_Assembly_Contig_19_1	325	1879
RFL 68	R0934F.300k_Assembly_Contig_66_1	326	1880
RFL 68	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_33_1	327	1881
RFL 68	Anapurna.300k_Assembly_Contig_71_1	328	1882
RFL 68	Anapurna.300k_Assembly_Contig_71_2	329	1883
RFL 68	Primepii.300k_Assembly_Contig_37_1	330	1884
RFL 68	R0932E.300k_Assembly_Contig_68_3	331	1885
RFL 68	R197.300k_Assembly_Contig_19_3	332	1886
RFL 69	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_45_1	333	1887
RFL 70	R0934F.300k_Assembly_Contig_68_1	334	1888
RFL 70	R197.300k_Assembly_Contig_65_1	335	1889
RFL 70	R0932E.300k_Assembly_Contig_94_1	336	1890
RFL 70	Primepii.300k_Assembly_Contig_55_1	337	1891
RFL 70	Anapurna.300k_Assembly_Contig_111_1	338	1892
RFL 70	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_74_1	339	1893
RFL 70	Anapurna.300k_Assembly_Contig_98_1	340	1894
RFL 71	R0932E.300k_Assembly_Contig_114_1	341	1895
RFL 72	R0932E.300k_Assembly_Contig_98_1	342	1896
RFL 73	R0932E.300k_Assembly_Contig_89_2	343	1897
RFL 73	R197.300k_Assembly_Contig_78_2	344	1898
RFL 73	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_31_2	345	1899
RFL 74	R197.300k_Assembly_Contig_194_1	346	1900
RFL 74	R0934F.300k_Assembly_Contig_36_2	347	1901
RFL 74	R0934F.300k_Assembly_Contig_150_2	348	1902
RFL 74	R0932E.300k_Assembly_Contig_185_1	349	1903
RFL 74	R0932E.300k_Assembly_Contig_201_1	350	1904
RFL 74	R0932E.300k_Assembly_Contig_92_1	351	1905
RFL 74	R197.300k_Assembly_Contig_179_1	352	1906
RFL 74	R0932E.300k_Assembly_Contig_83_1	353	1907
RFL 74	R197.300k_Assembly_Contig_4_1	354	1908
RFL 74	R0934F.300k_Assembly_Contig_126_1	355	1909
RFL 75	R0932E.300k_Assembly_Contig_88_1	356	1910
RFL 77	R0932E.300k_Assembly_Contig_214_2	357	1911
RFL 78	R0932E.300k_Assembly_Contig_112_1	358	1912
RFL 79	R0932E.300k_Assembly_Contig_103_1	359	1913
RFL 79	R0934F.300k_Assembly_Contig_80_1	360	1914
RFL 79	R197.300k_Assembly_Contig_120_1	361	1915
RFL 79	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_57_1	362	1916
RFL 80	R197.300k_Assembly_Contig_59_1	363	1917

RFL 81	R0932E.300k_Assembly_Contig_4_1	364	1918
RFL 81	R0932E.300k_Assembly_Contig_199_1	365	1919
RFL 82	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_64_2	366	1920
RFL 82	R0932E.300k_Assembly_Contig_123_2	367	1921
RFL 83	Primepii.300k_Assembly_Contig_52_1	368	1922
RFL 83	R0934F.300k_Assembly_Contig_43_1	369	1923
RFL 83	R0932E.300k_Assembly_Contig_46_1	370	1924
RFL 83	Anapurna.300k_Assembly_Contig_62_1	371	1925
RFL 83	R197.300k_Assembly_Contig_54_1	372	1926
RFL 83	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_60_1	373	1927
RFL 84	R0932E.300k_Assembly_Contig_116_1	374	1928
RFL 85	R197.300k_Assembly_Contig_80_3	375	1929
RFL 85	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_36_3	376	1930
RFL 85	R197.300k_Assembly_Contig_80_2	377	1931
RFL 87	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_73_1	378	1932
RFL 89	Primepii.300k_Assembly_Contig_83_1	379	1933
RFL 89	Primepii.300k_Assembly_Contig_183_1	380	1934
RFL 89	R0934F.300k_Assembly_Contig_99_1	381	1935
RFL 90	Primepii.300k_Assembly_Contig_82_2	382	1936
RFL 90	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_65_2	383	1937
RFL 90	R0934F.300k_Assembly_Contig_63_1	384	1938
RFL 90	R197.300k_Assembly_Contig_66_2	385	1939
RFL 90	Anapurna.300k_Assembly_Contig_51_1	386	1940
RFL 90	R0932E.300k_Assembly_Contig_90_1	387	1941
RFL 92	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_55_2	388	1942
RFL 92	R197.300k_Assembly_Contig_47_2	389	1943
RFL 92	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_30_2	390	1944
RFL 92	R0932E.300k_Assembly_Contig_43_2	391	1945
RFL 92	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_30_3	392	1946
RFL 92	Anapurna.300k_Assembly_Contig_50_2	393	1947
RFL 92	R0934F.300k_Assembly_Contig_48_2	394	1948
RFL 92	Primepii.300k_Assembly_Contig_53_2	395	1949
RFL 93	R197.300k_Assembly_Contig_117_1	396	1950
RFL 93	R0932E.300k_Assembly_Contig_113_1	397	1951
RFL 94	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_41_2	398	1952
RFL 94	Anapurna.300k_Assembly_Contig_38_2	399	1953
RFL 94	R197.300k_Assembly_Contig_24_1	400	1954
RFL 94	R0934F.300k_Assembly_Contig_32_1	401	1955
RFL 94	R0932E.300k_Assembly_Contig_17_1	402	1956
RFL 94	Primepii.300k_Assembly_Contig_41_2	403	1957
RFL 95	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_51_1	404	1958
RFL 96	Primepii.300k_Assembly_Contig_72_1	405	1959
RFL 97	Anapurna.300k_Assembly_Contig_92_2	406	1960
RFL 97	Anapurna.300k_Assembly_Contig_19_1	407	1961
RFL 97	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_103_2	408	1962
RFL 97	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_63_1	409	1963
RFL 98	R0932E.300k_Assembly_Contig_79_1	410	1964

RFL 98	Primepii.300k_Assembly_Contig_70_1	411	1965
RFL 98	R0934F.300k_Assembly_Contig_70_1	412	1966
RFL 98	R197.300k_Assembly_Contig_63_1	413	1967
RFL 98	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_71_1	414	1968
RFL 99	R0932E.300k_Assembly_Contig_15_2	415	1969
RFL 99	R0932E.300k_Assembly_Contig_153_2	416	1970
RFL 100	R197.300k_Assembly_Contig_94_1	417	1971
RFL 100	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_113_1	418	1972
RFL 100	R0932E.300k_Assembly_Contig_100_1	419	1973
RFL 100	Anapurna.300k_Assembly_Contig_113_1	420	1974
RFL 101	Anapurna.300k_Assembly_Contig_59_1	421	1975
RFL 101	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_54_1	422	1976
RFL 102	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_71_1	423	1977
RFL 103	Primepii.300k_Assembly_Contig_106_1	424	1978
RFL 103	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_98_1	425	1979
RFL 103	R197.300k_Assembly_Contig_79_1	426	1980
RFL 104	R0934F.300k_Assembly_Contig_69_1	427	1981
RFL 104	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_35_1	428	1982
RFL 104	R0932E.300k_Assembly_Contig_82_1	429	1983
RFL 104	R197.300k_Assembly_Contig_72_1	430	1984
RFL 105	Primepii.300k_Assembly_Contig_85_1	431	1985
RFL 106	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_87_2	432	1986
RFL 106	Primepii.300k_Assembly_Contig_81_2	433	1987
RFL 106	Anapurna.300k_Assembly_Contig_80_1	434	1988
RFL 106	R0932E.300k_Assembly_Contig_76_1	435	1989
RFL 106	R197.300k_Assembly_Contig_67_1	436	1990
RFL 106	R0934F.300k_Assembly_Contig_103_2	437	1991
RFL 107	R0934F.300k_Assembly_Contig_117_1	438	1992
RFL 107	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_69_1	439	1993
RFL 108	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_86_1	440	1994
RFL 108	R0932E.300k_Assembly_Contig_87_1	441	1995
RFL 108	R197.300k_Assembly_Contig_77_1	442	1996
RFL 108	Anapurna.300k_Assembly_Contig_78_1	443	1997
RFL 108	R0934F.300k_Assembly_Contig_115_1	444	1998
RFL 109	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_78_2	445	1999
RFL 110	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_15_2	446	2000
RFL 111	R0932E.300k_Assembly_Contig_78_1	447	2001
RFL 111	R0934F.300k_Assembly_Contig_23_1	448	2002
RFL 111	Anapurna.300k_Assembly_Contig_58_1	449	2003
RFL 111	R197.300k_Assembly_Contig_69_1	450	2004
RFL 111	Primepii.300k_Assembly_Contig_35_1	451	2005
RFL 111	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_83_1	452	2006
RFL 112	R0932E.300k_Assembly_Contig_20_1	453	2007
RFL 112	R197.300k_Assembly_Contig_17_1	454	2008
RFL 112	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_17_1	455	2009
RFL 112	Anapurna.300k_Assembly_Contig_4_1	456	2010
RFL 112	Primepii.300k_Assembly_Contig_12_1	457	2011

RFL 112	R0934F.300k_Assembly_Contig_6_1	458	2012
RFL 113	R0932E.300k_Assembly_Contig_216_1	459	2013
RFL 113	R0934F.300k_Assembly_Contig_202_1	460	2014
RFL 113	Primepii.300k_Assembly_Contig_92_1	461	2015
RFL 113	R197.300k_Assembly_Contig_98_1	462	2016
RFL 114	R0932E.300k_Assembly_Contig_86_1	463	2017
RFL 115	R0934F.300k_Assembly_Contig_128_1	464	2018
RFL 115	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_74_1	465	2019
RFL 116	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_44_2	466	2020
RFL 118	R197.300k_Assembly_Contig_75_1	467	2021
RFL 118	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_93_1	468	2022
RFL 118	Anapurna.300k_Assembly_Contig_87_1	469	2023
RFL 119	R197.300k_Assembly_Contig_1_1	470	2024
RFL 119	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_1_1	471	2025
RFL 119	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_194_1	472	2026
RFL 119	R0934F.300k_Assembly_Contig_2_1	473	2027
RFL 119	Primepii.300k_Assembly_Contig_1_1	474	2028
RFL 119	Anapurna.300k_Assembly_Contig_1_1	475	2029
RFL 119	R0932E.300k_Assembly_Contig_1_1	476	2030
RFL 120	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_67_1	477	2031
RFL 121	R197.300k_Assembly_Contig_96_1	478	2032
RFL 121	R0932E.300k_Assembly_Contig_93_1	479	2033
RFL 121	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_70_1	480	2034
RFL 121	R0934F.300k_Assembly_Contig_102_1	481	2035
RFL 121	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_95_1	482	2036
RFL 122	Primepii.300k_Assembly_Contig_90_1	483	2037
RFL 122	R197.300k_Assembly_Contig_68_1	484	2038
RFL 122	Anapurna.300k_Assembly_Contig_63_1	485	2039
RFL 122	R0932E.300k_Assembly_Contig_91_1	486	2040
RFL 122	R0934F.300k_Assembly_Contig_97_1	487	2041
RFL 122	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_59_1	488	2042
RFL 122	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_85_1	489	2043
RFL 123	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_65_1	490	2044
RFL 124	Primepii.300k_Assembly_Contig_96_1	491	2045
RFL 124	R197.300k_Assembly_Contig_116_1	492	2046
RFL 124	R0934F.300k_Assembly_Contig_110_1	493	2047
RFL 124	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_92_1	494	2048
RFL 124	Anapurna.300k_Assembly_Contig_84_1	495	2049
RFL 124	R0932E.300k_Assembly_Contig_107_1	496	2050
RFL 125	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_40_1	497	2051
RFL 125	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_41_3	498	2052
RFL 125	R197.300k_Assembly_Contig_3_1	499	2053
RFL 126	R0932E.300k_Assembly_Contig_35_1	500	2054
RFL 126	R197.300k_Assembly_Contig_9_3	501	2055
RFL 126	R0932E.300k_Assembly_Contig_35_2	502	2056
RFL 126	Anapurna.300k_Assembly_Contig_18_3	503	2057
RFL 126	Primepii.300k_Assembly_Contig_5_3	504	2058

RFL 126	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_29_1	505	2059
RFL 126	R0934F.300k_Assembly_Contig_19_3	506	2060
RFL 126	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_14_3	507	2061
RFL 126	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_24_1	508	2062
RFL 126	Primepii.300k_Assembly_Contig_43_1	509	2063
RFL 126	R0934F.300k_Assembly_Contig_30_2	510	2064
RFL 126	R0934F.300k_Assembly_Contig_30_1	511	2065
RFL 126	R197.300k_Assembly_Contig_16_1	512	2066
RFL 126	R0932E.300k_Assembly_Contig_16_3	513	2067
RFL 126	Anapurna.300k_Assembly_Contig_11_1	514	2068
RFL 127	Anapurna.300k_Assembly_Contig_73_1	515	2069
RFL 128	R197.300k_Assembly_Contig_113_2	516	2070
RFL 129	R0932E.300k_Assembly_Contig_104_1	517	2071
RFL 129	R0934F.300k_Assembly_Contig_91_1	518	2072
RFL 129	R197.300k_Assembly_Contig_101_1	519	2073
RFL 130	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_53_2	520	2074
RFL 131	R0934F.300k_Assembly_Contig_106_1	521	2075
RFL 131	Anapurna.300k_Assembly_Contig_94_1	522	2076
RFL 131	Primepii.300k_Assembly_Contig_112_1	523	2077
RFL 132	R197.300k_Assembly_Contig_82_1	524	2078
RFL 132	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_96_1	525	2079
RFL 132	Primepii.300k_Assembly_Contig_87_1	526	2080
RFL 133	R0932E.300k_Assembly_Contig_28_2	527	2081
RFL 133	Anapurna.300k_Assembly_Contig_7_2	528	2082
RFL 133	Primepii.300k_Assembly_Contig_26_2	529	2083
RFL 134	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_106_1	530	2084
RFL 134	R197.300k_Assembly_Contig_100_1	531	2085
RFL 134	Primepii.300k_Assembly_Contig_102_1	532	2086
RFL 135	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_93_1	533	2087
RFL 136	Primepii.300k_Assembly_Contig_73_1	534	2088
RFL 136	R0934F.300k_Assembly_Contig_77_1	535	2089
RFL 136	R0932E.300k_Assembly_Contig_65_1	536	2090
RFL 136	Anapurna.300k_Assembly_Contig_52_1	537	2091
RFL 136	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_84_1	538	2092
RFL 136	R197.300k_Assembly_Contig_81_1	539	2093
RFL 137	R0934F.300k_Assembly_Contig_21_3	540	2094
RFL 137	R0932E.300k_Assembly_Contig_10_3	541	2095
RFL 137	Primepii.300k_Assembly_Contig_48_3	542	2096
RFL 137	Anapurna.300k_Assembly_Contig_9_3	543	2097
RFL 137	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_20_3	544	2098
RFL 137	R197.300k_Assembly_Contig_2_3	545	2099
RFL 138	R0934F.300k_Assembly_Contig_201_1	546	2100
RFL 138	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_1_1	547	2101
RFL 138	R0934F.300k_Assembly_Contig_1_1	548	2102
RFL 139	R0934F.300k_Assembly_Contig_74_2	549	2103
RFL 139	Primepii.300k_Assembly_Contig_79_2	550	2104
RFL 139	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_70_2	551	2105

RFL 139	Anapurna.300k_Assembly_Contig_64_2	552	2106
RFL 140	Primepii.300k_Assembly_Contig_105_2	553	2107
RFL 140	R0934F.300k_Assembly_Contig_56_2	554	2108
RFL 141	R0932E.300k_Assembly_Contig_75_1	555	2109
RFL 141	R0934F.300k_Assembly_Contig_50_1	556	2110
RFL 142	R0934F.300k_Assembly_Contig_76_1	557	2111
RFL 142	Primepii.300k_Assembly_Contig_75_1	558	2112
RFL 143	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_3_1	559	2113
RFL 143	R0934F.300k_Assembly_Contig_9_1	560	2114
RFL 143	Primepii.300k_Assembly_Contig_3_1	561	2115
RFL 143	R197.300k_Assembly_Contig_8_1	562	2116
RFL 143	R0932E.300k_Assembly_Contig_3_1	563	2117
RFL 143	Anapurna.300k_Assembly_Contig_3_1	564	2118
RFL 144	Anapurna.300k_Assembly_Contig_49_1	565	2119
RFL 144	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_58_1	566	2120
RFL 144	R197.300k_Assembly_Contig_56_1	567	2121
RFL 144	R0934F.300k_Assembly_Contig_40_1	568	2122
RFL 144	Primepii.300k_Assembly_Contig_58_1	569	2123
RFL 144	R0932E.300k_Assembly_Contig_50_1	570	2124
RFL 145	R0932E.300k_Assembly_Contig_62_1	571	2125
RFL 145	R0934F.300k_Assembly_Contig_52_1	572	2126
RFL 145	Anapurna.300k_Assembly_Contig_53_1	573	2127
RFL 145	Primepii.300k_Assembly_Contig_34_2	574	2128
RFL 145	R197.300k_Assembly_Contig_44_2	575	2129
RFL 145	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_36_2	576	2130
RFL 146	Anapurna.300k_Assembly_Contig_46_3	577	2131
RFL 146	R197.300k_Assembly_Contig_147_3	578	2132
RFL 146	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_18_3	579	2133
RFL 146	R0932E.300k_Assembly_Contig_42_3	580	2134
RFL 147	Anapurna.300k_Assembly_Contig_36_4	581	2135
RFL 147	R0934F.300k_Assembly_Contig_35_3	582	2136
RFL 147	Anapurna.300k_Assembly_Contig_36_3	583	2137
RFL 147	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_43_3	584	2138
RFL 147	R0932E.300k_Assembly_Contig_49_3	585	2139
RFL 147	R197.300k_Assembly_Contig_2_6	586	2140
RFL 147	Primepii.300k_Assembly_Contig_32_3	587	2141
RFL 148	R197.300k_Assembly_Contig_28_2	588	2142
RFL 148	R0934F.300k_Assembly_Contig_13_2	589	2143
RFL 148	Primepii.300k_Assembly_Contig_4_2	590	2144
RFL 148	R0932E.300k_Assembly_Contig_218_1	591	2145
RFL 149	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_18_2	592	2146
RFL 150	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_66_3	593	2147
RFL 151	R0934F.300k_Assembly_Contig_215_1	594	2148
RFL 151	Primepii.300k_Assembly_Contig_119_1	595	2149
RFL 151	R197.300k_Assembly_Contig_114_1	596	2150
RFL 152	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_114_1	597	2151
RFL 152	R0934F.300k_Assembly_Contig_177_1	598	2152

RFL 153	R0932E.300k_Assembly_Contig_121_1	599	2153
RFL 153	Anapurna.300k_Assembly_Contig_124_1	600	2154
RFL 153	Primepii.300k_Assembly_Contig_126_1	601	2155
RFL 153	R0934F.300k_Assembly_Contig_206_1	602	2156
RFL 153	R0934F.300k_Assembly_Contig_147_1	603	2157
RFL 154	R0934F.300k_Assembly_Contig_174_1	604	2158
RFL 154	Primepii.300k_Assembly_Contig_143_1	605	2159
RFL 154	Primepii.300k_Assembly_Contig_120_1	606	2160
RFL 154	R0934F.300k_Assembly_Contig_134_1	607	2161
RFL 154	Primepii.300k_Assembly_Contig_125_1	608	2162
RFL 154	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_42_1	609	2163
RFL 154	R0934F.300k_Assembly_Contig_139_1	610	2164
RFL 154	R197.300k_Assembly_Contig_123_1	611	2165
RFL 154	R0932E.300k_Assembly_Contig_168_1	612	2166
RFL 154	R0932E.300k_Assembly_Contig_37_1	613	2167
RFL 154	Anapurna.300k_Assembly_Contig_135_1	614	2168
RFL 154	R197.300k_Assembly_Contig_140_1	615	2169
RFL 154	R197.300k_Assembly_Contig_161_1	616	2170
RFL 154	Anapurna.300k_Assembly_Contig_112_1	617	2171
RFL 154	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_160_1	618	2172
RFL 154	R0934F.300k_Assembly_Contig_182_1	619	2173
RFL 154	R0934F.300k_Assembly_Contig_200_1	620	2174
RFL 154	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_105_1	621	2175
RFL 154	Primepii.300k_Assembly_Contig_176_1	622	2176
RFL 154	R0934F.300k_Assembly_Contig_165_1	623	2177
RFL 154	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_200_1	624	2178
RFL 154	R197.300k_Assembly_Contig_13_1	625	2179
RFL 154	R197.300k_Assembly_Contig_158_1	626	2180
RFL 154	Primepii.300k_Assembly_Contig_160_1	627	2181
RFL 154	R0932E.300k_Assembly_Contig_156_1	628	2182
RFL 154	R0932E.300k_Assembly_Contig_179_1	629	2183
RFL 154	Anapurna.300k_Assembly_Contig_128_1	630	2184
RFL 154	Anapurna.300k_Assembly_Contig_104_1	631	2185
RFL 154	R0932E.300k_Assembly_Contig_177_1	632	2186
RFL 155	R197.300k_Assembly_Contig_127_1	633	2187
RFL 155	R0934F.300k_Assembly_Contig_109_1	634	2188
RFL 155	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_121_1	635	2189
RFL 155	Anapurna.300k_Assembly_Contig_108_1	636	2190
RFL 155	R0932E.300k_Assembly_Contig_122_1	637	2191
RFL 155	Primepii.300k_Assembly_Contig_110_1	638	2192
RFL 156	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_130_1	639	2193
RFL 156	Anapurna.300k_Assembly_Contig_117_2	640	2194
RFL 156	R0934F.300k_Assembly_Contig_176_1	641	2195
RFL 156	Anapurna.300k_Assembly_Contig_171_1	642	2196
RFL 156	R0932E.300k_Assembly_Contig_154_2	643	2197
RFL 156	Primepii.300k_Assembly_Contig_134_2	644	2198
RFL 157	Primepii.300k_Assembly_Contig_108_1	645	2199

RFL 157	R197.300k_Assembly_Contig_97_1	646	2200
RFL 157	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_117_1	647	2201
RFL 157	Anapurna.300k_Assembly_Contig_105_1	648	2202
RFL 157	R0932E.300k_Assembly_Contig_126_1	649	2203
RFL 157	R0934F.300k_Assembly_Contig_116_1	650	2204
RFL 158	R197.300k_Assembly_Contig_105_3	651	2205
RFL 158	Anapurna.300k_Assembly_Contig_89_3	652	2206
RFL 158	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_88_3	653	2207
RFL 158	R0934F.300k_Assembly_Contig_83_3	654	2208
RFL 158	Primepii.300k_Assembly_Contig_77_3	655	2209
RFL 158	R0932E.300k_Assembly_Contig_80_3	656	2210
RFL 159	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_177_1	657	2211
RFL 159	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_185_1	658	2212
RFL 159	Anapurna.300k_Assembly_Contig_176_1	659	2213
RFL 159	R197.300k_Assembly_Contig_191_1	660	2214
RFL 160	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_111_1	661	2215
RFL 161	R197.300k_Assembly_Contig_28_3	662	2216
RFL 161	R0934F.300k_Assembly_Contig_13_3	663	2217
RFL 161	Anapurna.300k_Assembly_Contig_27_3	664	2218
RFL 161	R0932E.300k_Assembly_Contig_9_3	665	2219
RFL 161	Primepii.300k_Assembly_Contig_4_3	666	2220
RFL 161	R0932E.300k_Assembly_Contig_218_2	667	2221
RFL 161	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_4_4	668	2222
RFL 162	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_94_1	669	2223
RFL 163	Primepii.300k_Assembly_Contig_128_1	670	2224
RFL 163	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_133_1	671	2225
RFL 163	R197.300k_Assembly_Contig_133_2	672	2226
RFL 163	R0932E.300k_Assembly_Contig_133_2	673	2227
RFL 163	R0934F.300k_Assembly_Contig_125_1	674	2228
RFL 163	Anapurna.300k_Assembly_Contig_122_2	675	2229
RFL 164	Primepii.300k_Assembly_Contig_127_1	676	2230
RFL 164	R0934F.300k_Assembly_Contig_124_1	677	2231
RFL 165	Anapurna.300k_Assembly_Contig_145_1	678	2232
RFL 165	R197.300k_Assembly_Contig_149_1	679	2233
RFL 165	Primepii.300k_Assembly_Contig_139_1	680	2234
RFL 165	R0932E.300k_Assembly_Contig_140_1	681	2235
RFL 165	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_139_1	682	2236
RFL 165	R0934F.300k_Assembly_Contig_132_1	683	2237
RFL 166	Primepii.300k_Assembly_Contig_130_1	684	2238
RFL 166	R0934F.300k_Assembly_Contig_122_2	685	2239
RFL 167	R197.300k_Assembly_Contig_118_1	686	2240
RFL 167	Anapurna.300k_Assembly_Contig_93_1	687	2241
RFL 167	R0932E.300k_Assembly_Contig_96_1	688	2242
RFL 167	R0934F.300k_Assembly_Contig_100_1	689	2243
RFL 167	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_107_1	690	2244
RFL 167	Primepii.300k_Assembly_Contig_100_1	691	2245
RFL 168	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_88_1	692	2246

RFL 168	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_28_1	693	2247
RFL 169	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_86_2	694	2248
RFL 170	R197.300k_Assembly_Contig_94_2	695	2249
RFL 170	R0934F.300k_Assembly_Contig_67_2	696	2250
RFL 170	Primepii.300k_Assembly_Contig_60_2	697	2251
RFL 170	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_113_2	698	2252
RFL 170	Anapurna.300k_Assembly_Contig_174_3	699	2253
RFL 171	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_84_1	700	2254
RFL 171	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_46_1	701	2255
RFL 172	R0932E.300k_Assembly_Contig_67_1	702	2256
RFL 172	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_57_1	703	2257
RFL 172	R0934F.300k_Assembly_Contig_82_1	704	2258
RFL 172	Primepii.300k_Assembly_Contig_68_1	705	2259
RFL 172	Anapurna.300k_Assembly_Contig_32_1	706	2260
RFL 172	R197.300k_Assembly_Contig_61_1	707	2261
RFL 173	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_83_1	708	2262
RFL 174	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_41_1	709	2263
RFL 174	R197.300k_Assembly_Contig_102_1	710	2264
RFL 174	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_41_2	711	2265
RFL 175	Primepii.300k_Assembly_Contig_200_1	712	2266
RFL 175	Primepii.300k_Assembly_Contig_162_1	713	2267
RFL 175	R0932E.300k_Assembly_Contig_144_1	714	2268
RFL 175	R0934F.300k_Assembly_Contig_156_1	715	2269
RFL 175	Anapurna.300k_Assembly_Contig_123_1	716	2270
RFL 176	R197.300k_Assembly_Contig_93_1	717	2271
RFL 176	R0934F.300k_Assembly_Contig_90_1	718	2272
RFL 176	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_100_1	719	2273
RFL 176	Anapurna.300k_Assembly_Contig_86_1	720	2274
RFL 176	R0932E.300k_Assembly_Contig_108_1	721	2275
RFL 177	R197.300k_Assembly_Contig_128_1	722	2276
RFL 177	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_126_1	723	2277
RFL 177	Anapurna.300k_Assembly_Contig_127_1	724	2278
RFL 177	R0932E.300k_Assembly_Contig_135_1	725	2279
RFL 178	Primepii.300k_Assembly_Contig_97_1	726	2280
RFL 179	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_89_1	727	2281
RFL 180	R0932E.300k_Assembly_Contig_160_1	728	2282
RFL 180	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_97_1	729	2283
RFL 180	Primepii.300k_Assembly_Contig_141_1	730	2284
RFL 180	R197.300k_Assembly_Contig_141_1	731	2285
RFL 180	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_149_1	732	2286
RFL 180	Anapurna.300k_Assembly_Contig_142_1	733	2287
RFL 180	R0934F.300k_Assembly_Contig_146_1	734	2288
RFL 181	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_104_1	735	2289
RFL 181	Primepii.300k_Assembly_Contig_104_1	736	2290
RFL 182	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_53_2	737	2291
RFL 182	R197.300k_Assembly_Contig_19_2	738	2292
RFL 182	R0932E.300k_Assembly_Contig_68_2	739	2293

RFL 183	R0932E.300k_Assembly_Contig_31_2	740	2294
RFL 183	R197.300k_Assembly_Contig_49_2	741	2295
RFL 183	R0934F.300k_Assembly_Contig_41_2	742	2296
RFL 183	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_27_2	743	2297
RFL 183	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_26_1	744	2298
RFL 183	Anapurna.300k_Assembly_Contig_40_2	745	2299
RFL 183	Primepii.300k_Assembly_Contig_65_2	746	2300
RFL 184	R0932E.300k_Assembly_Contig_63_1	747	2301
RFL 184	R197.300k_Assembly_Contig_35_1	748	2302
RFL 184	Anapurna.300k_Assembly_Contig_170_1	749	2303
RFL 184	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_61_1	750	2304
RFL 185	R0934F.300k_Assembly_Contig_92_3	751	2305
RFL 185	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_52_3	752	2306
RFL 185	R0932E.300k_Assembly_Contig_109_3	753	2307
RFL 185	R197.300k_Assembly_Contig_90_3	754	2308
RFL 186	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_131_1	755	2309
RFL 186	R0932E.300k_Assembly_Contig_141_1	756	2310
RFL 186	R197.300k_Assembly_Contig_143_1	757	2311
RFL 186	R0934F.300k_Assembly_Contig_133_1	758	2312
RFL 186	Anapurna.300k_Assembly_Contig_139_1	759	2313
RFL 186	Primepii.300k_Assembly_Contig_144_1	760	2314
RFL 187	R0934F.300k_Assembly_Contig_53_3	761	2315
RFL 187	Primepii.300k_Assembly_Contig_28_3	762	2316
RFL 187	R197.300k_Assembly_Contig_53_3	763	2317
RFL 187	R0932E.300k_Assembly_Contig_14_3	764	2318
RFL 187	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_49_3	765	2319
RFL 187	Anapurna.300k_Assembly_Contig_55_3	766	2320
RFL 189	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_23_1	767	2321
RFL 191	R197.300k_Assembly_Contig_136_1	768	2322
RFL 192	R0934F.300k_Assembly_Contig_119_1	769	2323
RFL 192	R197.300k_Assembly_Contig_134_1	770	2324
RFL 192	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_125_1	771	2325
RFL 192	Primepii.300k_Assembly_Contig_133_1	772	2326
RFL 192	Anapurna.300k_Assembly_Contig_125_1	773	2327
RFL 192	R0932E.300k_Assembly_Contig_136_1	774	2328
RFL 193	R0932E.300k_Assembly_Contig_130_1	775	2329
RFL 193	R0934F.300k_Assembly_Contig_95_1	776	2330
RFL 193	Anapurna.300k_Assembly_Contig_107_1	777	2331
RFL 193	R197.300k_Assembly_Contig_110_1	778	2332
RFL 194	Primepii.300k_Assembly_Contig_107_1	779	2333
RFL 194	R197.300k_Assembly_Contig_99_1	780	2334
RFL 194	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_156_1	781	2335
RFL 194	R197.300k_Assembly_Contig_132_1	782	2336
RFL 194	Primepii.300k_Assembly_Contig_121_1	783	2337
RFL 194	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_51_1	784	2338
RFL 195	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_165_1	785	2339
RFL 195	R0934F.300k_Assembly_Contig_163_1	786	2340

RFL 195	R0932E.300k_Assembly_Contig_95_1	787	2341
RFL 195	Primepii.300k_Assembly_Contig_171_1	788	2342
RFL 195	Anapurna.300k_Assembly_Contig_2_4	789	2343
RFL 195	R197.300k_Assembly_Contig_176_1	790	2344
RFL 196	Anapurna.300k_Assembly_Contig_81_2	791	2345
RFL 196	R197.300k_Assembly_Contig_88_2	792	2346
RFL 196	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_114_2	793	2347
RFL 196	R0934F.300k_Assembly_Contig_112_2	794	2348
RFL 196	Primepii.300k_Assembly_Contig_103_2	795	2349
RFL 196	R0932E.300k_Assembly_Contig_106_2	796	2350
RFL 197	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_89_1	797	2351
RFL 197	R0932E.300k_Assembly_Contig_84_1	798	2352
RFL 197	R197.300k_Assembly_Contig_89_1	799	2353
RFL 197	Primepii.300k_Assembly_Contig_78_1	800	2354
RFL 197	Anapurna.300k_Assembly_Contig_65_1	801	2355
RFL 197	R0934F.300k_Assembly_Contig_105_1	802	2356
RFL 198	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_155_1	803	2357
RFL 198	R0934F.300k_Assembly_Contig_151_1	804	2358
RFL 198	R197.300k_Assembly_Contig_157_1	805	2359
RFL 198	Anapurna.300k_Assembly_Contig_150_1	806	2360
RFL 198	Primepii.300k_Assembly_Contig_157_1	807	2361
RFL 198	R0932E.300k_Assembly_Contig_169_1	808	2362
RFL 199	R0934F.300k_Assembly_Contig_170_1	809	2363
RFL 199	Anapurna.300k_Assembly_Contig_166_1	810	2364
RFL 199	R0932E.300k_Assembly_Contig_181_1	811	2365
RFL 199	R197.300k_Assembly_Contig_178_1	812	2366
RFL 199	Primepii.300k_Assembly_Contig_175_2	813	2367
RFL 199	Primepii.300k_Assembly_Contig_175_1	814	2368
RFL 199	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_110_1	815	2369
RFL 199	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_171_1	816	2370
RFL 200	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_154_1	817	2371
RFL 200	Primepii.300k_Assembly_Contig_149_1	818	2372
RFL 200	R197.300k_Assembly_Contig_148_1	819	2373
RFL 200	Anapurna.300k_Assembly_Contig_151_1	820	2374
RFL 200	R0932E.300k_Assembly_Contig_158_1	821	2375
RFL 200	R0934F.300k_Assembly_Contig_135_1	822	2376
RFL 201	Anapurna.300k_Assembly_Contig_156_1	823	2377
RFL 201	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_152_1	824	2378
RFL 201	R0934F.300k_Assembly_Contig_162_1	825	2379
RFL 201	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_95_1	826	2380
RFL 201	Primepii.300k_Assembly_Contig_153_1	827	2381
RFL 201	R197.300k_Assembly_Contig_162_1	828	2382
RFL 201	R0932E.300k_Assembly_Contig_159_1	829	2383
RFL 202	Anapurna.300k_Assembly_Contig_157_1	830	2384
RFL 202	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_164_1	831	2385
RFL 202	R197.300k_Assembly_Contig_166_1	832	2386
RFL 202	R0932E.300k_Assembly_Contig_165_1	833	2387

RFL 202	R0934F.300k_Assembly_Contig_154_1	834	2388
RFL 202	Primepii.300k_Assembly_Contig_167_1	835	2389
RFL 203	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_105_1	836	2390
RFL 203	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_119_1	837	2391
RFL 203	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_147_1	838	2392
RFL 203	R0932E.300k_Assembly_Contig_173_2	839	2393
RFL 203	R0932E.300k_Assembly_Contig_173_1	840	2394
RFL 203	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_3_1	841	2395
RFL 203	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_120_1	842	2396
RFL 203	R197.300k_Assembly_Contig_150_1	843	2397
RFL 203	Anapurna.300k_Assembly_Contig_153_1	844	2398
RFL 203	R0934F.300k_Assembly_Contig_157_2	845	2399
RFL 203	Primepii.300k_Assembly_Contig_156_1	846	2400
RFL 203	R0934F.300k_Assembly_Contig_157_1	847	2401
RFL 204	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_103_1	848	2402
RFL 204	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_100_1	849	2403
RFL 205	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_96_1	850	2404
RFL 205	R0932E.300k_Assembly_Contig_155_1	851	2405
RFL 205	Anapurna.300k_Assembly_Contig_140_1	852	2406
RFL 205	Primepii.300k_Assembly_Contig_148_1	853	2407
RFL 205	R197.300k_Assembly_Contig_151_1	854	2408
RFL 205	R0934F.300k_Assembly_Contig_159_1	855	2409
RFL 205	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_151_1	856	2410
RFL 206	R0932E.300k_Assembly_Contig_117_1	857	2411
RFL 207	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_62_1	858	2412
RFL 208	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_136_1	859	2413
RFL 209	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_143_1	860	2414
RFL 209	R0934F.300k_Assembly_Contig_140_1	861	2415
RFL 209	R0932E.300k_Assembly_Contig_174_1	862	2416
RFL 209	R197.300k_Assembly_Contig_154_1	863	2417
RFL 209	Primepii.300k_Assembly_Contig_152_1	864	2418
RFL 209	Anapurna.300k_Assembly_Contig_141_1	865	2419
RFL 210	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_163_1	866	2420
RFL 210	Anapurna.300k_Assembly_Contig_149_1	867	2421
RFL 210	R0934F.300k_Assembly_Contig_152_1	868	2422
RFL 210	R197.300k_Assembly_Contig_168_1	869	2423
RFL 210	R0932E.300k_Assembly_Contig_172_1	870	2424
RFL 210	Primepii.300k_Assembly_Contig_166_1	871	2425
RFL 211	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_99_1	872	2426
RFL 212	R0932E.300k_Assembly_Contig_99_1	873	2427
RFL 212	R197.300k_Assembly_Contig_85_2	874	2428
RFL 212	R0932E.300k_Assembly_Contig_97_2	875	2429
RFL 212	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_73_1	876	2430
RFL 212	R0934F.300k_Assembly_Contig_94_2	877	2431
RFL 212	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_91_1	878	2432
RFL 212	Primepii.300k_Assembly_Contig_76_2	879	2433
RFL 212	R197.300k_Assembly_Contig_109_1	880	2434

RFL 212	Primepii.300k_Assembly_Contig_99_1	881	2435
RFL 212	R0934F.300k_Assembly_Contig_107_1	882	2436
RFL 212	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_68_2	883	2437
RFL 212	Anapurna.300k_Assembly_Contig_96_1	884	2438
RFL 212	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_132_1	885	2439
RFL 212	Anapurna.300k_Assembly_Contig_75_2	886	2440
RFL 213	Primepii.300k_Assembly_Contig_61_2	887	2441
RFL 213	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_64_2	888	2442
RFL 213	Anapurna.300k_Assembly_Contig_69_2	889	2443
RFL 213	R0934F.300k_Assembly_Contig_65_2	890	2444
RFL 213	R197.300k_Assembly_Contig_48_2	891	2445
RFL 213	R0932E.300k_Assembly_Contig_70_2	892	2446
RFL 215	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_98_1	893	2447
RFL 216	R197.300k_Assembly_Contig_96_2	894	2448
RFL 216	R0932E.300k_Assembly_Contig_93_2	895	2449
RFL 216	Anapurna.300k_Assembly_Contig_126_1	896	2450
RFL 216	R0934F.300k_Assembly_Contig_102_2	897	2451
RFL 217	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_16_2	898	2452
RFL 218	Primepii.300k_Assembly_Contig_95_2	899	2453
RFL 218	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_166_1	900	2454
RFL 218	R197.300k_Assembly_Contig_112_2	901	2455
RFL 219	R0932E.300k_Assembly_Contig_105_1	902	2456
RFL 219	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_110_1	903	2457
RFL 219	R197.300k_Assembly_Contig_87_1	904	2458
RFL 219	Anapurna.300k_Assembly_Contig_91_1	905	2459
RFL 219	R0934F.300k_Assembly_Contig_101_1	906	2460
RFL 219	Primepii.300k_Assembly_Contig_98_1	907	2461
RFL 220	Primepii.300k_Assembly_Contig_115_2	908	2462
RFL 220	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_108_2	909	2463
RFL 221	R0934F.300k_Assembly_Contig_47_2	910	2464
RFL 221	R0932E.300k_Assembly_Contig_33_2	911	2465
RFL 221	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_16_2	912	2466
RFL 221	Anapurna.300k_Assembly_Contig_30_2	913	2467
RFL 221	R197.300k_Assembly_Contig_52_2	914	2468
RFL 221	Primepii.300k_Assembly_Contig_15_2	915	2469
RFL 222	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_97_1	916	2470
RFL 222	R197.300k_Assembly_Contig_108_1	917	2471
RFL 222	Anapurna.300k_Assembly_Contig_101_1	918	2472
RFL 223	R0934F.300k_Assembly_Contig_58_2	919	2473
RFL 223	Anapurna.300k_Assembly_Contig_25_3	920	2474
RFL 223	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_46_3	921	2475
RFL 223	R197.300k_Assembly_Contig_45_3	922	2476
RFL 223	R0932E.300k_Assembly_Contig_219_3	923	2477
RFL 223	Primepii.300k_Assembly_Contig_36_2	924	2478
RFL 223	R0932E.300k_Assembly_Contig_57_3	925	2479
RFL 224	R0932E.300k_Assembly_Contig_212_1	926	2480
RFL 225	R0932E.300k_Assembly_Contig_117_2	927	2481

RFL 226	R0932E.300k_Assembly_Contig_67_2	928	2482
RFL 226	Primepii.300k_Assembly_Contig_118_1	929	2483
RFL 226	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_101_1	930	2484
RFL 226	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_57_2	931	2485
RFL 226	R0934F.300k_Assembly_Contig_82_2	932	2486
RFL 226	Anapurna.300k_Assembly_Contig_95_1	933	2487
RFL 226	R0934F.300k_Assembly_Contig_98_1	934	2488
RFL 226	Primepii.300k_Assembly_Contig_68_2	935	2489
RFL 226	Anapurna.300k_Assembly_Contig_32_2	936	2490
RFL 226	R197.300k_Assembly_Contig_61_2	937	2491
RFL 227	R0934F.300k_Assembly_Contig_62_1	938	2492
RFL 227	Primepii.300k_Assembly_Contig_196_1	939	2493
RFL 228	R197.300k_Assembly_Contig_85_1	940	2494
RFL 228	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_68_1	941	2495
RFL 228	R0934F.300k_Assembly_Contig_94_1	942	2496
RFL 228	R0932E.300k_Assembly_Contig_97_1	943	2497
RFL 228	Anapurna.300k_Assembly_Contig_75_1	944	2498
RFL 228	Primepii.300k_Assembly_Contig_76_1	945	2499
RFL 229	R0932E.300k_Assembly_Contig_30_3	946	2500
RFL 229	R197.300k_Assembly_Contig_26_5	947	2501
RFL 229	Anapurna.300k_Assembly_Contig_26_4	948	2502
RFL 229	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_24_5	949	2503
RFL 229	Primepii.300k_Assembly_Contig_33_3	950	2504
RFL 229	R0934F.300k_Assembly_Contig_16_5	951	2505
RFL 230	R0932E.300k_Assembly_Contig_209_2	952	2506
RFL 231	R0932E.300k_Assembly_Contig_36_1	953	2507
RFL 231	R0934F.300k_Assembly_Contig_42_1	954	2508
RFL 231	R197.300k_Assembly_Contig_55_1	955	2509
RFL 231	Anapurna.300k_Assembly_Contig_44_1	956	2510
RFL 231	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_33_1	957	2511
RFL 231	Primepii.300k_Assembly_Contig_54_1	958	2512
RFL 232	R0932E.300k_Assembly_Contig_171_1	959	2513
RFL 232	Primepii.300k_Assembly_Contig_173_1	960	2514
RFL 232	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_168_1	961	2515
RFL 232	R197.300k_Assembly_Contig_177_1	962	2516
RFL 232	Anapurna.300k_Assembly_Contig_165_1	963	2517
RFL 232	R0934F.300k_Assembly_Contig_158_1	964	2518
RFL 234	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_101_1	965	2519
RFL 235	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_75_1	966	2520
RFL 236	R0934F.300k_Assembly_Contig_33_2	967	2521
RFL 236	R0932E.300k_Assembly_Contig_52_1	968	2522
RFL 236	Primepii.300k_Assembly_Contig_29_3	969	2523
RFL 236	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_38_1	970	2524
RFL 236	R197.300k_Assembly_Contig_50_2	971	2525
RFL 236	Anapurna.300k_Assembly_Contig_34_2	972	2526
RFL 237	R0934F.300k_Assembly_Contig_118_1	973	2527
RFL 237	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_82_1	974	2528

RFL 238	Primepii.300k_Assembly_Contig_29_4	975	2529
RFL 238	R0934F.300k_Assembly_Contig_33_3	976	2530
RFL 238	Anapurna.300k_Assembly_Contig_34_3	977	2531
RFL 238	R0932E.300k_Assembly_Contig_52_2	978	2532
RFL 238	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_38_2	979	2533
RFL 238	R197.300k_Assembly_Contig_50_3	980	2534
RFL 239	Anapurna.300k_Assembly_Contig_92_1	981	2535
RFL 239	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_103_1	982	2536
RFL 240	Primepii.300k_Assembly_Contig_140_1	983	2537
RFL 240	R197.300k_Assembly_Contig_156_1	984	2538
RFL 240	R0932E.300k_Assembly_Contig_148_1	985	2539
RFL 240	R0934F.300k_Assembly_Contig_136_1	986	2540
RFL 241	Primepii.300k_Assembly_Contig_138_1	987	2541
RFL 241	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_134_2	988	2542
RFL 241	R197.300k_Assembly_Contig_164_2	989	2543
RFL 241	R0932E.300k_Assembly_Contig_143_1	990	2544
RFL 241	Anapurna.300k_Assembly_Contig_136_1	991	2545
RFL 241	R0934F.300k_Assembly_Contig_137_1	992	2546
RFL 242	Anapurna.300k_Assembly_Contig_72_1	993	2547
RFL 243	Anapurna.300k_Assembly_Contig_8_2	994	2548
RFL 244	Anapurna.300k_Assembly_Contig_164_1	995	2549
RFL 245	R0934F.300k_Assembly_Contig_58_1	996	2550
RFL 245	Anapurna.300k_Assembly_Contig_25_2	997	2551
RFL 245	R0932E.300k_Assembly_Contig_57_2	998	2552
RFL 245	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_46_2	999	2553
RFL 245	R197.300k_Assembly_Contig_45_2	1000	2554
RFL 245	Primepii.300k_Assembly_Contig_36_1	1001	2555
RFL 245	R0932E.300k_Assembly_Contig_219_2	1002	2556
RFL 246	Primepii.300k_Assembly_Contig_116_2	1003	2557
RFL 246	Anapurna.300k_Assembly_Contig_90_3	1004	2558
RFL 246	R197.300k_Assembly_Contig_125_2	1005	2559
RFL 246	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_102_2	1006	2560
RFL 246	R0934F.300k_Assembly_Contig_96_2	1007	2561
RFL 246	R0932E.300k_Assembly_Contig_125_2	1008	2562
RFL 247	R0932E.300k_Assembly_Contig_53_1	1009	2563
RFL 247	R0934F.300k_Assembly_Contig_26_1	1010	2564
RFL 247	Primepii.300k_Assembly_Contig_40_1	1011	2565
RFL 247	Anapurna.300k_Assembly_Contig_29_1	1012	2566
RFL 247	R197.300k_Assembly_Contig_36_1	1013	2567
RFL 247	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_28_1	1014	2568
RFL 247	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_25_1	1015	2569
RFL 248	R0934F.300k_Assembly_Contig_183_1	1016	2570
RFL 248	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_176_1	1017	2571
RFL 248	R0932E.300k_Assembly_Contig_180_1	1018	2572
RFL 249	Anapurna.300k_Assembly_Contig_130_1	1019	2573
RFL 249	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_128_1	1020	2574
RFL 249	R197.300k_Assembly_Contig_144_1	1021	2575

RFL 249	R0934F.300k_Assembly_Contig_131_1	1022	2576
RFL 249	R0932E.300k_Assembly_Contig_137_1	1023	2577
RFL 249	Primepii.300k_Assembly_Contig_135_1	1024	2578
RFL 250	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_47_2	1025	2579
RFL 250	Primepii.300k_Assembly_Contig_69_2	1026	2580
RFL 250	R0932E.300k_Assembly_Contig_69_2	1027	2581
RFL 250	Anapurna.300k_Assembly_Contig_56_2	1028	2582
RFL 250	R0934F.300k_Assembly_Contig_59_2	1029	2583
RFL 250	R197.300k_Assembly_Contig_91_2	1030	2584
RFL 251	R197.300k_Assembly_Contig_26_6	1031	2585
RFL 251	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_108_1	1032	2586
RFL 251	Anapurna.300k_Assembly_Contig_26_5	1033	2587
RFL 251	R0932E.300k_Assembly_Contig_30_4	1034	2588
RFL 251	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_24_6	1035	2589
RFL 251	Primepii.300k_Assembly_Contig_33_4	1036	2590
RFL 251	R0934F.300k_Assembly_Contig_16_6	1037	2591
RFL 252	Primepii.300k_Assembly_Contig_189_1	1038	2592
RFL 252	R0934F.300k_Assembly_Contig_169_1	1039	2593
RFL 253	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_112_2	1040	2594
RFL 253	R0932E.300k_Assembly_Contig_111_2	1041	2595
RFL 253	R0934F.300k_Assembly_Contig_130_2	1042	2596
RFL 253	Anapurna.300k_Assembly_Contig_88_2	1043	2597
RFL 254	R0932E.300k_Assembly_Contig_119_2	1044	2598
RFL 254	R0934F.300k_Assembly_Contig_108_2	1045	2599
RFL 254	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_77_2	1046	2600
RFL 254	R197.300k_Assembly_Contig_122_2	1047	2601
RFL 254	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_116_2	1048	2602
RFL 254	Anapurna.300k_Assembly_Contig_103_2	1049	2603
RFL 254	Primepii.300k_Assembly_Contig_101_2	1050	2604
RFL 255	R0934F.300k_Assembly_Contig_212_1	1051	2605
RFL 256	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_76_1	1052	2606
RFL 256	R0934F.300k_Assembly_Contig_79_1	1053	2607
RFL 256	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_32_1	1054	2608
RFL 256	R0932E.300k_Assembly_Contig_81_1	1055	2609
RFL 256	Anapurna.300k_Assembly_Contig_67_1	1056	2610
RFL 256	Primepii.300k_Assembly_Contig_89_1	1057	2611
RFL 256	R197.300k_Assembly_Contig_74_1	1058	2612
RFL 257	Primepii.300k_Assembly_Contig_71_1	1059	2613
RFL 257	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_78_1	1060	2614
RFL 257	R0932E.300k_Assembly_Contig_101_1	1061	2615
RFL 257	R0934F.300k_Assembly_Contig_85_1	1062	2616
RFL 257	R197.300k_Assembly_Contig_76_1	1063	2617
RFL 257	Anapurna.300k_Assembly_Contig_79_1	1064	2618
RFL 258	Primepii.300k_Assembly_Contig_41_1	1065	2619
RFL 259	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_76_2	1066	2620
RFL 260	Anapurna.300k_Assembly_Contig_155_1	1067	2621
RFL 260	R0932E.300k_Assembly_Contig_163_2	1068	2622

RFL 260	R0934F.300k_Assembly_Contig_160_1	1069	2623
RFL 260	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_162_1	1070	2624
RFL 260	R197.300k_Assembly_Contig_171_1	1071	2625
RFL 260	Primepii.300k_Assembly_Contig_146_1	1072	2626
RFL 261	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_90_2	1073	2627
RFL 262	Primepii.300k_Assembly_Contig_172_1	1074	2628
RFL 262	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_159_1	1075	2629
RFL 262	R197.300k_Assembly_Contig_167_1	1076	2630
RFL 263	R197.300k_Assembly_Contig_126_1	1077	2631
RFL 263	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_157_1	1078	2632
RFL 263	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_189_1	1079	2633
RFL 263	R0932E.300k_Assembly_Contig_132_1	1080	2634
RFL 263	Anapurna.300k_Assembly_Contig_114_1	1081	2635
RFL 264	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_64_1	1082	2636
RFL 265	R197.300k_Assembly_Contig_129_1	1083	2637
RFL 265	R0934F.300k_Assembly_Contig_120_1	1084	2638
RFL 265	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_118_1	1085	2639
RFL 265	Anapurna.300k_Assembly_Contig_102_1	1086	2640
RFL 265	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_79_1	1087	2641
RFL 265	Primepii.300k_Assembly_Contig_123_1	1088	2642
RFL 265	R0932E.300k_Assembly_Contig_127_1	1089	2643
RFL 266	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_17_2	1090	2644
RFL 267	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_90_3	1091	2645
RFL 268	R197.300k_Assembly_Contig_90_4	1092	2646
RFL 268	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_52_4	1093	2647
RFL 268	R0934F.300k_Assembly_Contig_92_4	1094	2648
RFL 268	R0932E.300k_Assembly_Contig_109_4	1095	2649
RFL 269	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_84_2	1096	2650
RFL 270	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_56_1	1097	2651
RFL 271	R0932E.300k_Assembly_Contig_167_1	1098	2652
RFL 272	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_17_1	1099	2653
RFL 273	Primepii.300k_Assembly_Contig_84_2	1100	2654
RFL 273	R0932E.300k_Assembly_Contig_212_2	1101	2655
RFL 273	R0934F.300k_Assembly_Contig_62_2	1102	2656
RFL 274	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_87_1	1103	2657
RFL 275	Anapurna.300k_Assembly_Contig_208_1	1104	2658
RFL 276	R0934F.300k_Assembly_Contig_42_2	1105	2659
RFL 276	R197.300k_Assembly_Contig_55_2	1106	2660
RFL 276	R0932E.300k_Assembly_Contig_36_2	1107	2661
RFL 276	Primepii.300k_Assembly_Contig_54_2	1108	2662
RFL 276	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_33_2	1109	2663
RFL 276	Anapurna.300k_Assembly_Contig_44_2	1110	2664
RFL 277	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_2_1	1111	2665
RFL 277	R0934F.300k_Assembly_Contig_3_1	1112	2666
RFL 278	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_85_2	1113	2667
RFL 279	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_56_2	1114	2668
RFL 279	R0934F.300k_Assembly_Contig_60_2	1115	2669

RFL 279	Anapurna.300k_Assembly_Contig_60_3	1116	2670
RFL 279	Primepii.300k_Assembly_Contig_56_3	1117	2671
RFL 279	R197.300k_Assembly_Contig_60_2	1118	2672
RFL 279	R0932E.300k_Assembly_Contig_2_2	1119	2673
RFL 280	R0934F.300k_Assembly_Contig_129_1	1120	2674
RFL 280	R197.300k_Assembly_Contig_139_1	1121	2675
RFL 280	Anapurna.300k_Assembly_Contig_129_1	1122	2676
RFL 280	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_127_1	1123	2677
RFL 280	Primepii.300k_Assembly_Contig_136_2	1124	2678
RFL 280	R0932E.300k_Assembly_Contig_138_1	1125	2679
RFL 281	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_23_2	1126	2680
RFL 282	R197.300k_Assembly_Contig_181_1	1127	2681
RFL 282	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_186_1	1128	2682
RFL 282	R0932E.300k_Assembly_Contig_95_2	1129	2683
RFL 282	Primepii.300k_Assembly_Contig_177_1	1130	2684
RFL 282	R0934F.300k_Assembly_Contig_155_1	1131	2685
RFL 282	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_119_1	1132	2686
RFL 282	R197.300k_Assembly_Contig_106_1	1133	2687
RFL 282	Primepii.300k_Assembly_Contig_161_1	1134	2688
RFL 282	Anapurna.300k_Assembly_Contig_160_1	1135	2689
RFL 282	R197.300k_Assembly_Contig_219_1	1136	2690
RFL 282	Anapurna.300k_Assembly_Contig_198_1	1137	2691
RFL 282	Anapurna.300k_Assembly_Contig_100_1	1138	2692
RFL 282	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_170_1	1139	2693
RFL 283	R0934F.300k_Assembly_Contig_79_2	1140	2694
RFL 283	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_76_2	1141	2695
RFL 283	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_32_2	1142	2696
RFL 283	Primepii.300k_Assembly_Contig_89_2	1143	2697
RFL 283	R197.300k_Assembly_Contig_74_2	1144	2698
RFL 283	R0932E.300k_Assembly_Contig_81_2	1145	2699
RFL 283	Anapurna.300k_Assembly_Contig_67_2	1146	2700
RFL 284	Primepii.300k_Assembly_Contig_84_1	1147	2701
RFL 285	Primepii.300k_Assembly_Contig_111_2	1148	2702
RFL 286	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_55_2	1149	2703
RFL 287	Anapurna.300k_Assembly_Contig_154_2	1150	2704
RFL 287	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_142_2	1151	2705
RFL 287	R197.300k_Assembly_Contig_153_2	1152	2706
RFL 287	Primepii.300k_Assembly_Contig_158_2	1153	2707
RFL 288	Primepii.300k_Assembly_Contig_60_1	1154	2708
RFL 288	R0934F.300k_Assembly_Contig_67_1	1155	2709
RFL 289	R0932E.300k_Assembly_Contig_206_2	1156	2710
RFL 290	R0932E.300k_Assembly_Contig_166_2	1157	2711
RFL 290	R0934F.300k_Assembly_Contig_166_2	1158	2712
RFL 290	Primepii.300k_Assembly_Contig_174_2	1159	2713
RFL 290	R197.300k_Assembly_Contig_174_2	1160	2714
RFL 290	Anapurna.300k_Assembly_Contig_161_2	1161	2715
RFL 290	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_161_2	1162	2716

RFL 291	Anapurna.300k_Assembly_Contig_27_2	1163	2717
RFL 291	R0932E.300k_Assembly_Contig_9_2	1164	2718
RFL 291	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_4_3	1165	2719
RFL 292	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_68_2	1166	2720
RFL 293	R197.300k_Assembly_Contig_73_1	1167	2721
RFL 294	Primepii.300k_Assembly_Contig_116_1	1168	2722
RFL 294	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_102_1	1169	2723
RFL 294	Anapurna.300k_Assembly_Contig_90_2	1170	2724
RFL 294	R197.300k_Assembly_Contig_125_1	1171	2725
RFL 294	R0934F.300k_Assembly_Contig_96_1	1172	2726
RFL 294	R0932E.300k_Assembly_Contig_125_1	1173	2727
RFL 295	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_112_1	1174	2728
RFL 296	R197.300k_Assembly_Contig_159_1	1175	2729
RFL 296	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_146_1	1176	2730
RFL 296	Primepii.300k_Assembly_Contig_154_1	1177	2731
RFL 296	R0934F.300k_Assembly_Contig_144_1	1178	2732
RFL 296	Anapurna.300k_Assembly_Contig_152_1	1179	2733
RFL 296	R0932E.300k_Assembly_Contig_149_1	1180	2734
RFL 297	R0932E.300k_Assembly_Contig_129_1	1181	2735
RFL 297	Anapurna.300k_Assembly_Contig_120_1	1182	2736
RFL 297	Primepii.300k_Assembly_Contig_129_1	1183	2737
RFL 297	R197.300k_Assembly_Contig_145_1	1184	2738
RFL 297	R0934F.300k_Assembly_Contig_121_1	1185	2739
RFL 297	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_129_1	1186	2740
RFL 298	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_120_1	1187	2741
RFL 298	Anapurna.300k_Assembly_Contig_110_1	1188	2742
RFL 298	R197.300k_Assembly_Contig_124_1	1189	2743
RFL 298	R0932E.300k_Assembly_Contig_124_1	1190	2744
RFL 298	Primepii.300k_Assembly_Contig_124_1	1191	2745
RFL 298	R0934F.300k_Assembly_Contig_127_1	1192	2746
RFL 299	R197.300k_Assembly_Contig_195_2	1193	2747
RFL 299	R0934F.300k_Assembly_Contig_192_1	1194	2748
RFL 299	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_192_1	1195	2749
RFL 300	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_111_2	1196	2750
RFL 300	R197.300k_Assembly_Contig_121_2	1197	2751
RFL 300	Primepii.300k_Assembly_Contig_113_2	1198	2752
RFL 301	Anapurna.300k_Assembly_Contig_69_3	1199	2753
RFL 301	Primepii.300k_Assembly_Contig_61_3	1200	2754
RFL 301	R197.300k_Assembly_Contig_48_3	1201	2755
RFL 301	R0934F.300k_Assembly_Contig_65_3	1202	2756
RFL 301	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_64_3	1203	2757
RFL 301	R0932E.300k_Assembly_Contig_70_3	1204	2758
RFL 302	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_24_2	1205	2759
RFL 303	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_199_1	1206	2760
RFL 303	Anapurna.300k_Assembly_Contig_195_1	1207	2761
RFL 304	Anapurna.300k_Assembly_Contig_120_2	1208	2762
RFL 304	R0932E.300k_Assembly_Contig_129_2	1209	2763

RFL 304	Primepii.300k_Assembly_Contig_129_2	1210	2764
RFL 304	R197.300k_Assembly_Contig_145_2	1211	2765
RFL 304	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_129_2	1212	2766
RFL 304	R0934F.300k_Assembly_Contig_121_2	1213	2767
RFL 305	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_135_1	1214	2768
RFL 306	R197.300k_Assembly_Contig_107_2	1215	2769
RFL 306	R0934F.300k_Assembly_Contig_88_2	1216	2770
RFL 306	Anapurna.300k_Assembly_Contig_76_2	1217	2771
RFL 306	Primepii.300k_Assembly_Contig_74_2	1218	2772
RFL 306	R0932E.300k_Assembly_Contig_115_2	1219	2773
RFL 306	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_81_2	1220	2774
RFL 307	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_104_1	1221	2775
RFL 308	R197.300k_Assembly_Contig_198_1	1222	2776
RFL 308	R0932E.300k_Assembly_Contig_178_2	1223	2777
RFL 308	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_193_1	1224	2778
RFL 308	Anapurna.300k_Assembly_Contig_183_1	1225	2779
RFL 308	R0934F.300k_Assembly_Contig_175_1	1226	2780
RFL 308	Primepii.300k_Assembly_Contig_198_1	1227	2781
RFL 309	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_52_2	1228	2782
RFL 309	Primepii.300k_Assembly_Contig_194_1	1229	2783
RFL 309	R0932E.300k_Assembly_Contig_51_1	1230	2784
RFL 309	R0934F.300k_Assembly_Contig_191_2	1231	2785
RFL 309	R197.300k_Assembly_Contig_190_2	1232	2786
RFL 310	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_19_1	1233	2787
RFL 311	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_123_1	1234	2788
RFL 311	Anapurna.300k_Assembly_Contig_118_1	1235	2789
RFL 311	R197.300k_Assembly_Contig_131_1	1236	2790
RFL 311	R0932E.300k_Assembly_Contig_128_1	1237	2791
RFL 312	Anapurna.300k_Assembly_Contig_146_1	1238	2792
RFL 312	R0932E.300k_Assembly_Contig_175_1	1239	2793
RFL 312	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_158_1	1240	2794
RFL 312	R197.300k_Assembly_Contig_155_1	1241	2795
RFL 312	R0934F.300k_Assembly_Contig_153_1	1242	2796
RFL 312	Primepii.300k_Assembly_Contig_145_1	1243	2797
RFL 313	R0934F.300k_Assembly_Contig_59_1	1244	2798
RFL 313	R0932E.300k_Assembly_Contig_69_1	1245	2799
RFL 313	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_47_1	1246	2800
RFL 313	Primepii.300k_Assembly_Contig_69_1	1247	2801
RFL 313	Anapurna.300k_Assembly_Contig_56_1	1248	2802
RFL 313	R197.300k_Assembly_Contig_91_1	1249	2803
RFL 314	Anapurna.300k_Assembly_Contig_143_2	1250	2804
RFL 314	R197.300k_Assembly_Contig_169_2	1251	2805
RFL 314	R0932E.300k_Assembly_Contig_150_2	1252	2806
RFL 314	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_148_2	1253	2807
RFL 314	Primepii.300k_Assembly_Contig_147_2	1254	2808
RFL 314	R0934F.300k_Assembly_Contig_148_2	1255	2809
RFL 315	R197.300k_Assembly_Contig_129_2	1256	2810

RFL 315	R0934F.300k_Assembly_Contig_120_2	1257	2811
RFL 315	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_118_2	1258	2812
RFL 315	Primepii.300k_Assembly_Contig_123_2	1259	2813
RFL 315	Anapurna.300k_Assembly_Contig_102_2	1260	2814
RFL 315	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_79_2	1261	2815
RFL 315	R0932E.300k_Assembly_Contig_127_2	1262	2816
RFL 316	R197.300k_Assembly_Contig_208_2	1263	2817
RFL 317	R197.300k_Assembly_Contig_9_2	1264	2818
RFL 317	Anapurna.300k_Assembly_Contig_18_2	1265	2819
RFL 317	Primepii.300k_Assembly_Contig_5_2	1266	2820
RFL 317	R0934F.300k_Assembly_Contig_19_2	1267	2821
RFL 317	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_14_2	1268	2822
RFL 317	R0932E.300k_Assembly_Contig_16_2	1269	2823
RFL 318	Anapurna.300k_Assembly_Contig_57_1	1270	2824
RFL 319	Primepii.300k_Assembly_Contig_117_1	1271	2825
RFL 319	R0934F.300k_Assembly_Contig_123_1	1272	2826
RFL 320	R0932E.300k_Assembly_Contig_105_2	1273	2827
RFL 320	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_110_2	1274	2828
RFL 320	Anapurna.300k_Assembly_Contig_91_2	1275	2829
RFL 320	R197.300k_Assembly_Contig_87_2	1276	2830
RFL 320	R0934F.300k_Assembly_Contig_101_2	1277	2831
RFL 320	Primepii.300k_Assembly_Contig_98_2	1278	2832
RFL 321	R0934F.300k_Assembly_Contig_105_2	1279	2833
RFL 321	R0932E.300k_Assembly_Contig_84_2	1280	2834
RFL 321	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_89_2	1281	2835
RFL 321	R197.300k_Assembly_Contig_89_2	1282	2836
RFL 321	Primepii.300k_Assembly_Contig_78_2	1283	2837
RFL 321	Anapurna.300k_Assembly_Contig_65_2	1284	2838
RFL 322	R0934F.300k_Assembly_Contig_47_1	1285	2839
RFL 322	Primepii.300k_Assembly_Contig_15_1	1286	2840
RFL 323	R0932E.300k_Assembly_Contig_21_1	1287	2841
RFL 323	R0934F.300k_Assembly_Contig_25_1	1288	2842
RFL 323	R197.300k_Assembly_Contig_14_1	1289	2843
RFL 323	Anapurna.300k_Assembly_Contig_6_1	1290	2844
RFL 323	Primepii.300k_Assembly_Contig_20_1	1291	2845
RFL 323	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_8_1	1292	2846
RFL 324	Anapurna.300k_Assembly_Contig_178_1	1293	2847
RFL 324	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_116_1	1294	2848
RFL 324	R197.300k_Assembly_Contig_193_1	1295	2849
RFL 324	R0932E.300k_Assembly_Contig_191_1	1296	2850
RFL 324	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_184_1	1297	2851
RFL 324	Primepii.300k_Assembly_Contig_186_1	1298	2852
RFL 324	R0934F.300k_Assembly_Contig_188_1	1299	2853
RFL 325	Primepii.300k_Assembly_Contig_74_1	1300	2854
RFL 325	R197.300k_Assembly_Contig_107_1	1301	2855
RFL 325	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_81_1	1302	2856
RFL 325	R0934F.300k_Assembly_Contig_88_1	1303	2857

RFL 325	R0932E.300k_Assembly_Contig_115_1	1304	2858
RFL 325	Anapurna.300k_Assembly_Contig_76_1	1305	2859
RFL 326	R0932E.300k_Assembly_Contig_77_1	1306	2860
RFL 326	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_75_1	1307	2861
RFL 326	R197.300k_Assembly_Contig_103_1	1308	2862
RFL 326	R0934F.300k_Assembly_Contig_72_1	1309	2863
RFL 327	Primepii.300k_Assembly_Contig_192_1	1310	2864
RFL 327	R197.300k_Assembly_Contig_192_1	1311	2865
RFL 327	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_187_1	1312	2866
RFL 327	R0932E.300k_Assembly_Contig_190_1	1313	2867
RFL 327	R0934F.300k_Assembly_Contig_185_1	1314	2868
RFL 327	Anapurna.300k_Assembly_Contig_182_1	1315	2869
RFL 328	Primepii.300k_Assembly_Contig_95_1	1316	2870
RFL 328	R197.300k_Assembly_Contig_112_1	1317	2871
RFL 328	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_173_1	1318	2872
RFL 329	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_88_2	1319	2873
RFL 329	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_124_1	1320	2874
RFL 329	Anapurna.300k_Assembly_Contig_115_1	1321	2875
RFL 329	Primepii.300k_Assembly_Contig_122_1	1322	2876
RFL 329	R197.300k_Assembly_Contig_130_1	1323	2877
RFL 329	R0934F.300k_Assembly_Contig_114_1	1324	2878
RFL 330	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_141_2	1325	2879
RFL 330	R197.300k_Assembly_Contig_146_2	1326	2880
RFL 330	Primepii.300k_Assembly_Contig_155_1	1327	2881
RFL 330	Anapurna.300k_Assembly_Contig_138_2	1328	2882
RFL 330	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_92_1	1329	2883
RFL 330	R0934F.300k_Assembly_Contig_142_2	1330	2884
RFL 330	R0932E.300k_Assembly_Contig_146_2	1331	2885
RFL 331	R0932E.300k_Assembly_Contig_26_1	1332	2886
RFL 331	R197.300k_Assembly_Contig_41_1	1333	2887
RFL 331	R0934F.300k_Assembly_Contig_38_1	1334	2888
RFL 331	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_50_1	1335	2889
RFL 331	Primepii.300k_Assembly_Contig_45_1	1336	2890
RFL 331	Anapurna.300k_Assembly_Contig_45_1	1337	2891
RFL 332	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_72_1	1338	2892
RFL 333	R0934F.300k_Assembly_Contig_53_2	1339	2893
RFL 333	Primepii.300k_Assembly_Contig_28_2	1340	2894
RFL 333	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_49_2	1341	2895
RFL 333	R0932E.300k_Assembly_Contig_14_2	1342	2896
RFL 333	R197.300k_Assembly_Contig_53_2	1343	2897
RFL 333	Anapurna.300k_Assembly_Contig_55_2	1344	2898
RFL 334	R197.300k_Assembly_Contig_208_1	1345	2899
RFL 335	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_112_1	1346	2900
RFL 335	R0934F.300k_Assembly_Contig_130_1	1347	2901
RFL 335	R0932E.300k_Assembly_Contig_111_1	1348	2902
RFL 335	Anapurna.300k_Assembly_Contig_88_1	1349	2903
RFL 335	R0932E.300k_Assembly_Contig_206_1	1350	2904

RFL 336	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_18_1	1351	2905
RFL 337	R197.300k_Assembly_Contig_184_1	1352	2906
RFL 337	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_115_1	1353	2907
RFL 337	R0932E.300k_Assembly_Contig_188_1	1354	2908
RFL 337	Primepii.300k_Assembly_Contig_185_1	1355	2909
RFL 337	R0934F.300k_Assembly_Contig_186_1	1356	2910
RFL 337	Anapurna.300k_Assembly_Contig_173_1	1357	2911
RFL 337	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_182_1	1358	2912
RFL 338	Primepii.300k_Assembly_Contig_111_1	1359	2913
RFL 339	Anapurna.300k_Assembly_Contig_36_2	1360	2914
RFL 339	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_43_2	1361	2915
RFL 339	R0934F.300k_Assembly_Contig_35_2	1362	2916
RFL 339	R197.300k_Assembly_Contig_2_5	1363	2917
RFL 339	R0932E.300k_Assembly_Contig_49_2	1364	2918
RFL 339	Primepii.300k_Assembly_Contig_32_2	1365	2919
RFL 340	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_91_1	1366	2920
RFL 341	R0932E.300k_Assembly_Contig_118_1	1367	2921
RFL 341	R197.300k_Assembly_Contig_104_1	1368	2922
RFL 341	Anapurna.300k_Assembly_Contig_97_1	1369	2923
RFL 341	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_94_1	1370	2924
RFL 342	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_11_1	1371	2925
RFL 343	Primepii.300k_Assembly_Contig_179_1	1372	2926
RFL 344	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_128_1	1373	2927
RFL 345	R0932E.300k_Assembly_Contig_120_1	1374	2928
RFL 346	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_142_1	1375	2929
RFL 346	R197.300k_Assembly_Contig_153_1	1376	2930
RFL 346	Primepii.300k_Assembly_Contig_158_1	1377	2931
RFL 346	Anapurna.300k_Assembly_Contig_154_1	1378	2932
RFL 347	Anapurna.300k_Assembly_Contig_9_2	1379	2933
RFL 347	R0932E.300k_Assembly_Contig_10_2	1380	2934
RFL 347	R0934F.300k_Assembly_Contig_21_2	1381	2935
RFL 347	Primepii.300k_Assembly_Contig_48_2	1382	2936
RFL 347	R197.300k_Assembly_Contig_2_2	1383	2937
RFL 347	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_20_2	1384	2938
RFL 348	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_58_2	1385	2939
RFL 349	Primepii.300k_Assembly_Contig_45_2	1386	2940
RFL 349	R197.300k_Assembly_Contig_41_2	1387	2941
RFL 349	R0932E.300k_Assembly_Contig_26_2	1388	2942
RFL 349	R0934F.300k_Assembly_Contig_38_2	1389	2943
RFL 349	Anapurna.300k_Assembly_Contig_45_2	1390	2944
RFL 349	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_50_2	1391	2945
RFL 350	Anapurna.300k_Assembly_Contig_177_1	1392	2946
RFL 350	R0934F.300k_Assembly_Contig_184_1	1393	2947
RFL 350	R0932E.300k_Assembly_Contig_186_1	1394	2948
RFL 350	R197.300k_Assembly_Contig_187_1	1395	2949
RFL 350	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_181_1	1396	2950
RFL 351	R0934F.300k_Assembly_Contig_93_1	1397	2951

RFL 351	Primepii.300k_Assembly_Contig_88_1	1398	2952
RFL 352	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_68_1	1399	2953
RFL 353	R197.300k_Assembly_Contig_138_2	1400	2954
RFL 353	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_122_2	1401	2955
RFL 353	Anapurna.300k_Assembly_Contig_119_2	1402	2956
RFL 353	Primepii.300k_Assembly_Contig_131_2	1403	2957
RFL 353	R0932E.300k_Assembly_Contig_131_2	1404	2958
RFL 353	R0934F.300k_Assembly_Contig_113_2	1405	2959
RFL 354	R0932E.300k_Assembly_Contig_106_1	1406	2960
RFL 354	Anapurna.300k_Assembly_Contig_81_1	1407	2961
RFL 354	R197.300k_Assembly_Contig_88_1	1408	2962
RFL 354	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_114_1	1409	2963
RFL 354	R0934F.300k_Assembly_Contig_112_1	1410	2964
RFL 354	Primepii.300k_Assembly_Contig_103_1	1411	2965
RFL 355	Anapurna.300k_Assembly_Contig_133_1	1412	2966
RFL 356	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_91_2	1413	2967
RFL 357	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_56_1	1414	2968
RFL 357	Anapurna.300k_Assembly_Contig_60_2	1415	2969
RFL 357	Primepii.300k_Assembly_Contig_56_2	1416	2970
RFL 357	R0934F.300k_Assembly_Contig_60_1	1417	2971
RFL 357	R0932E.300k_Assembly_Contig_2_1	1418	2972
RFL 357	R197.300k_Assembly_Contig_60_1	1419	2973
RFL 358	R0934F.300k_Assembly_Contig_193_1	1420	2974
RFL 358	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_188_1	1421	2975
RFL 358	R197.300k_Assembly_Contig_197_1	1422	2976
RFL 358	Primepii.300k_Assembly_Contig_190_1	1423	2977
RFL 358	R0932E.300k_Assembly_Contig_194_1	1424	2978
RFL 358	Anapurna.300k_Assembly_Contig_184_1	1425	2979
RFL 359	Primepii.300k_Assembly_Contig_210_1	1426	2980
RFL 359	R0934F.300k_Assembly_Contig_208_1	1427	2981
RFL 360	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_153_1	1428	2982
RFL 360	R197.300k_Assembly_Contig_160_1	1429	2983
RFL 361	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_97_2	1430	2984
RFL 361	Primepii.300k_Assembly_Contig_91_2	1431	2985
RFL 361	R0932E.300k_Assembly_Contig_110_2	1432	2986
RFL 361	R0934F.300k_Assembly_Contig_86_2	1433	2987
RFL 361	Anapurna.300k_Assembly_Contig_101_2	1434	2988
RFL 361	R197.300k_Assembly_Contig_108_2	1435	2989
RFL 362	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_61_1	1436	2990
RFL 363	R0932E.300k_Assembly_Contig_31_1	1437	2991
RFL 363	R197.300k_Assembly_Contig_49_1	1438	2992
RFL 363	R0934F.300k_Assembly_Contig_41_1	1439	2993
RFL 363	Anapurna.300k_Assembly_Contig_40_1	1440	2994
RFL 363	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_27_1	1441	2995
RFL 363	Primepii.300k_Assembly_Contig_65_1	1442	2996
RFL 364	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_141_3	1443	2997
RFL 364	R197.300k_Assembly_Contig_146_3	1444	2998

RFL 364	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_92_2	1445	2999
RFL 364	Anapurna.300k_Assembly_Contig_138_3	1446	3000
RFL 364	R0934F.300k_Assembly_Contig_142_3	1447	3001
RFL 364	R0932E.300k_Assembly_Contig_146_3	1448	3002
RFL 364	Primepii.300k_Assembly_Contig_155_2	1449	3003
RFL 365	R0934F.300k_Assembly_Contig_5_3	1450	3004
RFL 365	Primepii.300k_Assembly_Contig_17_2	1451	3005
RFL 365	R197.300k_Assembly_Contig_5_2	1452	3006
RFL 366	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_144_1	1453	3007
RFL 366	Anapurna.300k_Assembly_Contig_148_1	1454	3008
RFL 366	Primepii.300k_Assembly_Contig_142_1	1455	3009
RFL 366	R0932E.300k_Assembly_Contig_147_1	1456	3010
RFL 366	R197.300k_Assembly_Contig_170_1	1457	3011
RFL 366	R0934F.300k_Assembly_Contig_168_1	1458	3012
RFL 367	R197.300k_Assembly_Contig_138_1	1459	3013
RFL 367	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_122_1	1460	3014
RFL 367	Anapurna.300k_Assembly_Contig_119_1	1461	3015
RFL 367	R0932E.300k_Assembly_Contig_131_1	1462	3016
RFL 367	Primepii.300k_Assembly_Contig_131_1	1463	3017
RFL 367	R0934F.300k_Assembly_Contig_113_1	1464	3018
RFL 368	R0932E.300k_Assembly_Contig_63_2	1465	3019
RFL 368	R197.300k_Assembly_Contig_35_2	1466	3020
RFL 368	Anapurna.300k_Assembly_Contig_170_2	1467	3021
RFL 368	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_61_2	1468	3022
RFL 369	Anapurna.300k_Assembly_Contig_159_1	1469	3023
RFL 369	R0932E.300k_Assembly_Contig_162_1	1470	3024
RFL 369	R197.300k_Assembly_Contig_165_1	1471	3025
RFL 369	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_138_1	1472	3026
RFL 369	R0934F.300k_Assembly_Contig_164_1	1473	3027
RFL 369	Primepii.300k_Assembly_Contig_168_1	1474	3028
RFL 370	R0932E.300k_Assembly_Contig_28_1	1475	3029
RFL 370	Primepii.300k_Assembly_Contig_26_1	1476	3030
RFL 370	Anapurna.300k_Assembly_Contig_7_1	1477	3031
RFL 371	Anapurna.300k_Assembly_Contig_117_1	1478	3032
RFL 371	R0932E.300k_Assembly_Contig_154_1	1479	3033
RFL 371	Primepii.300k_Assembly_Contig_134_1	1480	3034
RFL 372	R0932E.300k_Assembly_Contig_131_3	1481	3035
RFL 372	R0934F.300k_Assembly_Contig_113_3	1482	3036
RFL 373	Primepii.300k_Assembly_Contig_211_1	1483	3037
RFL 373	R197.300k_Assembly_Contig_206_1	1484	3038
RFL 373	R0934F.300k_Assembly_Contig_205_1	1485	3039
RFL 374	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_103_2	1486	3040
RFL 375	R0932E.300k_Assembly_Contig_42_2	1487	3041
RFL 375	Anapurna.300k_Assembly_Contig_46_2	1488	3042
RFL 375	R197.300k_Assembly_Contig_147_2	1489	3043
RFL 375	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_18_2	1490	3044
RFL 376	R0932E.300k_Assembly_Contig_119_3	1491	3045

RFL 376	R197.300k_Assembly_Contig_122_3	1492	3046
RFL 376	R0934F.300k_Assembly_Contig_108_3	1493	3047
RFL 376	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_116_3	1494	3048
RFL 376	Anapurna.300k_Assembly_Contig_103_3	1495	3049
RFL 376	Primepii.300k_Assembly_Contig_101_3	1496	3050
RFL 377	R0932E.300k_Assembly_Contig_74_2	1497	3051
RFL 378	R197.300k_Assembly_Contig_202_1	1498	3052
RFL 378	R0932E.300k_Assembly_Contig_197_1	1499	3053
RFL 378	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_196_1	1500	3054
RFL 378	Anapurna.300k_Assembly_Contig_187_1	1501	3055
RFL 378	R0934F.300k_Assembly_Contig_199_1	1502	3056
RFL 378	Primepii.300k_Assembly_Contig_205_1	1503	3057
RFL 379	Primepii.300k_Assembly_Contig_223_1	1504	3058
RFL 379	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_179_1	1505	3059
RFL 379	Anapurna.300k_Assembly_Contig_193_1	1506	3060
RFL 379	R0932E.300k_Assembly_Contig_178_1	1507	3061
RFL 380	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_85_1	1508	3062
RFL 381	R197.300k_Assembly_Contig_169_1	1509	3063
RFL 381	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_148_1	1510	3064
RFL 381	R0932E.300k_Assembly_Contig_150_1	1511	3065
RFL 381	Primepii.300k_Assembly_Contig_147_1	1512	3066
RFL 381	R0934F.300k_Assembly_Contig_148_1	1513	3067
RFL 381	Anapurna.300k_Assembly_Contig_143_1	1514	3068
RFL 382	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_109_1	1515	3069
RFL 383	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_111_1	1516	3070
RFL 383	R197.300k_Assembly_Contig_121_1	1517	3071
RFL 383	Primepii.300k_Assembly_Contig_113_1	1518	3072
RFL 384	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_117_1	1519	3073
RFL 385	Anapurna.300k_Assembly_Contig_167_1	1520	3074
RFL 385	R0932E.300k_Assembly_Contig_182_1	1521	3075
RFL 385	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_175_1	1522	3076
RFL 385	R0934F.300k_Assembly_Contig_172_1	1523	3077
RFL 385	Primepii.300k_Assembly_Contig_170_1	1524	3078
RFL 385	R197.300k_Assembly_Contig_175_1	1525	3079
RFL 386	Primepii.300k_Assembly_Contig_105_1	1526	3080
RFL 386	R0934F.300k_Assembly_Contig_56_1	1527	3081
RFL 387	Primepii.300k_Assembly_Contig_159_2	1528	3082
RFL 388	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_175_2	1529	3083
RFL 388	Anapurna.300k_Assembly_Contig_167_2	1530	3084
RFL 388	R0934F.300k_Assembly_Contig_172_2	1531	3085
RFL 388	Primepii.300k_Assembly_Contig_170_2	1532	3086
RFL 388	R0932E.300k_Assembly_Contig_182_2	1533	3087
RFL 388	R197.300k_Assembly_Contig_175_2	1534	3088
RFL 389	R0934F.300k_Assembly_Contig_74_1	1535	3089
RFL 389	Anapurna.300k_Assembly_Contig_64_1	1536	3090
RFL 389	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_70_1	1537	3091
RFL 389	Primepii.300k_Assembly_Contig_79_1	1538	3092

RFL 390	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_217_1	1539	3093
RFL 390	Anapurna.300k_Assembly_Contig_203_1	1540	3094
RFL 391	R197.300k_Assembly_Contig_159_2	1541	3095
RFL 391	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_146_2	1542	3096
RFL 391	Primepii.300k_Assembly_Contig_154_2	1543	3097
RFL 391	R0934F.300k_Assembly_Contig_144_2	1544	3098
RFL 391	Anapurna.300k_Assembly_Contig_152_2	1545	3099
RFL 391	R0932E.300k_Assembly_Contig_149_2	1546	3100
RFL 392	R0934F.300k_Assembly_Contig_118_2	1547	3101
RFL 392	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_82_2	1548	3102
RFL 393	Primepii.300k_Assembly_Contig_115_3	1549	3103
RFL 393	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_108_3	1550	3104
RFL 394	R0934F.300k_Assembly_Contig_222_1	1551	3105
RFL 395	Primepii.300k_Assembly_Contig_159_1	1552	3106
RFL 396	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_58_1	1553	3107
RFL 397	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_46_2	1554	3133

Таблица 7

Пример 3: картирование генов, кодирующих кандидатные белки Rf, в хромосомных интервалах, ассоциированных с восстановлением фертильности

А. Детальное картирование геномной области, содержащей генетические детерминанты Rf1

Три популяции картирования F2, выделенные для Rf1 (R197xKalahari, R204xAlixan и R0932ExAltigo), включающие 210, 218 и 212 образцов, соответственно, фенотипировали и генотипировали с помощью 18100 маркеров SNP с использованием внутренней платформы генотипирования Limagrain.

Тесты на фертильность проводились в закрытых помещениях в контролируемых условиях роста, либо в камерах роста, либо в теплицах, обеспечивая нормальную фертильность тестируемых растений пшеницы. Указанные показатели фертильности рассчитывали путем деления общего количества семян, обмолоченных от колоса, на количество подсчитанных колосьев. Проведенные t-тесты проводились путем сравнения показателей фертильности F1, полученных с помощью восстановителя, и показателей фертильности группы элитных инбредных линий, выращенных в тех же условиях.

Rf1 был впервые картирован на коротком плече хромосомы 1A между 4 и 10,9 cM на внутренней карте консенсусов Limagrain и физически разграничен маркерами SNP cfn1087371 и cfn0530841. Эти два маркера SNP определяют максимально возможный интервал, определяемый тремя группами картирования.

Впоследствии совместный анализ трех популяций картирования и фенотипирования отдельных рекомбинантных растений F2 на полученных семействах F3 подтвердил положение QTL и определил интервал Rf1 между 7 и 8,9 cM на внутренней

карте консенсусов Limagrain и физически разграничил маркерами SNP cfn1082074 и cfn0523990. Мы использовали геномные ресурсы сборки полного генома IWGSC, «IWGSC WGA» (доступна с июня 2016 года из банка URGI IWGSC), чтобы привязать локус к эталонной физической карте генома пшеницы. Левая граница (cfn1082074) была привязана к каркасу IWGSCWGAV02\_1AS\_scaffold44309, а правая граница (cfn0523990) была привязана к каркасу IWGSCWGAV02\_1AS\_scaffold47238.

Затем локус детально картировали путем скрининга 2976 и 3072 линий F3 из R197xKalahari и R204xAlixan, полученных из растений F2, гетерозиготных по локусу. Фенотипирование и анализ рекомбинантных растительных потомков в пределах интервала переопределили меньший интервал картирования между 7,5 и 8,8 сМ, ограниченный маркерами SNP cfn0522096 и cfn0527067 SNP на каркасе IWGSCWGAV02\_1AS\_scaffold44309 и каркасе IWGSCWGAV02\_1AS\_scaffold47 соответственно 38.

В. Детальное картирование геномной области, содержащей генетические детерминанты Rf3

Три популяции картирования F2 (TJB155xAnapurna, 2852xAltamira и AH46xR0946E), включающие 217, 135 и 246 образцов, соответственно, и популяции с двойным гаплоидом (DH) (H46xR934F), состоящие из 140 отдельных растений с сегрегацией по Rf3, фенотипировали, как описано в Примере 1, и генотипировали с использованием маркеров 18100 SNP с использованием внутренней платформы генотипирования Limagrain. Rf3 впервые картировали на коротком плече хромосомы 1В между 18,9 и 24,2 сМ на внутренней карте консенсусов Limagrain и физически разграничен маркерами SNP cfn0554333 и cfn0560679. Эти два маркера SNP разграничивают максимально возможный интервал, определяемый четырьмя популяциями картирования.

Впоследствии совместный анализ четырех популяций картирования и проверка фенотипа отдельных рекомбинантных растений F2/DH на полученных семействах F3 позволили подтвердить QTL, генетически разграниченный локус между 22,2 сМ и 22,7 сМ на внутренней карте консенсусов Limagrain и физически разграничили интервал Rf3 между маркерами SNP cfn0436720 и cfn0238384. Мы использовали геномные ресурсы сборки полного генома IWGSC, «IWGSC WGA» (доступна с июня 2016 года из хранилища URGI IWGSC), чтобы привязать локус к физической карте. Левая граница (cfn0436720) была закреплена на каркасе IWGSCWGAV02\_1BS\_scaffold35219, а правая граница (cfn0238384) закреплена на каркасе IWGSCWGAV02\_1BS\_scaffold5117.

Затем локус детально картировали путем скрининга 2496 и 672 растений из

растений TJB155xAnapurna и AN46xR0946E F2, гетерозиготных по локусу. Анализ рекомбинантных потомков растений F3 в пределах интервала переопределил меньший интервал картирования между 22,5 и 22,7 сМ, ограниченный маркерами SNP cfn1249269 и BS00090770 на каркасе IWGSCWGAV02\_1BS\_scaffold35219 и каркасе IWGSCWGAV02\_1BS\_scaffold5117, соответственно.

### С. Картирование геномной области, содержащей генетические детерминанты Rf7

Мы скрестили R197 и Primerii и затем получили популяцию из 176 растений от особей, которые были rf1 и rf3, то есть не являлись несущими аллели-восстановители в локусах Rf1 и Rf3. Растения генотипировали с помощью 18100 маркеров SNP с использованием внутренней платформы генотипирования Limagrain и фенотипировали, как описано в примере 1. Мы картировали locus Rf7 на хромосоме 7BL. Более того, данные внутреннего генотипирования, показывающие сильную генетическую дивергенцию, свидетельствуют о наличии экзотического хромосомного фрагмента, который стабильно передается из поколения в поколение. Мы идентифицировали большой QTL в диапазоне от 45 до 88 сМ на хромосоме 7B на внутренней карте консенсусов Limagrain с пиком 46,7 сМ (cfn0919993 с LOD баллом 3,37E-40). Первоначальный анализ рекомбинантных растений показывает, что ген Rf7 может быть расположен между маркерами cfn3407185 и W90K\_RAC875\_c33564\_120, ограничивающими интервал картирования 0,3 сМ между 46,7 и 47 сМ на внутренней карте консенсусов Limagrain.

### Пример 4: идентификация кандидатных ортологичных групп RFL

Для каждой из 282 групп RFL, определенных в примере 2, идентифицировали зарегистрированные ORF RFL (в дальнейшем называемые белковыми последовательностями), и общее количество последовательностей белка RFL привели для каждого учетного номера (Таблица 7, Таблица 8).

Будут приняты во внимание только следующие RFL кластеры:

1. Кластер RFL содержит представителей белка для всех семи образцов, а последовательности демонстрируют полиморфизм и/или различия в длине.
2. Кластер RFL содержит представителей только для этих образцов, генетическая характеристика которых указала, что они могут содержать один и тот же ген или гены Rf.

Таблицы 8A, 9A, 10 и 11 демонстрируют списки ортологичных групп RFL, коррелирующих соответственно с генами Rf1, Rf3, Rf7 и Rf-Rye-6R после первого скрининга. Известно, что T. timopheevii является фертильным и, как следствие, восстанавливает T-CMS. Эта линия добавлена сюда, поскольку она может содержать любой из целевых генов Rf1, Rf3, Rf7 или Rf-rye.

Наконец, только ортологичные группы RFL, картирующие хромосомный интервал в эталонном геноме пшеницы *Triticum aestivum* Chinese Spring, рассматриваются в качестве кандидатов для дальнейшего анализа. Эти ортологичные группы RFL будут выбраны в качестве «кандидатных групп Rf».

Картирование осуществили с помощью инструмента tblastn из пакета BLAST + ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastDocs&DOC\\_TYPE=Download](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=Download)). Специфические параметры (-evalue 1e-25 -best\_hit\_score\_edge 0,05 -best\_hit\_overhang 0,25) использовали для сохранения всех лучших результатов.

#### А. Результаты для образцов Rf1:

В Таблице 8А показаны ортологичные группы RFL, содержащие, по меньшей мере, одну последовательность, захваченную из образца, отличающегося тем, что он несет ген Rf1 (R197, R0932E и *T. timopheevii*). Картирование, описанное в примере 3, позволяет отбросить ортологичные группы RFL, картированные вне хромосомного интервала, генетически ассоциированного с фертильностью Rf1 на коротком плече хромосомы 1А. Таким образом, четыре кластера RFL (79, 104, 185 и 268) идентифицировали как потенциально соответствующие белку Rf, кодируемому геном Rf1.

Все белковые последовательности из группы RFL185 содержат ~ 500 аминокислот и только 8,5 PPR-мотивов. Как правило, полноразмерные функциональные белки RFL должны содержать 15-20 PPR-мотивов. Кроме того, последний мотив PPR RFL185 состоит только из 15 аминокислот. Это указывает на то, что RFL185 является укороченным. RFL268 также укорочен (382 аминокислоты). Детальный анализ последовательности показал, что RFL185 и RFL268 являются остатками одного и того же гена, который был разделен сдвигом рамки. Таким образом, оба белка вряд ли будут функциональными.

Следовательно, RFL79 и RFL104 считаются лучшими кандидатными группами Rf для Rf1.

Генотип CMS	Закрепитель	Rf3	Rf1+Rf7	Rf1	Rf3	Восстановитель из интрогрессии Rye	Восстановитель	Картирование
Ген RFL	ANAPURNA	PRUEPII	R197	R0932E	R0934F	Wheat-Rye-6R	<i>Triticum timopheevii</i>	Расположен в интервале картирования Rf1
RFL1	0	0	1	1	0	0	0	НЕТ
RFL 56			1	1	0	0	1	НЕТ
RFL59	0	1	1	2	0	0	1	НЕТ
RFL73	0	0	1	1	0	0	1	НЕТ
RFL74	0	0	3	4	3	0	0	НЕТ
RFL79	0	0	1	1	1	0	1	ДА
RFL93	0	0	1	1	0	0	0	НЕТ
RFL104	0	0	1	1	1	0	1	ДА
RFL129	0	0	1	1	1	0	0	НЕТ
RFL1B5	0	0	1	1	1	0	1	ДА
RFL26B	0	0	1	1	1	0	1	ДА

Таблица 8А: Отбор RFL на основе информации образцов CMS для Rf1.

Из Таблицы 8А можно отметить, что единственным образцом, в котором отсутствуют последовательности Rf1, в этих кандидатных группах Rf, является образец R0934F.

RFL 79	Кластер 79	Длина	Название ORF
0	0	808 ак	R197.300k_Assembly_Contig_120_1
1	1	808 ак	R0932E.300k_Assembly_Contig_103_1
2	2	808 ак	R0934F.300k_Assembly_Contig_80_1
3	3	808 ак	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_57_1
RFL 104	Кластер 104	Длина	Название ORF
0	0	757 ак	R197.300k_Assembly_Contig_72_1
1	1	757 ак	R0932E.300k_Assembly_Contig_82_1
2	2	757 ак	R0934F.300k_Assembly_Contig_69_1
3	3	757 ак	Triticum timopheevii.300k_Assembly_Contig_35_1

В Таблице 8В представлены белки в кандидатных группах Rf 79 и 104.

Последовательности ДНК, полученные из контигов, идентифицированных в примере 2 и кодирующих белки RFL из кандидатных групп Rf 79 и 104, были выровнены с помощью программного обеспечения BWA-MEM (Li H. and Durbin R., 2010). Было отмечено, что эти последовательности отличаются в 5'-области UTR в R0934F по сравнению с R0932E и R197. Одна из гипотез состоит в том, что последовательности ДНК

в R0934F были сгенерированы в результате рекомбинации между последовательностями ДНК из кандидатных групп Rf 79 и 104. Эта рекомбинированная последовательность может не функционировать в R0934F, поскольку известно, что эта линия несет только Rf3.

#### В. Результаты для образцов Rf3:

Такое же обоснование, что и для образцов Rf1, было применено к образцам (Primerii и R0934F), отличающимся тем, что они несут ген Rf3. Таблица 9А демонстрирует, что ортологичные группы RFL 67, 89, 140, 166 и 252 являются кандидатными группами Rf для белка Rf, кодируемого Rf3, так как они содержат белки, идентифицированные в Primerii и R0934, два образца, охарактеризованные как несущие ген-восстановитель Rf3, и которые расположены в картированном генетическом интервале на коротком плече хромосомы 1В.

Генотип CMS	Закрепитель Rf3		Rf1+Rf7 Rf1		Rf3	Восстановитель из интрогрессии Rye	Восстановитель	Картирование
Ген RFL	ANAPURNA	PRIMEPII	R197	R0932E	R0334F	Wheat-Rye-6R	<i>Triticum timopheevii</i>	Расположен в интервале картирования Rf3
RFL22	0	1	0	0	1	0	0	НЕТ
RFL67	0	4	0	0	3	0	0	ДА*
RFL89	0	2	0	0	1	0	0	ДА
RFL140	0	1	0	0	1	0	0	ДА
RFL142	0	1	0	0	1	0	0	НЕТ
RFL164	0	1	0	0	1	0	0	НЕТ
		1	0	0	1	0	0	НЕТ
RFL166	0	1	0	0	1	0	0	ДА
RFL227	0	1	0	0	1	0	0	НЕТ
RFL252	0	1	0	0	1	0	0	ДА

Таблица 9А: отбор кластеров RFL на основе информации CMS зародышевой плазмы для Rf3

Чтобы получить исчерпывающий анализ для отбора кандидатов Rf3, все 282 кластера RFL были тщательно проанализированы с точки зрения количества RFL, их длины и их происхождения в отношении информации о генотипе Rf3. Кластеры RFL, состоящие из последовательностей RFL из нескольких образцов, были подвергнуты скринингу на белковые последовательности полной длины, происходящие только из генотипов Primerii и R0934F, и частичные/более короткие последовательности из генотипов, не несущих Rf3. Этот анализ позволил выявить четыре дополнительных Rf3-кандидатных кластера RFL: RFL28, RFL29, RFL60 и RFL170.

RFL 28	Кластер 28	Rf3	
0	0	323 ак	Anapurna.300k_Assembly_Contig_2_3
1	1	479 ак	Anapurna.300k_Assembly_Contig_2_2
2	2	857 ак	Primepii.300k_Assembly_Contig_13_1
3	3	323 ак	R197.300k_Assembly_Contig_10_3
4	4	479 ак	R197.300k_Assembly_Contig_10_2
5	5	479 ак	R0932E.300k_Assembly_Contig_23_2
6	6	323 ак	R0932E.300k_Assembly_Contig_23_3
7	7	857 ак	R0934F.300k_Assembly_Contig_17_1
8	8	323 ак	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_7_3
9	9	479 ак	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_7_2
RFL 29	Кластер 29	Rf3	
0	0	828 ак	Primepii.300k_Assembly_Contig_67_1
1	1	828 ак	R0934F.300k_Assembly_Contig_78_1
3	2	536 ак	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_77_2
4	3	295 ак	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_77_1
RFL 60	Кластер 60	Rf3	
0	0	828 ак	Primepii.300k_Assembly_Contig_94_1
1	1	287 ак	R197.300k_Assembly_Contig_95_1
2	2	828 ак	R0934F.300k_Assembly_Contig_73_2
4	3	809 ак	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_48_2
RFL 170	Cluster 170	Rf3	
0	0	219 ак	Anapurna.300k_Assembly_Contig_174_3
1	1	560 ак	Primepii.300k_Assembly_Contig_60_2
2	2	369 ак	R197.300k_Assembly_Contig_94_2
3	3	560 ак	R0934F.300k_Assembly_Contig_67_2
4	4	369 ак	Wheat-Rye-6R.300k_Assembly_Contig_113_2

Таблица 9В: подробная информация о белках, присутствующих в кластере RFL 28, 29, 60 и 170, включая длину белка (ак = аминокислоты) и название.

Таблица 9В демонстрирует, что:

В кандидатной группе RFL 28 последовательности из генотипов Rf3 (Primerii и R0934F) имеют длину 857 аминокислот, тогда как последовательности из всех других зародышевых плазм (не-Rf3) укорочены (размеры находятся в диапазоне от 323 до 479 аминокислот) и, таким образом, наиболее вероятно являются нефункциональными.

В кандидатной группе RFL 29 последовательности из образцов Rf3 (Primerii и R0934F) имеют длину 828 аминокислот, тогда как последовательности из всех других (не Rf3) зародышевых плазм укорочены и, таким образом, наиболее вероятно, нефункциональны.

В кандидатной группе RFL 60 последовательности в генотипах, не относящихся к Rf3 (R197 и R0932E), либо отсутствуют (R0932E), либо считаются нефункциональными из-за их аминокислотной длины (287 аминокислот). Последовательности из генотипов Rf3 Primerii и R0934F, основанные на их длине последовательности, представляются полноразмерными и функциональными. Кроме того, наш анализ картирования локализовал кластер RFL60 в интервале Rf3.

В кластере RFL 170 последовательности из генотипов Rf3 (Primerii и R0934F) значительно больше (560 аминокислот), чем последовательности генотипов, отличных от Rf3, которые выглядят укороченными (менее 370 аминокислот) и считаются нефункциональными. Наш подробный анализ последовательности показал, что RFL170 на самом деле является второй ORF, в дополнение к RFL 288, кодируемой тем же контигом. Обе ORF происходят из одного и того же гена RFL, в котором непрерывность была нарушена сдвигом рамки.

С. Образцы Rf7 и Rf-rye:

Такое же обоснование, как и для анализа образцов, несущих Rf1 и Rf3, было применено к образцам, несущим ген-восстановитель Rf7 (R197 и *T. timopheevii*). Ген Rf7 был картирован на хромосоме 7BL.

В Таблице 10 показано, что RFL 80, 128 и 191 являются кандидатными группами Rf для белка Rf, кодируемого геном Rf7, поскольку белки, присвоенные этим кластерам, были обнаружены только в R197 или *T. timopheevii*.

Что касается гена-восстановителя, который происходит в результате интрогрессии хромосомы 6R ржи в геном пшеницы, кластеры, состоящие из отдельных белков, происходящих из линии-восстановителя Wheat-Rye-6R, считаются хорошими кандидатами для Rye-6R-специфического гена-восстановителя. Эти критерии верны для

ортологичных групп RFL 46, 87 и 208, перечисленных в Таблице 6. Из-за их высокой дивергенции последовательности по сравнению с последовательностями *Triticum* эти гены являются отличными кандидатами для генов-восстановителей, происходящих из ржи.

Генотип CMS	Закрепитель	Rf3	Rf1+Rf7	Rf1	Rf3	Восстановитель из интрогрессии Rye	Восстановитель	Картирование
Ген RFL	ANAPURNA	PRIMEPII	R197	R0932E	R0934F	Wheat- Rye-6R	<i>Triticum timopheevii</i>	Расположен в интервале картирования Rf7
RFL43	0	0	2	0	0	0	2	НЕТ
RFL63	0	0	2	0	0	0	1	НЕТ
RFL::	0	0	1	0	0	0	0	Не картирован
RFL:-	0	0	2	0	0	0	1	НЕТ
RFL125	0	0	1	0	0	0	2	НЕТ
RFL12B	0	0	1	0	0	0	0	Не картирован
RFL174	0	0	1	0	0	0	2	НЕТ
RFL191	0	0	1	0	0	0	0	Не картирован

Таблица 10: выбор RFL на основе информации CMS зародышевой плазмы для Rf7

Генотип CMS	Закрепитель	Rf3	Rf1+Rf7	Rf1	Rf3	Восстановитель из интрогрессии Rye	Восстановитель
Ген RFL	ANAPURNA	PRIMEPII	R197	R0932E	R0934F	Wheat-Rye-6R	<i>Triticum timopheevii</i>
RFL46	0	0	0	0	0	1	0
RFL87	0	0	0	0	0	1	0
RFL208	0	0	0	0	0	1	0

Таблица 11: выбор RFL на основе информации CMS зародышевой плазмы для Rf-rye

Пример 5: клонирование кандидатных генов для восстановления фертильности *T. timopheevii* CMS

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая любой из белков RFL из кандидатной группы Rf, может быть использована для клонирования и трансформации. Однако в настоящем эксперименте для целей клонирования и трансформации преимущественно использовали последовательность ДНК, кодирующую самый длинный белок RFL, который характеризовался как имеющий стартовый кодон, последовательность митохондриального нацеливания и число мотивов PPR от 15 до 20. Если, по меньшей мере, два самых длинных белка RFL имеют одинаковую длину, нуклеиновая кислота, кодирующая такой белок RFL и представляющая самую длинную последовательность 5'-UTR, будет предпочтительно выбрана для выполнения стадий клонирования и трансформации.

Последовательность Wheat-Rye-6R RFL46, полученная из Wheat-Rye-6R.300k\_Assembly\_Contig\_35\_1, была оптимизирована для предоставления SEQ ID NO: 3115. Эту последовательность клонировали посредством реакции «Golden Gate» в целевую бинарную плазмиду pBIOS10746, между конститутивным промотором убиквитина *Zea mays* (proZmUbi, представленным в SEQ ID NO: 3134), с интроном убиквитина *Zea mays* (intZmUbi, представленным в SEQ ID NO: 3109). Christensen et al., 1992) и 3'-концевой последовательности гена, кодирующего белок теплового шока сорго (регистрационный номер: Sb03g006880); Последовательность терминации, названная terSbHSP, представлена в SEQ ID NO: 3110. Последовательность рекомбинантной конструкции представлена в SEQ ID NO: 3125.

Как и выше, последовательность TaRFL104 (полученная из R0932E.300k\_Assembly\_Contig\_82\_1), последовательность TaRFL67 (полученная из Primepii.300k\_Assembly\_Contig\_2\_1), последовательность TaRFL79 (полученная из R197.300k\_Assembly\_Contig\_120\_1), и последовательность TaRFL89 (полученная из R0934F.300k\_Assembly\_Contig\_99\_1) адаптировали для целей клонирования, как представлено, соответственно, в SEQ ID NO: 3117 до 3120. Эти последовательности клонировали с помощью реакции Golden Gate в целевую бинарную плазмиду pBIOS10746. Последовательности рекомбинантных конструкций, соответственно, представлены в SEQ ID NO: 3131, 3128, 3129 и 3130.

Последовательность TaRFL104 (представлена в SEQ ID NO: 3117) была клонирована с помощью реакции фермента рестрикции между нативным промотором *Triticum aestivum* (proTaRFL104, SEQ ID NO: 3113) и 3'-концевой последовательностью гена, кодирующего *Triticum aestivum* RFL104 (terTaRFL104, представленного в SEQ ID NO: 3112), в целевую бинарную плазмиду pBIOS10747. Последовательность рекомбинантной конструкции представлена в SEQ ID NO: 3126.

Последовательность TaRFL79 (представлена в SEQ ID NO: 3119) была клонирована посредством реакции фермента рестрикции между нативным промотором *Triticum aestivum* (proTaRFL79, SEQ ID NO: 3123) и 3'-последовательностью терминации кодирующей последовательности гена *T. aestivum* RFL79 (terTaRFL79 представлена в SEQ ID NO: 3124), в целевую бинарную плазмиду pBIOS10747. Последовательность рекомбинантной конструкции представлена в SEQ ID NO: 3122.

Последовательность Wheat-Rye RFL46 также клонировали посредством реакции фермента рестрикции между нативным промотором *Triticum aestivum* (proTaRFL46, SEQ ID NO: 3114) и 3'-последовательностью терминации кодирующей последовательности гена *Triticum aestivum* RFL46 (terTaRFL46 представлен в SEQ ID NO: 3111), в целевую

бинарную плазмиду pBIOS10747. Для этой конструкции последовательность Wheat-Rye RFL46 извлекается из кодирующей последовательности Wheat-Rye-6R.300k\_Assembly\_Contig\_35\_1 и модифицируется для целей клонирования без каких-либо стадий оптимизации. Кодирующая последовательность представлена в SEQ ID NO: 3116. Последовательность рекомбинантной конструкции представлена в SEQ ID NO: 3127.

Векторы двойного назначения pBIOS10746 и pBIOS10747 являются производными от бинарного вектора pMRT (WO2001018192A3).

Все описанные выше бинарные плазмиды трансформировали в *Agrobacterium* EHA105.

Пример 6: фенотипирующий анализ трансформации и восстановления фертильности

Для скрининга кандидатных генов, участвующих в восстановлении фертильности, разработали сорт пшеницы BGA\_Fielder\_CMS, содержащий как цитоплазматическую мужскую стерильность, так и высокий потенциал трансформации и восстановления. Сорта пшеницы BGA\_Fielder\_CMS трансформировали штаммами *Agrobacterium*, полученными в примере 5, по существу, как описано в WO 2000/063398. Трансгенные объекты пшеницы генерировали для каждой конструкции, описанной выше.

Для конструкции, содержащей RFL46, трансформацию также проводили с использованием сорта Fielder.

Все трансгенные растения пшеницы, полученные в примере 6, и контрольные фертильные растения выращивали в теплице при стандартных условиях роста пшеницы (16 ч светлого периода при 20 °C и 8 ч темного периода при 15 °C с постоянной 60% влажностью) до тех пор, пока контрольные зерна сорта Fielder не достигали стадии зрелости.

Фертильность трансгенных растений оценивали путем подсчета количества семян и пустой колосовой чешуи на колос на каждом растении и сравнения с контрольными растениями Fielder и BGA\_Fielder\_CMS дикого типа. Растения также оценивали путем наблюдения за экстрезией пыльника.

Было проанализировано 16 трансформированных растений CMS-Fielder со сверхэкспрессией последовательности RFL79, представленной в SEQ ID NO: 361 (как указано в таблице 7) под промотором ZmUbi, полученным из 11 независимых событий трансформации.

Все растения обеспечивали восстановление мужской фертильности, в то время как 100% нетрансформированных растений CMS-Fielder, выращенных параллельно, полностью стерильны, без экстрезии пыльников и семян, а 100% растений WT-Fielder

являются фертильными.

Эти результаты подтверждают, что RFL79 может восстанавливать фертильность растения CMS-T и что генетическая трансформация CMS-Fielder является эффективной системой для проверки функции генов восстановителей фертильности.

Пример 7: клонирование промотора гена Rf, анализы трансформации и GUS:

Последовательность бета-глюкуронидазы *E.coli* (EcGUS) оптимизировали (как представлено в SEQ ID NO: 3121) и клонировали с помощью реакции фермента рестрикции между нативным промотором *Triticum aestivum* (proTaRFL46, SEQ ID NO: 3114) и 3'-последовательностью терминации кодирующей последовательности гена *T. aestivum* RFL46 (terTaRFL46, представленной в SEQ ID NO: 3111), в целевую бинарную плазмиду pBIOS10743 с образованием pBIOS11468.

Сорта пшеницы Fielder трансформировали этими штаммами *Agrobacterium*, по существу, как описано в WO 2000/063398. Трансгенные объекты пшеницы генерировали для каждой конструкции, описанной выше.

После стадии загрузки вплоть до введения, головки и цветочные органы иссекали и инкубировали в растворе X-Gluc (Jefferson, 1987) при 37 °C в течение 16 часов для оценки экспрессии GUS.

Пример 8: идентификация полноразмерных генов RFL PPR, потенциально участвующих в восстановлении фертильности Rf4

Второй захват был достигнут с использованием набора различных образцов по сравнению с захватом, выполненным в примере 2. Были использованы следующие образцы:

- Две линии-закрепителя (Anapurna, Fielder)
- Образец *T. Timopheevii*, описанный в примере 2
- Четыре образца, идентифицированные как линии-восстановители CMS типа *T. timopheevii* и характеризуются наличием локуса восстановителя Rf4: L13, R113, 17F3R-0377 и GSTR435.

- Образцы-восстановители Rf1, Rf3 и Rf7, для которых характерно отсутствие локуса-восстановителя Rf4: R197, R0934F.

GSTR435 получен из интрогрессии *Aegilops speltaoides* в *Triticum aestivum* и доступен в USDA (<https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx>). Три других образца, R113 (доступен через Австралийский зерновой генобанк: 90819), L13 (доступен через Австралийский зерновой генобанк: 90821) и 17F3R-0377 (получен из R113), все получены в результате интрогрессии *Triticum timopheevi* в *Triticum aestivum*.

Конструкцию приманки и гибридизацию с фрагментами ДНК из образцов

проводили, как в примере 2. Затем подмножество из 100К пар считываемых фрагментов из каждого образца картировали с группами RFL, идентифицированными в таблице 7, с использованием Novoalign (версия 3.04.06, <http://www.novocraft.com/products/novoalign/>) с установками, позволяющими выполнять несколько сравнений с идентичностью приблизительно 97% (опции: -t все -t 240). Среднее покрытие по RFL затем рассчитывали с использованием утилит Bedtools (версия 2.26.0, <http://github.com/ark5x/bedtools2>) coverBed (опция: -d) и groupBy (опции: -o значение).

Оценивали относительный охват всех RFL со считываемыми фрагментами из каждого образца. Была проведена оценка первого ранжирования RFL по их охвату с использованием считываемых фрагментов из образцов, полученных из *T. timopheevii*. Рассматривались только группы RFL, не имеющие покрытия (значение от 0 до 10) со считываемыми фрагментами из «не-Rf» (закрепитель) или не-Rf4, но имеющие значительный охват (значение > 30) со считываемыми фрагментами из Rf4. На Фигуре 3 показан список этих групп RFL, потенциально соответствующих гену Rf4.

Также оценивали перекрытие с образцом GSTR43. На Фигуре 3 показано, что только RFL120 демонстрирует значительное перекрытие в образце GSTR435, хотя и меньше, чем для других образцов. Это можно объяснить большим филогенетическим расстоянием между *T. aestivum* и *Aegilops speltaoides*, чем между *T. aestivum* и *T. timopheevii*.

Чтобы дополнительно исследовать последовательности, относящиеся к группе RFL120, затем в две стадии собирали карты считываний с RFL120 для каждого образца Rf4. Первая стадия состояла из объединения перекрывающихся пар считываемых фрагментов с использованием `bbmerge.sh` из пакета BBMAP (версия 36.59 <https://sourceforge.net/projects/bbmap/>) и сборка их с помощью `tadwrapper.sh` из того же пакета (параметры : `k = 150,180,22,240,270,300,330,360,390,420,450` пополам = `t`). Контиги из первой стадии дедуплицировали с помощью инструмента `dedupe.sh` также из того же пакета и передавали другой программе-сборщику, SPADES (версия 3.10.1 <http://bioinf.spbau.ru/spades>), как «доверенные контиги» вместе со всеми считанными парами из одного и того же образца (опции: `--cov-cutoff 5 -careful`) для получения окончательной сборки образца. Затем для каждого образца был проведен поиск наилучшего сравнения последовательности белка RFL120 (SEQ ID NO: 477, как представлено в таблице 7) с использованием `tblastn` из пакета BLAST + (версия 2.2.30 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> /`Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=Download`) с использованием настроек по умолчанию.

В итоге были определены следующие последовательности для включения в группу

RFL120:

RFL120-R113, которая представлена в SEQ ID NO: 3138 и кодируется SEQ ID NO: 3142, RFL120-L13, которая представлена в SEQ ID 3137 и кодируется SEQ ID NO: 3141, RFL120-17F3R-0377, которая представлена в SEQ ID NO: 3135 и кодируется SEQ ID NO: 3139, и, наконец, RFL120-GSTR 435 (называемый в данном документе как RFL120-spelt), которая представлена в SEQ ID NO: 3136 и кодируется SEQ ID NO: 3140.

Выравнивание вышеуказанных аминокислотных или нуклеотидных последовательностей с соответствующими последовательностями из RFL120, названными в данном документе «RFL120\_timo» и приведенными в SEQ ID NO: 477 и SEQ ID NO: 2031 (см. Таблицу 7), показывает, что RFL120-17F3R-0377 укорочена. Что касается RFL120-R113 и RFL120-L13, обе нуклеотидные последовательности идентичны RFL120-timo, за исключением того, что они, соответственно, на 357 и 349 нуклеотидов длиннее в области 5'UTR.

На Фигурах 4a и 4b показано соответственно выравнивание между нуклеотидной и аминокислотной последовательностями RFL120-spelt с RFL120-timo. Это показывает, что нуклеотидная последовательность RFL120-timo на 95% идентична последовательности «RFL120\_spelt», что объясняет низкое перекрытие, ранее наблюдавшееся с GSTR435 на Фигуре 3.

В заключение, результаты подтверждают, что группа RFL120 является самым сильным кандидатом для Rf4.

Пример 9: анализы клонирования, трансформации и восстановления фертильности

Следуя тем же способам, которые описаны в примерах 5 и 6, нуклеотидные последовательности RFL120-timo, RFL120-spelt, RFL120-R113 и RFLK120-L13, при необходимости, оптимизировали для обеспечения надлежащей экспрессии в пшенице и адаптировали для целей клонирования.

Эти последовательности клонировали посредством реакции Golden Gate в целевую бинарную плазмиду pBIOS10746, между конститутивным промотором убиквитина *Zea mays* (proZmUbi, изображенным в SEQ ID NO: 3134), с интроном убиквитина *Zea mays* (intZmUbi, представленным в SEQ ID NO: 3109). Christensen et al., 1992), и 3'-последовательностью терминации кодирующей последовательности гена белка теплового шока сорго (регистрационный номер: Sb03g006880); Последовательность терминации, названная terSbHSP, представлена в SEQ ID NO: 3110.

Анализ трансформации и фертильности проводили, как в Примере 6.

Пример 10: Оценка фертильности линий-восстановителей Rf3 CMS T. timopheevii

Одиннадцать элитных линий пшеницы, классифицированных как несущих ген-

восстановитель Rf3, известный своей вовлеченностью в восстановление цитоплазматической мужской стерильности T-типа у *Triticum timopheevii* (T-CMS), оценивали по их способности восстанавливать цитоплазму T-CMS и охарактеризовали по генотипу фертильности. Были изучены гибриды, полученные в результате скрещивания между стерильной линией пшеницы CMS, используемой в качестве материнской формы, и данной пшеничной линией-восстановителем, используемой в качестве донора пыльцы, в отношении их способности производить зерно. Элитные линии включали как коммерчески доступные линии, такие как Altigo, Aristote, Cellule, Altamira, Rubisko, Primerii или Premio, так и собственные линии Limagrain (Таблица 12). Кроме того, в исследование были включены Chinese Springlines (Таблица 12).

Тесты на фертильность проводили в закрытом помещении, либо в ростовой камере, либо в теплице, в контролируемых условиях роста, позволяющих обеспечить нормальную экспрессию фенотипа фертильности тестируемых растений пшеницы. Растения выращивали при освещенности в течение 16 часов и при температуре от 20 до 25 °C и в темноте в течение 8 часов при температуре от 15 до 20 °C и влажности от 50 до 70%. Наблюдаемое восстановление фертильности пыльцы может быть частичным или полным.

Показатель фертильности растений пшеницы F1, несущих цитоплазму T-CMS, может быть рассчитан путем деления общего количества семян, обмолоченных с колоса, на количество подсчитанных колосьев и может быть сравнен с показателями фертильности группы контрольных фертильных растений, которые в этом исследовании состоят из элитных инбредных линий с нормальной цитоплазмой пшеницы, выращенных на той же площади и в тех же агроэкологических условиях. Предпочтительно, чтобы такая панель линий содержала набор, по меньшей мере, из 5 элитных инбредных линий. Кроме того, предпочтительно, чтобы в данном эксперименте оценивались, по меньшей мере, 10 колосьев от отдельного растения F1.

Балл фертильности  $i$  выше нуля ( $> 0$ ) указывает на то, что растение приобрело частичное или полное восстановление фертильности. Для каждого показателя фертильности проводится статистический тест для получения р-значения. Примерами статистических тестов являются дисперсионный анализ или сравнения средних значений. Р-значение ниже 5% порога будет указывать, что эти два распределения статистически различны. Следовательно, значительно более низкий показатель фертильности тестируемого растения пшеницы по сравнению с показателем фертильности контрольного растения является показателем того, что растение F1 не приобрело полного восстановления фертильности (то есть частичное восстановление). Существенно похожий или более высокий показатель фертильности свидетельствует о том, что растение F1

приобрело полное восстановление фертильности. Указанные показатели фертильности рассчитывали путем деления общего количества семян, обмолоченных от колоса, на количество подсчитанных колосьев.

T-тесты проводились путем сравнения показателей фертильности растений F1, несущих ген-восстановитель Rf3, и показателей фертильности группы элитных инбредных линий, выращенных в тех же условиях (633 колоска из 37 зимних и весенних элитных линий;  $\mu = 2,36$ ,  $\alpha = 0,59$ ).

Результаты, представленные в Таблице 12, показывают, что у гибридов CMS есть два типа частичного восстановителя фертильности Rf3. Тот, который может называться «Rf3» и баллы фертильности которого находятся в диапазоне от 1 до 1,8, и второй тип, называемый «Rf3 слабый», баллы фертильности которого меньше 1. Например, CMS-гибриды, полученные с Primerii, дали средний показатель фертильности 1,7 зерна/колоска на 10 отдельных колосьев F1 (фенотип «Rf3»), в то время как гибриды, полученные с Altigo, дали средний показатель фертильности 0,7 зерна/колоска на 47 отдельных колосьев F1 (фенотип «Rf3 слабый») (Таблица 12). С помощью генетического картирования и отбора с помощью маркеров различные линии Chinese Spring были показаны как несущие locus-восстановитель Rf3 (данные не показаны). CMS-гибриды, изготовленные с использованием линий Chinese Spring, оценивали по баллу фертильности. Они показывают средний балл фертильности 0,6 зерна/колоска и фенотип «слабый Rf3».

Таблица 12. Используемые в исследовании элитные линии пшеницы и баллы фертильности CMS-гибридов, полученных с помощью их пыльцы.

Элитный сорт	Генотип	Фенотип	Количество анализируемых колосков	Показатель фертильности	STD
CHINESE SPRING	RFL29b	Rf3 слабый	20	0,6	0,7
ALTIGO	RFL29b	Rf3 слабый	47	0,7	0,5
ARISTOTE	RFL29b	Rf3 слабый	43	0,8	0,8
CELLULE	RFL29a	Rf3	10	1,2	1,0
ALTAMIRA	RFL29a	Rf3	20	1,5	1,1
PREMIO	RFL29a	Rf3	12	1,2	1,0
PRIMERII	RFL29a	Rf3	10	1,7	0,8
R0946E	RFL29a	Rf3	35	1,8	0,6
RUBISKO	RFL29a	Rf3	7	1,2	0,6
TJB155	RFL29a	Rf3	27	1,7	0,7
АТОМО	RFL29c	Закрепитель	22	0,0	0,0
КОНТРОЛИ ЭЛИТНЫХ СОРТОВ			633	2,4	0,6

\* NA: не доступно, STD: стандартное отклонение

Пример 11: Сравнение генотипов между анализируемыми линиями-восстановителями Rf3

Захват гена RFL был достигнут с помощью образцов, перечисленных в Таблице 12, как описано в Примере 2. Для каждого RFL, идентифицированного в Примере 4B, для сравнения выравнивали соответствующие последовательности белка из каждого образца.

Результаты показывают, что для RFL29, RFL164 и RFL166 существует сильная связь между фенотипом и генотипом. Для RFL29 идентифицировали три разных аллеля, обозначенных как «a», «b» и «c», а два разных аллеля «a» и «b» идентифицированы либо для RFL164, либо для RFL166. Все образцы с фенотипом «Rf3» несут аллели RFL29a, RFL164a и RFL166a, в то время как все образцы со слабым Rf3 несут аллели RFL29b, RFL166b и RFL164b в своем генотипе.

Для RFL29, линия-закрепитель *Atomo* характеризуется наличием двух укороченных ORF, вероятно, из-за мутации сдвига рамки, RFL29c\_1 и RFL29c\_2, кодирующих белки, состоящие из 258 и 535 аминокислот, соответственно. Эта форма генотипа присутствует только в линиях-закрепителях (данные не показаны).

На Фигуре 5A показано выравнивание белковых последовательностей RFL29a, RFL29b, RFL29c\_1 и RFL29c\_2. На Фигуре 5B и 5C, соответственно, показаны выравнивания белковых последовательностей RFL164a и RFL164b (изображено в SEQ ID NO: 3144) и RFL166a и RFL166b (представлена в SEQ ID NO: 3145).

Пример 12: анализы клонирования, трансформации и восстановления фертильности

Следуя тем же способам, которые описаны в Примерах 5 и 6, нуклеотидные последовательности RFL29a (представленные в SEQ ID NO: 3146 или SEQ ID NO: 1712 и кодирующие последовательность, идентичную SEQ ID NO: 158), RFL 29b (представлена в SEQ ID NO: 3149 и кодирующая последовательность, идентичная SEQ ID NO: 3143), RFL164a (представлена в SEQ ID NO: 3147 или SEQ ID NO: 2230 и кодирующая последовательность, идентичная SEQ ID NO: 676) и RFL166a (представлена в SEQ ID NO: 3148 или SEQ ID NO: 2238 и кодирующая последовательность, идентичную последовательности SEQ ID NO: 684), клонированы посредством реакции Golden Gate в целевую бинарную плазмиду pBIOS10746 между конститутивным промотором убиквитина *Zea mays* (proZmUbi, представленным в SEQ ID NO: 3134) с интроном убиквитина *Zea mays* (intZmUbi, представленным в SEQ ID NO: 3109, Christensen et al. 1992) и 3'-последовательностью терминации кодирующей последовательности гена белка теплового шока сорго (регистрационный номер: Sb03g006880 terSbHSP, представлена в SEQ ID NO: 3110). Последовательности каждой из рекомбинантных конструкций соответственно представлены в SEQ ID NO: 3150, SEQ ID NO: 3151, 3152 и 3153.

Аналогично, последовательности RFL29a и RFL29b клонировали в ниже по

последовательности от их эндогенного промотора pRFL29a (представлен в SEQ ID NO: 3154) и pRFL29b (представлен в SEQ ID NO: 3155) и терминаторной последовательностью terSbHSP. Последовательности каждой рекомбинантной конструкции соответственно представлены в SEQ ID NO: 3156 и SEQ ID NO: 3157.

Наконец, две другие кассеты получали таким же образом, как описано ранее, за исключением того, что используются соответствующие эндогенные терминаторные последовательности terRFL29a (представленные в SEQ ID NO: 3160) и terRFL 29b (представленные в SEQ ID NO: 3161). Соответствующие экспрессирующие кассеты соответственно изображены в SEQ ID NO: 3158 и SEQ ID NO: 3159. Анализы трансформации и фертильности проводили, как в примере 6.

Пример 13: сравнение последовательностей 5'UTR гена, кодирующего RFL29a и RFL29b

Чтобы проанализировать, можно ли объяснить изменение уровня фертильности изменением уровня экспрессии гена, 5'UTR-последовательность гена RFL29a выделяли из ВАС, сгенерированных из линии TJB155 (таблица 12), классифицированной как «Rf3», а 5'UTR последовательности RFL29b идентифицировали по Chinese Spring, классифицированной как линия «Rf3weak» (сборка IWGSC RefSeq v1.0).

Выравнивание 5'UTR областей, идентифицированных в генах RFL29a и RFL29b, показано на Фигуре 6.

Сравнение последовательностей показывает, что последовательность 5'UTR гена RFL29a содержит делецию области длиной 163 п.н., идентифицированной в 5'UTR соответствующей последовательности RFL29b (SEQ ID NO: 3174). Часть этой области была идентифицирована в заявке на патент WO2018015403 как предположительно участвующая в миРНК-опосредованной репрессии экспрессии гена PPR, идентифицированного ниже.

Сравнение последовательностей между различными образцами, перечисленными в Таблице 12, показывает, что все образцы «Rf3weak» содержат 163 п.н., а все образцы «Rf3» содержат делецию 163 п.н.

Ожидается, что из-за делеции 163 п.н. в последовательности 5'UTR гена RFL29a область 163 п.н. нарушает экспрессию гена RFL29b, так что уровень фертильности в линиях, несущих аллель RFL29b, является слабым по сравнению с линиями, несущими аллель RFL29a.

Пример 14: анализы клонирования, трансформации и фертильности с удаленным промотором TaRFL29b

Следуя тем же методам, что и в Примере 5, нуклеотидную последовательность

RFL29b экспрессировали под модифицированным промотором pRFL29b~~del~~ (представлен в SEQ ID NO: 3162), который несет делецию области 163 п.н. от нуклеотида 1876 до нуклеотида 2038 из промоторной последовательности RFL29b, представленной в SEQ ID NO: 3155. Используется последовательность терминации, *terSbHSP*, представленная в SEQ ID NO: 3110. Рекомбинантная конструкция представлена в SEQ ID NO: 3163.

Трансформация линии пшеницы CMS \* Fielder (которая не относится ни к «Rf3», ни к «слабому Rf3») выполняется, как в Примере 6, за исключением того, что добавлены следующие контроли: все линии фенотипа «Rf3», как указано в Таблице 12, все из линий со «слабым Rf3», перечисленных в Таблице 12, и, наконец, трансформированные линии с кассетой, несущей промотор pTaRFL29b перед RFL29b, как описано в Примере 12.

Пример 15. Модификация эндогенного промотора RFL29b по технологии CRISPR для восстановления линий со «слабым Rf3» в линии «Rf3»:

Чтобы увеличить экспрессию RL29b, в промоторе RFL29b проводили разные делеции 163 п.н. с использованием эндонуклеазы для сайт-направленного мутагенеза.

В Таблице 13 представлены различные эндонуклеазы с ассоциированным мотивом PAM и соответствующими последовательностями-мишенями.

На Фигуре 7 показано положение различных последовательностей-мишеней вокруг и внутри области 163 п.н., идентифицированной для разных эндонуклеаз. Разработанные направляющие последовательности, которые можно использовать в комбинации для выполнения делеции в области 163 п.н., перечислены в Таблице 13.

Таблица 13

Эндонуклеазы	Целевой ID	Название мишени	Направляющая последовательность
LbCPF1	23	LbCpf1-100-Target-23	TAATTTCTACTAAGTG TAGATCGAGCGGAGGGA GTACTAGATAA (SEQ ID NO: 3175)
LbCPF1	42	LbCpf1-100-Target-42	TAATTTCTACTAAGTG TAGATGGAACGGAGGGA GTATTATCTAG (SEQ ID NO: 3176)
LbCPF1	67	LbCpf1-100-Target-67	TAATTTCTACTAAGTG TAGATAGATAGCTAGAA AGACAATTATT (SEQ ID NO: 3177)
LbCPF1	71	LbCpf1-100-Target-71	TAATTTCTACTAAGTG TAGATTTTGAGATAGCTA GAAAGACAAT (SEQ ID NO: 3178)
SpCAS9	14	SpCas9-100-Target-14	TGACAAGTATTTCCGAGCGGGTTTTAGAGCTAG AAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTT T (SEQ ID NO: 3179)
SpCAS9	54	SpCas9-100-Target-54	GACAATTATTTAGGAACGGAGTTTTAGAGCTAG AAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTT T (SEQ ID NO: 3180)
SpCAS9	55	SpCas9-100-	AGACAATTATTTAGGAACGGGGTTTTAGAGCTAG

		Target-55	AAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTT T(SEQ ID NO: 3181)
SpCAS9	58	SpCas9-100- Target-58	GAAAGACAATTATTTAGGAAGTTTTAGAGCTAG AAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTT T(SEQ ID NO: 3182)
SpCAS9	63	SpCas9-100- Target-63	AGCTAGAAAGACAATTATTTGTTTTAGAGCTAG AAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTT T(SEQ ID NO: 3183)
SpCAS9	155	SpCas9-100- Target-155	TTTCAACAAATGACTACATAGTTTTAGAGCTAG AAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTT T(SEQ ID NO: 3184)
SpCAS9	179	SpCas9-100- Target-179	CTCTAGAGAGACAATTATTTGTTTTAGAGCTAG AAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTT T(SEQ ID NO: 3185)
SpCAS9	184	SpCas9-100- Target-184	GAGAGACAATTATTTAGGAAGTTTTAGAGCTAG AAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTT T(SEQ ID NO: 3186)

Нуклеотидную последовательность, кодирующую эндонуклеазу LbCpf1, оптимизировали (как представлено в SEQ ID NO: 3164) и клонировали с помощью реакции Golden Gate в целевую бинарную плазмиду pBIOS10746 между конститутивным промотором убиквитина *Zea mays* (proZmUbi, в SEQ ID NO: 3134) с интроном убиквитина *Zea mays* (intZmUbi, представленным в SEQ ID NO: 3109, Christensen et al. 1992) и в 3' области, NLS-последовательностью ядерного импорта мыши (как показано в SEQ ID NO: 3172) и 3'-последовательностью терминации terZmHSP, представленной в SEQ ID NO: 3170.

Нуклеотидную последовательность, кодирующая эндонуклеазу SpCas9, оптимизировали (как представлено в SEQ ID NO: 3165) и клонировали с помощью реакции Golden Gate в целевую бинарную плазмиду pBIOS10746, в 3'-область от конститутивного промотора убиквитина *Zea mays* (proZmUbi, представленного в SEQ ID NO: 3134) с интроном убиквитина *Zea mays* (intZmUbi, представлен в SEQ ID NO: 3109, Christensen et al. 1992) и последовательностью SV40NLS (как представлено в SEQ ID NO: 3173) и выше по последовательности от последовательности NLS ядерного импорта мыши и 3'-последовательности терминации terAtNos, представленной в SEQ ID NO: 3171.

Каждая направляющая последовательность клонируется между промотором pTaU6 (представлен в SEQ ID NO: 3168) и последовательностью терминации TerRNApolIII (представлена в SEQ ID NO: 3169).

Каждая кассета, экспрессирующая эндонуклеазу, клонируется последовательно с

кассетой, экспрессирующей соответствующую направляющую последовательность. Рекомбинантная кассета, экспрессирующая LbCpf1 и направляющие последовательности, направленные на мишень -23 и мишень -71, представлена в SEQ ID NO: 3167. Рекомбинантная кассета, экспрессирующая SpCas9 и направляющие последовательности, направленные на мишень -58 и мишень -54, представлена в SEQ ID NO: 3166.

Трансформацию выполняют так же, как в Примере 6, за исключением того, что все «Rf3 слабые» линии, перечисленные в Таблице 12, трансформируются. Анализы на фертильность для отбора линий с фенотипом «Rf3» проводили, как в Примере 14.

#### Пример 16: Оценка фертильности линий-восстановителей CMS *T. timopheevii*

Некоторые элитные линии пшеницы обладают способностью частично восстанавливать фертильность цитоплазматической мужской стерильности *Triticum timopheevii* (T-CMS). Гибрид, образованный между стерильной линией CMS пшеницы, взятой в качестве материнской формы, и линией восстановления пшеницы, взятой в качестве отцовской формы, может давать зерно. Коммерческие линии, такие как Allezy, Altamira, Altigo, Aristote, Osado, Cellule или Premio и Limagrain, были протестированы на их способность восстанавливать T-CMS. Все линии также были охарактеризованы по генотипу фертильности.

Тесты на фертильность проводились в помещении, либо в камере роста, либо в теплице, в контролируемых условиях роста, обеспечивающих нормальное проявление фертильности тестируемых растений пшеницы. Указанные показатели фертильности рассчитывали путем деления общего количества семян, обмолоченных от колоса, на количество подсчитанных колосьев. Проведенные t-тесты проводили путем сравнения показателей фертильности F<sub>1</sub>s, полученных с восстановителем, и показателей фертильности группы элитных инбредных линий, выращенных в тех же условиях (633 колоска из 37 зимних и весенних элитных линий;  $\mu = 2,36$ ,  $\alpha = 0,59$ ).

Результаты в Таблице 14 показывают, что эти линии действуют как частичные восстановители фертильности в гибриде CMS. Например, гибриды, изготовленные с использованием Allezy, дают среднюю фертильность в 0,99 зерно/колос по сравнению с 33 отдельными колосками F<sub>1</sub>. Эта естественная способность частично восстанавливать фертильность CMS *T. timopheevii* была ранее идентифицирована у таких образцов пшеницы, как Primerii или Maris Hunstmann (Bahl and Maan, 1973), и это подтверждается нашими собственными внутренними данными (см. Таблицу 14). Помимо этого, предположительно внутреннего источника восстановления пшеницы, гибридизация между *Triticum timopheevii* и *Triticum aestivum*, проведенная Wilson (Wilson and Ross 1962), способствовала введению в пшеницу других генов-восстановителей, локализация

хромосомных плеч которых была идентифицирована с помощью моносомического анализа (Bahl and Maan, 1973; Maan and al, 1984).

После этих первоначальных работ во всем мире было реализовано множество селекционных программ, направленных на создание линий-восстановителей для T-CMS, таких как TJB155 (коллекция мелких зерновых культур BBSRC: 2072–2075), способность к восстановлению также подтверждается нашими собственными внутренними данными (Таблица 14).

L13 (доступный через Австралийский банк генов зерновых культур: 90821), представляет собой линию для восстановления пшеницы, выбранную из R113 (доступную через Австралийский банк генов зерновых культур: 90819), которая несет аллель восстановителя Rf4. Она дает низкий уровень восстановления фертильности при скрещивании с линиями CMS (в среднем 0,85 семян/колос). При сравнении с показателями фертильности группы элитных линий, выращенных в одинаковых условиях, выясняется, что ни один из протестированных предполагаемых восстановителей не делает возможным полное восстановление фертильности гибрида (значения  $p < 0,05$ . Таблица 14).

Таблица 14 также показывает, что линии-восстановители, несущие два разных Rf-локуса, не способны полностью восстановить стерильность, вызванную T-CMS. Поэтому все протестированные линии-восстановители с одним или двумя локусами Rf являются только частичными линиями-восстановителями T-CMS.

	Гаплотипы	Колосья	Фертильность	Станд. Откл.	P-значение
ALLEZY	Rf3	33	0,99	0,89	3,00E-33
ALTAMIRA	Rf3	20	1,48	1,1	4,00E-10
ALTIGO	Rf3	47	0,71	0,55	1,00E-63
ARISTOTE	Rf3	37	1	0,73	3,00E-37
CELLULE	Rf3	10	1,25	0,99	5,00E-09
MARISHUNSTMANN	Rf3	16	1,26	0,88	7,00E-13
OSADO	Rf3	9	1,52	0,68	2,00E-05
PREMIO	Rf3	12	1,21	1,03	8,00E-11
PRIMEPII	Rf3	51	1,55	0,75	2,00E-19
TJB155	Rf3	27	1,7	0,66	2,00E-08
R204	Rf1+Rf7	59	2,09	0,51	6,00E-04
L13	Rf4	12	0,85	0,38	4,00E-18
R0929D	Rf3+Rf7	18	1,83	0,62	1,63E-04
R0936T	Rf1+Rf3	4	1,76	0,11	4,06E-02
Элитные инбредные линии		633	2,36	0,59	

Таблица 14: средние показатели фертильности и стандартное отклонение от указанного количества колосьев. В первом столбце указано название мужской линии, взятой в качестве опылителя для скрещивания F1. Все представленные данные (кроме

элитных инбредных линий) взяты из созданных скрещиваний F1 между перечисленными линиями и тестируемым образцом CMS. Данные «элитные инбредные линии» относятся к панели, состоящей из 37 зимних и весенних элитных линий. Был проведен t-тест, сравнивающий среднее значение фертильности для каждого из скрещиваний F1 со средним значением показателей фертильности на панели из 633 колосьев элитных инбредных линий, несущих фертильную цитоплазму.

Пример 17: Детальное картирование геномной области, содержащей Rf1, Rf3, и генетическое картирование генетических детерминант Rf4 и Rf7:

А. Детальное картирование геномной области, содержащей генетические детерминанты Rf1

Три популяции картирования F2, выделенные для Rf1 (R197xKalahari, R204xAlihan и R0932ExAltigo), включающие 210, 218 и 212 образцов, соответственно, были фенотипированы, как описано в примере 1, и генотипированы с помощью 18100 маркеров SNP с использованием внутренней платформы генотипирования Limagrain. Фертильность линий R204 и R197 генетически ассоциирована с локусом Rf1 и Rf7. Фертильность в линии R0932E ассоциирована с локусом Rf1.

Rf1 был впервые картирован на коротком плече хромосомы 1A между 4 и 10,9 cM на внутренней карте консенсусов Limagrain и физически разграничен маркерами SNP cfn1087371 и cfn0530841. Эти два маркера SNP разграничивают максимально возможный интервал, определяемый тремя группами картирования (см. Фигуру 8).

После этого совместный анализ трех популяций картирования и фенотипирования отдельных рекомбинантных растений F2 на полученных семействах F3 подтвердил положение QTL и определил интервал Rf1 между 7 и 8,9 cM на внутренней карте консенсусов Limagrain и физически разграничил маркерами SNP cfn1082074 и cfn0523990. Мы использовали геномные ресурсы сборки полного генома IWGSC, «IWGSC WGA» (доступна с июня 2016 года из банка URGI IWGSC), чтобы привязать локус к эталонной физической карте генома пшеницы. Левая граница (cfn1082074) была привязана к каркасу IWGSCWGAV02\_1AS\_scaffold44309, а правая граница (cfn0523990) была привязана к каркасу IWGSCWGAV02\_1AS\_scaffold47238.

Затем мы решили увеличить размеры популяции для точного картирования локуса и провели скрининг линий F3 2976 и 3072 из R197xKalahari и R204xAlihan, полученных из гетерозиготных растений F2 в локусе, соответственно. Фенотипирование и анализ рекомбинантного потомства растений в пределах интервала переопределили меньший интервал картирования между 7,5 и 8,8 cM, ограниченный маркерами SNP cfn0522096 и cfn0527067 SNP на каркасе IWGSCWGAV02\_1AS\_scaffold44309 и каркасе

IWGSCWGAV02\_1AS\_scaffold47, соответственно.

В. Детальное картирование геномной области, содержащей генетические детерминанты Rf3

Три популяции картирования F2 (TJB155xAnapurna, 2852xAltamira и AN46xR0946E), включающие 217, 135 и 246 образцов, соответственно, и популяции с двойным гаплоидом (DH) (H46xR934F), состоящие из 140 отдельных растений, сегрегирующих по Rf3, были фенотипированы, как описано в примере 1, и были генотипированы с использованием 18100 маркеров SNP с использованием внутренней платформы генотипирования Limagrain. Источниками локуса Rf3 являются TJB155, Altamira и R0946E.

Rf3 был впервые картирован на коротком плече хромосомы 1В между 18,9 и 24,2 сМ на внутренней карте консенсусов Limagrain и физически разграничен маркерами SNP cfn0554333 и cfn0560679. Эти два маркера SNP определяют максимально возможный интервал, определяемый четырьмя популяциями картирования (см. Фигуру 9).

Затем, совместный анализ четырех популяций картирования и проверка фенотипа отдельных рекомбинантных растений F2/DH на полученных семействах F3 подтвердил QTL, генетически разграничил локус между 22,2 сМ и 22,7 сМ на внутренней карте консенсусов Limagrain и физически разграничил Rf3 интервал между маркерами SNP cfn0436720 и cfn0238384. Мы использовали геномные ресурсы сборки полного генома IWGSC, «IWGSC WGA» (доступно с июня 2016 года из хранилища URGI IWGSC), чтобы привязать локус к физической карте. Левая граница (cfn0436720) была закреплена на каркасе IWGSCWGAV02\_1BS\_scaffold35219, а правая граница (cfn0238384) закреплена на каркасе IWGSCWGAV02\_1BS\_scaffold5117.

Затем мы решили увеличить размеры популяции для точного картирования локуса и провели скрининг 2496 и 672 растений из растений-гетерозигот F2, полученных из TJB155xAnapurna и AN46xR0946E. Анализ рекомбинантных потомков растений F3 в пределах интервала переопределил меньший интервал картирования между 22,5 и 22,7 сМ, ограниченный маркерами SNP cfn1249269 и BS00090770 на каркасе IWGSCWGAV02\_1BS\_scaffold35219 и каркасе IWGSCWGAV02\_1BS\_scaffold5117, соответственно.

С. Картирование геномной области, содержащей генетические детерминанты Rf7

Мы скрестили R197 (содержащий Rf1 и Rf7 локус) и Primerii (содержащий Rf3 локус) и затем получили популяцию из 176 растений из образцов, которые были rf1 и rf3, что означает отсутствие переносчиков аллелей-восстановителей в локусах Rf1 и Rf3. Растения генотипировали с помощью 18100 маркеров SNP с использованием внутренней

платформы генотипирования Limagrain и фенотипировали, как описано в примере 1. Мы картировали локус Rf7 на хромосоме 7BL. Более того, данные внутреннего генотипирования, показывающие сильную генетическую дивергенцию, свидетельствуют о наличии экзотического хромосомного фрагмента, который стабильно передается через поколение. Мы идентифицировали большой QTL в диапазоне от 45 до 88 сМ на хромосоме 7B на внутренней карте консенсусов Limagrain с пиком 46,7 сМ (cfn0919993 с LOD баллом 3,37E-40). Первая экспертиза рекомбинантных растений показывает, что ген Rf7 может быть расположен между маркерами cfn3407185 и W90K\_RAC875\_c33564\_120, ограничивающими интервал картирования 0,3 сМ между 46,7 и 47 сМ на карте внутреннего консенсуса Limagrain.

#### D. Картирование геномной области, содержащей генетическую детерминанту Rf4

Популяцию картирования из скрещивания между АН46 и L13 (содержащая локус Rf4), состоящая из 124 отдельных растений, остортированных по Rf4, генотипировали с помощью 18100 маркеров SNP с использованием внутренней платформы генотипирования Limagrain и фенотипировали, как описано в примере 1. QTL, который мы назвали Rf4, был идентифицирован на хромосоме 6B между 0 и 65 сМ на внутренней карте консенсусов Limagrain с пиком на 43,3 сМ (cfn0393953 с LOD баллом 1,08E-13). Более того, данные внутреннего генотипирования, показывающие сильную генетическую дивергенцию, свидетельствуют о наличии экзотического хромосомного фрагмента, который стабильно передается через поколение. Ожидается, что скорость рекомбинации будет очень низкой в этой хромосомной области, и, следовательно, любой маркер, связанный с cfn0393953, считается ассоциированным с локусом Rf4.

Пример 18: Идентификация SNP, ассоциированного с генами Rf, и его применение в MAS

Мы создали библиотеку ВАС с линией ДН, включающей аллели Rf1, Rf3 и Rf7. Эта библиотека использовалась для идентификации клонов ВАС в интервалах QTL Rf1 и Rf3. Более конкретно, мы идентифицировали и секвенировали и генетически подтвердили 3 клон ВАС в области Rf1 и 3 клон ВАС в области Rf3. Последовательности ВАС сравнивали с эталонным геномом Chinese Spring для обнаружения SNP. Затем мы насыщали интервалы картирования Rf1 и Rf3, добывая доступные SNP из общедоступных геномных ресурсов и недавно обнаруженные SNP из секвенированных клонов ВАС.

Скрининг на полиморфные и информативные маркеры SNP на панели разнообразия, состоящей из 83 элитных растений пшеницы и известных-восстановителей для Rf1, Rf3, Rf4 и Rf7, выявил набор тесно связанных маркеров, локализованных внутри или в непосредственной близости от областей картирования интервалов Rf1, Rf3, Rf4 и

Rf7. Эти маркеры SNP можно использовать отдельно и/или в гаплотипе для отбора Rf или rf растений в схемах скрещивания MAS (Фигура 10А и Фигура 11А). Все данные, последовательности маркеров и информация о праймере представлены в Таблице 15. Затем, выбирали меньшие наборы из 2-3 маркеров высокого качества, чтобы следовать признакам в схемах скрещивания MAS.

Например, идентификация присутствия локуса Rf1 в геноме растения достигается с помощью маркера 276I13\_96B22\_97797 или 104A4\_105588 (Фигура 10А и В).

Аналогично, идентификация присутствия локуса Rf3 в геноме растения достигается с помощью маркера 136H5\_3M5\_7601 или 136H5\_3M5\_89176 (Фигура 11А, 11В, 11С, 11D и Таблица 15). Тем не менее, любой маркер, указанный на Фигуре 11А, можно использовать для отличия линий-закрепителей от линий-восстановителей, если они полиморфны в зародышевой плазме. Например, в Таблице 16 наличие или отсутствие локуса Rf3 достигается с помощью маркера cfn1246088 или IWB72107.

Идентификация присутствия локуса Rf7 в геноме растения достигается с помощью маркеров cfn0917304, cfn0919993 и cfn0920459 (Таблица 17). В этом случае 3 маркера могут быть использованы в гаплотипе, чтобы отличить растения-восстановители от растений-закрепителей. Таким образом, гаплотип TGC идентифицирует растения-восстановители.

Наконец, идентификация присутствия локуса Rf4 в геноме растения достигается с помощью маркеров cfn0393953 и cfn0856945 (Таблица 18).

Код	R: восстановитель/ M: закрепитель	Rf аллели	136H5 3M5 7601	136H5 3M5 89176
LGWR16-0016	R	гомозиготный Rf3	T	A
LGWR16-0026	R	гомозиготный Rf3	T	A
ALTAMIRA	R	гомозиготный Rf3	T	A
CELLULE	R	гомозиготный Rf3	T	A
TJB155	R	гомозиготный Rf3	T	A
ALLEZY	R	гомозиготный Rf3	T	A
PREMIO	R	гомозиготный Rf3	T	A
PRIMEPI	R	гомозиготный Rf3	T	A
AIGLE	M	гомозиготный rf3	C	G
AIRBUS	M	гомозиготный rf3	C	G
ALHAMBRA	M	гомозиготный rf3	C	G
ALIXAN	M	гомозиготный rf3	C	G
AMADEUS	M	гомозиготный rf3	C	G
ANAPURNA	M	гомозиготный rf3	C	G
APACHE	M	гомозиготный rf3	C	G
ARKEOS	M	гомозиготный rf3	C	G
ARLEQUIN	M	гомозиготный rf3	C	G
ARTDECO	M	гомозиготный rf3	C	G
ARTURNICK	M	гомозиготный rf3	C	G
ATOMO	M	гомозиготный rf3	C	G
AVENUE	M	гомозиготный rf3	C	G
CEZANNE	M	гомозиготный rf3	C	G
CROISADE	M	гомозиготный rf3	C	G
FRUCTIDOR	M	гомозиготный rf3	C	G
GAZUL	M	гомозиготный rf3	C	G
HERMANN	M	гомозиготный rf3	C	G
HORATIO	M	гомозиготный rf3	C	G
KALAHARI	M	гомозиготный rf3	C	G

Таблица 15: Гаплотипы ряда линий-восстановителей и линий-закрепителей в локусе Rf3 для 2 маркеров SNP. Эти 2 маркера SNP позволяют полностью отличить линии-закрепители от линий-восстановителей (включая элитные линии Altamira, Cellule, Premio и образцы TJB155 и Primepi).

Код	R: восстановитель/ M: закрепитель	Rf аллели	cfm1246088	IWB72107
ALTIGO	R	гомозиготный Rf3	A	A
ARISTOTE	R	гомозиготный Rf3	A	A
OSADO	R	гомозиготный Rf3	A	A
AIGLE	M	гомозиготный rf3	C	G
AIRBUS	M	гомозиготный rf3	C	G
ALHAMBRA	M	гомозиготный rf3	C	G
ALIXAN	M	гомозиготный rf3	C	G
AMADEUS	M	гомозиготный rf3	C	G
ANAPURNA	M	гомозиготный rf3	C	G
APACHE	M	гомозиготный rf3	C	G
ARKEOS	M	гомозиготный rf3	C	G
ARLEQUIN	M	гомозиготный rf3	C	G
ARTDECO	M	гомозиготный rf3	C	G
ARTURNICK	M	гомозиготный rf3	C	G
ATOMO	M	гомозиготный rf3	C	G
AVENUE	M	гомозиготный rf3	C	G
CEZANNE	M	гомозиготный rf3	C	G
CROISADE	M	гомозиготный rf3	C	G
FRUCTIDOR	M	гомозиготный rf3	C	G
GAZUL	M	гомозиготный rf3	C	G
HERMANN	M	гомозиготный rf3	C	G
HORATIO	M	гомозиготный rf3	C	G
KALAHARI	M	гомозиготный rf3	C	G

Таблица 16: Гаплотипы ряда линий-восстановителей и линий-закрепителей в локусе Rf3 для 2 маркеров SNP. Эти 2 маркера SNP позволяют полностью отличить линии-восстановители от линий-восстановителей.

Код	R: восстановитель/М: закрепитель	Rf аллели	cfn0917304	cfn0919993	cfn0920459
LGWR16-0016	R	ГОМОЗИГОТНЫЙ Rf1, Rf3, Rf7	T	G	C
LGWR16-0026	R	ГОМОЗИГОТНЫЙ Rf1, Rf3, Rf7	T	G	C
AIGLE	M	ГОМОЗИГОТНЫЙ rf1, rf3, rf7	G	-	G
AIRBUS	M	ГОМОЗИГОТНЫЙ rf1, rf3, rf7	T	G	G
ALHAMBRA	M	ГОМОЗИГОТНЫЙ rf1, rf3, rf7	G	T	G
ALIXAN	M	ГОМОЗИГОТНЫЙ rf1, rf3, rf7	T	T	C
AMADEUS	M	ГОМОЗИГОТНЫЙ rf1, rf3, rf7	G	G	C
ANAPURNA	M	ГОМОЗИГОТНЫЙ rf1, rf3, rf7	G	T	G
APACHE	M	ГОМОЗИГОТНЫЙ rf1, rf3, rf7	G	T	C
ARKEOS	M	ГОМОЗИГОТНЫЙ rf1, rf3, rf7	G	T	G
ARLEQUIN	M	ГОМОЗИГОТНЫЙ rf1, rf3, rf7	G	G	C
ARTDECO	M	ГОМОЗИГОТНЫЙ rf1, rf3, rf7	G	-	G
ARTURNICK	M	ГОМОЗИГОТНЫЙ rf1, rf3, rf7	T	T	G
ATOMO	M	ГОМОЗИГОТНЫЙ rf1, rf3, rf7	T	T	G
AVENUE	M	ГОМОЗИГОТНЫЙ rf1, rf3, rf7	T	T	C
CEZANNE	M	ГОМОЗИГОТНЫЙ rf1, rf3, rf7	G	T	G
CROISADE	M	ГОМОЗИГОТНЫЙ rf1, rf3, rf7	G	T	C
FRUCTIDOR	M	ГОМОЗИГОТНЫЙ rf1, rf3, rf7	G	T	G

GAZUL	M	гомозиготный rf1, rf3, rf7	-	G	C
HERMANN	M	гомозиготный rf1, rf3, rf7	T	G	G
HORATIO	M	гомозиготный rf1, rf3, rf7	G	-	G
KALAHARI	M	гомозиготный rf1, rf3, rf7	G	-	G

Таблица 17: Гаплотипы в локусе Rf7 для линий-восстановителей LGWR16-0016 и LGWR16-0026 и для ряда линий-закрепителей. «-»-Баллы соответствуют доминантным маркерам без усиления в нескольких линиях-закрепителях.

Код	R: восстановитель/M: закрепитель	Rf аллели	cfn0393953	cfn0856945
LGWR16-0016	M	гомозиготный rf4	T	T
LGWR16-0026	M	гомозиготный rf4	T	T
AIGLE	M	гомозиготный rf4	T	T
AIRBUS	M	гомозиготный rf4	T	T
ALHAMBRA	M	гомозиготный rf4	T	T
ALIXAN	M	гомозиготный rf4	T	T
AMADEUS	M	гомозиготный rf4	T	T
ANAPURNA	M	гомозиготный rf4	T	T
APACHE	M	гомозиготный rf4	T	T
ARKEOS	M	гомозиготный rf4	T	T
ARLEQUIN	M	гомозиготный rf4	T	T
ARTDECO	M	гомозиготный rf4	T	T
ARTURNICK	M	гомозиготный rf4	T	T
ATOMO	M	гомозиготный rf4	C	T
AVENUE	M	гомозиготный rf4	T	T
Cezanne	M	гомозиготный rf4	T	T
CROISADE	M	гомозиготный rf4	T	T
FRUCTIDOR	M	гомозиготный rf4	T	T
GAZUL	M	гомозиготный rf4	-	T
HERMANN	M	гомозиготный rf4	T	T
HORATIO	M	гомозиготный rf4	C	T
KALAHARI	M	гомозиготный rf4	T	T
L13	R	гомозиготный Rf4	C	G
R113	R	гомозиготный Rf4	C	G

Таблица 18: Гаплотипы в локусе Rf4 для линий-восстановителей L13 и R113 и линий-закрепителей.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SNP-МАРКЕРОВ

Маркер ID	А л л е л ь Х	А л л е л ь Y	Последовательность
cfn0523 072	C	T	CAAAGGCTTGACAATGATAATGCCCCCGAATCTTG[C/T]GATAGACCCTCATGCGCTAGAGTTGTTTTCTCAAT
cfn0523 109	A	C	GACAAAGTTGAGGTGAACAAAACAGGCCTACAATC[A/C]GCTAAC TTACGTATATCCACATTAGCACACACCAC
276I13 96B22_9 7797	C	T	AAATTCGACAAGTACTATGGCTATGTCTCTGAATG[C/T]TTGTTTG GTTTATTTGTCTATATTGTCGTTGTAT
cfn0522 096	C	G	ATGCAAAGTAGTACTCGTAGAGAGTTAACACAGAC[C/G]AGTGAT TTATTGGGTGGTATTCTACTTGATATTTG
cfn0527 763	T	C	ATAAAGAAAAGTAGAGGAAGCTTATGAATAAAATGGAAAAGGA ATTCAAAATTGCCGATAAATAAAAATCATAACAAATCTAGCCA CGCAAATGCCCG[T/C]GCCGCTCTGCTCGTTTGTACATGTCTCGGT GGACAAGGAAGAACCCAACAATTGCACAGGTCAATCTTATCCAG CAAAACAAGGAAGCAAACCAAACAGG
104A4 105172	T G	C A	ATGTTGCCTCTCGCTAGCCGCTGTTCGMACCCAATGAATAATGTT[T G/CA]TGGGTTCTGGCTCCGAGAGGATGGCCGGCTYCCC
104A4 105588	A	C	GTTCCTTGTGACATGTACTCATA[A/C]ACAAGAGCCATATACTCCC CATCCTTGCA
cfn0373 248	T	A	GACATAATGTGTAATAACAGCCCATAATGCAATAAATATCAATAT AAAAGCATGATGCAAAATGGACGTATCATTGCCACGRAAAAAAT CTCACAAGATG[T/A]GACCATTTGATCCTCRTAATTGTTGTTCTAG ACCCACTCCTAAGTMTAACATTCTTTATGTCTATYCTTCAAATCCC GAAGAGTAATGAAAACCTATCGAA
cfn1097 828	T	C	CCATGAGTACCCGCTACTATCGATCTCCCTCCTCCCTGTAGGAGG CCTACGAACGATGCCCTCAGGTCCTGCTTCCTCTCGGTAGCGATG GATCCACCTG[T/C]GGTTGCTCTCTCAGGAACCAGTGTTGGCGGCG GCTCATCCGGGGCGCTGGATCTTGGTGATGTGCTGGAACAACCTCA ACTTGGAAGACGAAGAATTTGAT
cfn0527 067	A	G	GACAATATGATTCACCCTAGATCCTTACCTTACA[A/G]TTCGAAA AAAATAAAAGAACAAGTAATTTGACA
cfn0528 390	A	G	ACGAAGATGAGGAAGGTCTTCATGTTGGGTTTATG[A/G]TТАCTA ATACTTGCTTGGAATAGATGTTTTTGATC
BWS026 7	A	G	GTTACCCCAATATGCTCCCTCCTTGCACATTTTCTTCAGCTGCATA AAAAMCAGAATACC[A/G]CATCAGTTGCCTGAACCTTAAACGCAGG TGCAGAAATAAGGCGACATAATTTYCACTAATC
cfn0527 718	C	T	AGGAAAATAAATTGTTCAACATGGACATGAGAA[C/T]GGGGCA ACCAAAAAGGGAAGAACATTGGAGGAAAC
cfn0524 469	G	T	TTTGTACTGCACGTAGTAAGTATTGATTTTTCTGT[G/T]TGCTCTCT GTGGACTTAGATTTGAAAATTGGCCTT
cfn0524	A	G	ATGCACATTGTTCCATGTTAAGCTTATATTGTGC[A/G]TAACTCA

921			AAAGATTGAAATGGAATTACCAAAGGGC
cfn1122 326	C	T	ACTGACTGTTGGAATCTGATTAAGACGCTGGAGAA[C/T]CCGAGC CAAGATATGTCACGACTAGGCCATCTGGA
cfn1252 000	A	G	AATCAGATCCTGTTAATGCTGTAGCCATTCTTGCA[A/G]GCGACAC CTTGTCACGTCGTCTTATGGGCACTTA
IWB140 60	A	G	GGCAGAGCCGGTTCGACGGAGAGGAGCGCCATTCGACGCGTCTTC CGCAAT[A/G]TGTTTGCCTGCTTCGGCCGCGGCCATTCGGCGAGCT CCCACGCTTCGTCC
cfn1249 269	A	G	CGTTTAAAAGAACACAAATGTGGCCCTAGTGATCA[A/G]GTACAC ATATTTGTCACCTCTTTGAATCTTACTTA
219K1_ 166464	C	T	CGGGCTGATGAGGCTCTCGACGTGCTGCTTCACAGGATGCCTGAG CTGGGCTGCAC[C/T]CCCAACGTGGTGGCATATAACCACGGTCATCC ACGGCTTCTTTAAGGAAGGC
219K1_ 158251	G	A	GCGCTATCCGGCGTCGTGTTCCCTCTTGGGGGAATCGTCCTGGAG ATGGATCCGGTCA[G/A]AGGGGCCCGTGATTTGTGAGGATGTGTG TGTTGTTTCCCGAAAGGCG
219K1_ 111446	A	C	CTTTGACCTTAAATTCTTGTACTAATTTAGCAGAATCGTTCTTCGA GAAGCACTC[A/C]AAAAATGGTTTGTCTTGGGTCTGTATCATATTT TCTCTGAACAAACAGGCGTGA
219K1_ 110042	T	C	GACTTAGCCTCACACGGAATCGAGTCAACCAATTCC[T/C]GTCGGT TTTGAGTGGCTCCCTTGAAGATGCAATCGTTTTTCAGCATGGTCAG ATTAATCAGCGAGCGTGC
219K1_ 110005	C	T	CATGTAGTGGCTGGCGTCTAAGCGCCTTTTCTTCTTCCAGCATCTA [C/T]GACTTAGCCTCACACGGAATCGAGTCAACCAATTCTGTCCGG TTTTGAGTGGCTCCCTTGAAGATG
219K1_ 107461	A	C	GTCGTATATATTGTTTGTATTA AAAAGTTGTGTGTTTTG[A/C]GTC ATAATTTTTTAAAATATTATTATGTCATTTTCAAATTCGCATCAAC
219K1_ 99688	T	C	AATCTTCTTGACTTCATCCATCCGCCTTGTTGCCCTGCGCAAATC AAACT[T/C]CCCCGTCCTTATCATCAAGTCAGGTCCCGCCCTGGGC AGAGAGAG
219K1_ 37	C	T	CGGCAGATATCACAAAGGGCTATCCTGGTGAACAA[C/T]AAGATG GGTCAGAATTTGATAATGAAGCCTCAAGCCC
cfn1270 524	A	T	AATAGATGCACGCATCGGCGACCATTTTTTAGTACTTTTTGCCTTT TTTGAAAATTTTGTCAATTA AAAAGACAAATGCCTAGTCTATACCTG ATAAACTAA[A/T]ATCATACATAGAGAAAATGGTCATTTGGTTGA GTTTCGGTACATGCTGAGATGGTTGCACTTCGGTGCATCTGCTTTG CTTCCATCACATCATAATGTCT
136H5_ 3M5_76 01	T	C	GCTGCTTGTAGCGTCCCCCATGGCACCTG[T/C]GAAGAGGTTTTCG GCCACAGAGAAGGGGAAGGCTC
cfn1288 811	T	G	AAAATTACTTTTCACGCGCTTCGTTGGTCTGACAGTGCGAGCATA ATTTTACTTTTTCTCAGTTTTACTTAATTTGGTTAACCAAATCCTTT TTGATTTT[T/G]AACTAGAAAACCGAATGTCAAACATTGTGCAAAT TTGGAACTGAACTGAAACCAAAAACCTAAAAAATGATTAGT TTGTTTTTTTGTCTTGTTCG
136H5_ 3M5_89 176	A	G	gtatttCTTAGGATTTTCTCACCGGCATCTCC[A/G]TTTTTTGAGCAAG AGTATTTAAGGATGGTAGGC
136H5_ 3M5_89 263	C	T	AACAAAGATGCTAGTAAGAACATGAACCTAGTTGCTCATTTTTAA CAACAATTGCCACCAACCTGACATGCTCTTCCCATGTTCTTTTTT TGCTCAAAA[C/T]AGAGATGCTAGTCCAAATATTTTTCTAGTTGCT TACATTTTAAACAACAATTGCCTACCATCCTTAAATACTCTTGCTC

			AAAAACGGAGATGCCGGTGA
136H5_3M5_13_8211	T	A	AATACAGACTGGGTGCAAAGCCAAGATGAT[T/A]GTAAAATTGAT TGATGGCCGTTGGGAGGT
cfn0556_874	C	T	TGTAAAGAAGCTTAACCAGGAAAGCTATCAGGGCCATAGGGAAT GGCTGGTTAGTGACAATTTGCCTGCTGGAAATGGGATTTCTTGT TTATTTTCAGTT[C/T]TGCATTGTGTCTGACATGCTCTTTCTTTGGG CGCAGGCTGAAGTGAATTACCTTGGACAACCTATCGCACCCGAATC TTGTAAAGCTCGTTGGGTTACTGT
136H5_3M5_64_154	T	C	TGGCGGAGCTGGGGCTGTTCCCTCCTACGCAGGCGAACTTCGCCG CGATAAA[T/C]GGAACTATCATCAGGTTCCCCGATGATCCATACG
136H5_3M5_68_807	A	G	ACAAGCAACCGAGACAAGTTGCTCTTAATTATCTGTGCGT[A/G]C ACCTCTAAGTCTTAACCTGACGTAACCAACCAACCGTGT
136H5_3M5_77_916	A	G	GATGGTTACAAGGCATGCATAGCAAGTAGAGTTAACTTATCAAGT TATT[A/G]GTATTTTCTTCTGTGGTACTTAGAGTCTAMAGCTTGA GC
cfn1246_088	A	C	AATGGAAGCTGATGTGCGTTAGCGATAAAGCAACAGCGATAACG ACGCATGGATCACCATGCTACTTGGGGAAGCAGGGACATCTGAT GAGCCAGCATA[C/C]CCCAGATATGTGTCTTTCCAAATTCCACGT CCCAACAGATGAGCTATAAATTAATGCCACCTTCTCCTACAGCT AAATACTCCATCCGTTTCATAATGT
cfn1287_194	G	A	CAGAGGCATTCGTGAATTGGGCGAAATCAGAAGCAAGGAGCAGC GATGTTACAGCGCAGAAGGCACTGGGAGGGGATTCCAGGGAGGCT GCCACCAGCCC[G/A]CCATCAGATACGGAGGAGGTGGATCCATG GCCCTACCTGTGTCTGCGCCGAATCTGGACTGTGGTAACTACAG CGCCTGAATCTAGAGGTTACGCCTGG
cfn1258_380	A	C	GATCCATCTCCCTTAATAATTTTGCTATTGGTATTGGGTATGGACA TCTGAAGTGAAGGTTACGGCCGATTTATAGGAGTGATAGCACCAC ACAATTCAT[A/C]AGAGCATCTGCAATAGATGAGTAGATGTAAAA CTACTTAACTTTTACATCTCCGGGCCTAAAAACGCATCTGTAATA AGATAATGTAGATGTAAAGAAAA
IWB721_07	A	G	CGACGACGACGAGGATGCCGAGTTTGATGACATGGAGGATTATA TCGACG[A/G]cgcggactgggacgccgacatgatgatgatgtgtcgatgtcgaagga
BS0009_0770	C	T	TAGCCGTAGGTCGTAGCACATAGCCGTTTA[C/T]GTAATGCATAGT TGTCCGAAGGAATGTTTC
cfn1239_345	A	G	TAACCTGGGGCTTCTTTTTTCTCCCTATAAATATGG[A/G]CTGCCCTT TTAAGAAGGAACTGCAGCGAGGGTGCA
cfn0917_304	G	T	GACTACGCGTTCCTCCCGGTGGTGGCGCTCTACCC[G/T]TTGTGTT GCCTTTCTCCAAGCAGTTGTGCCCTTCG
cfn0919_993	G	T	ATATCTTTACAAGTCATCGACTTACATGCTTCTTT[G/T]TATTATAT GCACCTATGCAGTACTTGTTAATGGGT
cfn0920_459	C	G	GATGATATAACCGTAGCCAAGGAAGCCCAGATTTT[C/G]TTCTGT GTATCTATAGGAGCTTAATTAGGAGGAGG
cfn0393_953	C	T	AGTATATAAAAAACAAGTTGTCACCCAGATGAAT[C/T]CGAAAC TATGTCAATGTGACGGTGAGTGTGGACC
cfn0856_945	G	T	GGACATCGGCACATGCTTTATTACTGATCTGATTT[G/T]TTGACTG TTTATTTTAGGTTTGCCCTACACCACTGA
cfn1291	T	G	ATGGTTGAATATGTGACTGCATTTGGACTCACTCCTTGTTTCTGCA

249			TTTCATTGAAGATAAGCATGGCCTTATCAAGCTTCCCAGATTTAG CATGTGCAT[T/G]AATCAGTATGTTGAAGATACGACAGTCAGGTA GAATGCAGTATCTTTCCATTGAATTGAAGAGATTAATCATATCAA CTAAGCATCCTTCGGTGGCATAAC
cfn0231 871	G	T	GGAGGCGCCTACTGTATTAATTAGCTAGTGTGGC[G/T]TGTTTGA GGATAATGGCACATATACCTTGGCGGTG
cfn0867 742	G	T	TCCAGGCAGGGGGCATCCTCGACAATGATTTTCATC[G/T]AAGCTG CATCCCCATTCCATCACGACGCGGAGGCT
cfn0523 990	G	T	TGTAAGCTAACTATACATGAAGAGTGCAGGCACAC[G/T]AAAACG TTCATCCTGAAGTACAAGAGTTATTTTGG
cfn3126 082	A	C	GGAGAAAGGCGAGATTTTAGCACCTAACGCCGCAA[A/C]CCAGAT CAAATCGCTGTCCCTTT
W90K_ RAC875 _c33564 _120	A	G	AACCTTGGAAGCTATCATTGCGCACTTGAAGAGCA[A/G]TAGTGT GGACATTCTGTATTATGCTTGGAGCTTAG
cfn3407 185	A	G	CGCAGGCAGCGGGCATGTATCCTCGTCTGACGGAT[A/G]CCCAGA TTATTAACCTGTCACCCTGCACGCCTGCA
S100069 923	G	A	GAGGCTAATCCCGACGTGCCACATTGAGCACGTGTGTTCTTGCTG TGGCCTGGTCGAAAGACATGACGCATGCACGTGCCCCACGCCTCA CACGGCTTGGGTTCTCGCCTGTCCGGTGCTCGACGGACCAGTACA TATACGCGAGCGCTCCT[G/A]GCCACCTCAGTTCATCACACTTCAC TGCAGTACAAGGCCTCGGCTCTCGGCAGACTCCTCATTGCTGCTT CTGCTAGTGAAAAGAGAGATTCTTCAGCGCTGCTCCTGAAAGAG ATAAGAAATACGATGGCAACAATGGTCAGAG
S304517 1	G	A	ACTTACTGCGCGCAGACGTTGCAGCTCTTCTGCAGAAGCCAGGA GCTTCTTGGTGCCCACCATATAGTTGGGGTTCTTGGCACACTCCC CA[G/A]CGGCAGCCCCTGCGAGCAGAGGACATTCTCGTCTCGC AGCCGTCACCGGAGCCT
S304522 2	T	C	AAGCAAGCTACGCGTTGCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAAGCAAGCT ACGCTGATCAAAGGCTGAATAGTCCAGAGTTACAGGACATGGCT ACTCTGCAGC[A/G]CCCAGCAAGCTTACTACTTAGGTTGGTGGAG AAGCAGCACCCACTCGAGACTCGACAAGCAACCTTGGACGTTCT ACTCGCCAGTGCATTGCTGCTTTACC
cfn1087 371	A	G	ACCAGAGAAAGAGAGGGGAACTTTGGGTATACACC[A/G]CATTAC CCTAGTGAAAGAAGAAGGGGGTATTATGT
cfn0436 720	A	G	GAAGGGTCCACTGAGAATTAAGGATGCATTCTTTC[A/G]ATTTGGT ATATTTGTTGTAAGGAATGAAGAATCGG
S100067 637	G	C	TTTCGTGGCGGGGGATCTCGTGCCGGTTCGAGGAGGTCCACCTCCA GCGAATTCTGCAGCAACCAACACAAACAGGCCCAAATGTCCGAA TTCAGAGCA[C/G]AGCCCGACCGACCGACCGCGAAATCGCGCGGC ATGGCGTTGGCGTTTGGCGTTGGCGAGAAGGAAAAGGCACTCT ATGCAGACCTTAGCTTGGTTATGGC
cfn0554 333	C	G	TTGCCAAATTCACACCATCATTGATCTGGGGTATC[C/G]TATGCCT ATGTGATGCCTCTCACCTCTTTCTTCCC
cfn0238 384	C	G	CCGTGAAACCTGTAAAAAGATGTCTGTGTGTCTAG[C/G]AAAGCC CTAATTTTAATCACCCCGTACGCCCCCT
cfn0530 841	C	T	GCAGCTTCTTGTATATATATTCTTATCAGAAGT[C/T]GGGTAGA ACAGCTAACGATGTGCTGCTCATTTCCT
cfn1082 074	C	T	TGATCTTACTGATAAAATCCGGTCAAATATATAA[C/T]GGTGAGA AAAATTAACCAGAGCGAGGCGAGACAT
cfn0560	C	T	GTTTCATGTACAATGATGTTTAAACATTGGAACGGT[C/T]GGGATCT

679			GTTTGATCTATGCCCCCTTCAACGTCTT
cfn0915 987	G	T	AAGTCTGCCATCCAGATCATTACCCAACGGCCAAT[G/T]GAGCCA TGAGGTTTGCCTCGTTGCACGTTTTGGCT
cfn0920 253	A	C	GCAACAAAGCTGGTCATCCAAACATTTACATCGTT[A/C]GGCAGG CTTTCCGCCCAAACCATGCGGCCGACCTG
cfn0448 874	C	T	TATGTAACCTCTTTGTTTCTAAATAGCTGCGGC[C/T]CGCTACC TAAATTTATGTTGAACCTAGAGGCACCC
cfn0923 814	A	C	GTTTCGGCAGAATCCAAGTCGCAAATGTAAGGTCAG[A/C]AAATGA ATGATGATCATGATAATGAAAATCATAAG
cfn0924 180	A	G	ACGTATGGAGCTTCCTCTTTTCATCATGCACCATT[A/G]TGATCTC CCTCTTATTTTGTCTGAAGCCATTCATG
cfn0919 484	A	G	AGGTCATGAAAATGCAAGTGGCGAATCTTATCTCT[A/G]TTATACC ATTTGGCAAACAAAGGCGAGAGTTCTG

Таблица 19 Последовательности маркеров и положение SNP в последовательности.

#### Пример 19: Тест на совокупное действие генов Rf

Чтобы проверить гипотезу о совокупном действии аллелей-восстановителей и определить комбинацию (комбинации) генов Rf, которые могут давать полную фертильность в гибриде CMS, SNP, связанные с 4 основными картированными локусами, использовали для создания линий-восстановителей, объединяющих различные восстанавливающие аллели. Комбинации из 2 аллелей Rf, 3 аллелей Rf и 4 аллелей Rf (Rf1 + Rf3, Rf1 + Rf4, Rf1 + Rf7, Rf3 + Rf4, Rf3 + Rf7, Rf4 + Rf7, Rf1 + Rf3 + Rf4, Rf1 + Rf3 + Rf7, Rf3 + Rf4 + Rf7 и Rf1 + Rf3 + Rf4 + Rf7) могут быть созданы с использованием различных методов скрещивания, таких как чистопородное разведение, возвратное скрещивание, поколение одного семени или двойной гаплоид.

В примере представлены 2 двойные гаплоидные линии от скрещивания TJB155/R204: LGWR16-0016 и LGWR16-0026. Эти две линии несут аллели-восстановители Rf1, Rf7 (донор R204) и Rf3 (донор TJB155) и являются аллоплазматическими для цитоплазмы *T. timopheevii* (донор TJB155).

LGWR16-0016 и LGWR16-0026 имеют озимые особенности роста и показывают нормальную фертильность (LGWR16-0016: 2,54 семян/колос, в среднем по 29 отдельным колосам. LGWR16-0026: 2,33 семян/колос, в среднем более 40 отдельных колосьев). LGWR16-0016 и LGWR16-0026 использовались в качестве опылителей в серии скрещиваний на серии А-линии с элитным фоном (14 А-линий для LGWR16-0016 и 16 А-линий для LGWR16-0026). Растения F1, происходящие от этих скрещиваний, оценивали в комнатных условиях на предмет их фертильности.

#### Оценка фертильности с использованием основных побегов

Колосья от гибридов, полученных с помощью линий-восстановителей LGWR16-0016, дали в среднем 45,4 зерна и показали среднюю фертильность 2,44 зерна/колос. Колосья от гибридов, полученных с использованием линий-восстановителей LGWR16-

0026, дали в среднем 44,7 зерна и показали среднюю фертильность 2,37 зерна/колос. Ни одна из этих двух групп существенно не отличается по своему распределению фертильности от группы, образованной элитными линиями (Таблица 20. t-тест, р-значения <0,05). Как следствие, распределение показателей фертильности между группами относительно одинаковое (см. Таблицу 20).

	КОЛОСЬЯ	СЕМЕНА	ФЕРТИЛЬНОСТЬ	СТАНД. ОТКЛ.	Р-ЗНАЧЕНИЕ
LGWR16-0016	164	45,4	2,44	0,43	0,090
LGWR16-0026	206	44,7	2,37	0,45	0,692
Элитные инбредные линии	637	44,1	2,36	0,59	

Таблица 20: Фертильность (выраженная в виде количества семян/колос) серии колосьев из гибридов, полученных с линиями-восстановителями LGWR16-0016 и LGWR16-0026 и из панели элитных линий. Среднее количество семян на колос указано в колонке «СЕМЕНА». Стандартное отклонение «Станд. Откл.» дано для каждой из трех групп. Р-значения Т-теста «Р-значение» дается для двух групп гибридов, полученных с LGWR16-0016 и LGWR16-0026: он указывает на статистическую значимость разницы для значения «Фертильность» между группой гибридов и группой элитных линий. Колосья получают с использованием самых высоких побегов.

#### Оценка фертильности всех побегов от растений F1

Чтобы считаться завершенным, восстановление фертильности должно наблюдаться во всех колосках, образованных гибридным растением. Для этой цели была оценена целостность колосьев у 56 растений F1, полученных с LRWG16-0016, у 61 растения F1, полученных с LGWR16-0026, и у 52 элитных линий на их фертильность, и они представляют для каждой группы 294, 262 и, соответственно, 288 отдельных колосьев (Таблица 21). 56 растений F1, полученных с LGWR16-0016, произвели в среднем 41,4 зерна/колос и показали среднюю фертильность 2,21 зерна на колос (стандартное отклонение 0,32). 61 растение F1, полученные с использованием LGWR16-0026, произвели в среднем 42,8 зерна/колос и показали среднюю фертильность 2,27 зерна на колосок (Таблица 5. Стандартное отклонение 0,32). Распределение фертильности этих двух групп значительно отличается от распределения фертильности групп, образованных элитными линиями (среднее количество семян на колос: 38,4. Средняя фертильности: 2,01. Стандартное отклонение 0,44. см. таблицу 21).

	РАСТЕНИЯ	СЕМЕНА	ФЕРТИЛЬНОСТЬ	СТАНД. ОТКЛ.	Р-ЗНАЧЕНИЕ
LGWR16-0016	56	41,4	2,21	0,32	0,003
LGWR16-0026	61	42,8	2,27	0,32	0,000
Элитные инбредные линии	52	38,4	2,01	0,44	

Таблица 21: средняя фертильность колоса (выраженная в виде количества

семян/колос) отдельных растений из гибридов, полученных с использованием линий-восстановителей LGWR16-0016 и LGWR16-0026 и из панели элитных линий. Среднее количество семян на колосья указано в колонке «СЕМЕНА». Стандартное отклонение «Станд. Откл.» дано для каждой из трех групп. Р-значение t-теста «р-значение» дано для двух групп гибридов, полученных с LGWR16-0016 и LGWR16-0026: оно указывает на значимость статистической разницы для значения «Фертильность» между группой гибридов и группой элитных линий. В среднем растения F<sub>1</sub>, полученные с использованием линий-восстановителей LGWR16-0016 и LGWR16-0026, образовали 5,25 и соответственно 4,3 колоса, а растения из группы элитных линий образовали в среднем 4,35 колоса.

Пример 20: разработка линий-восстановителей из разных источников:

С помощью маркеров, разработанных в предыдущих примерах, новые линии-восстановители, содержащие локусы Rf<sub>1</sub>, Rf<sub>3</sub> и Rf<sub>7</sub>, получили с использованием различных источников локуса восстановления. В Таблице 22 приведен список этих линий-восстановителей и их характеристики.

LGWR17-0015 - это линия двойного гаплоида озимой пшеницы, полученная из растений F<sub>1</sub> из сложного скрещивания: сначала был опылен R0934F с помощью Altigo, затем созданный F<sub>1</sub> R0934F/Altigo был скрещен с F<sub>1</sub> R197/Apache, взятым в качестве отцовской формы, и полученные в результате четырехлинейное скрещивания F<sub>1</sub> «R0934F/ALTIGO//R197/APACHE» затем опыляли линией Altamira. LGWR17-0015 унаследовал цитоплазму T-CMS от линии-восстановителя R0934F. LGWR17-0015 был выбран в местных условиях и является полностью фертильной линией пшеницы.

LGWR17-0022 и LGWR17-0157 - линии двойного гаплоида озимой пшеницы, возникающие в результате сложного скрещивания: F<sub>1</sub>, образованный из скрещивания между линиями-восстановителями R204 и R213, был опылен с Aristote, в результате полученный трехлинейным скрещиванием «R204/R213//Aristote» затем был опылен линией NIC07-5520. LGWR17-0022 и LGWR17-0157 унаследовали цитоплазму T-CMS от линии-восстановителя R204. Они оба были отобраны в местной среде и являются полностью фертильными линиями пшеницы.

LGWR17-0096 и LGWR17-0154 - линии озимой пшеницы, разработанные по традиционному методу чистопородного разведения с трехлинейным скрещиванием R204/R213//ARISTOTE. LGWR17-0096 и LGWR17-0154 унаследовали цитоплазму T-CMS от линии-восстановителя R204. Они оба были отобраны в местной среде и являются полностью фертильными линиями пшеницы.

Все линии были генотипированы с маркерами, как описано выше, чтобы проверить

наличие гаплотипов Rf1, Rf3 и Rf7.

Репрезентативные образцы семян для каждой линии были предварительно депонированы в коллекцию NCIMB.

Код	Происхождение	Селекция	Гаплотип Rf	депозитный номер NCIMB
LGWR16-0016	TJB155/R204	HD	Rf1+Rf3+Rf7	NCIMB 42811
LGWR16-0026	TJB155/R204	HD	Rf1+Rf3+Rf7	NCIMB 42812
LGWR17-0015	R0934F/ALTIGO//R197/APACHE///ALTA MIRA	HD	Rf1+Rf3+Rf7	NCIMB 42813
LGWR17-0022	R204/R213//ARISTOTE///NIC07-5520	HD	Rf1+Rf3+Rf7	NCIMB 42814
LGWR17-0096	R204/R213//ARISTOTE	F6	Rf1+Rf3+Rf7	NCIMB 42815
LGWR17-0154	R204/R213//ARISTOTE	F6	Rf1+Rf3+Rf7	NCIMB 42816
LGWR17-0157	R204/R213//ARISTOTE///NIC07-5520	HD	Rf1+Rf3+Rf7	NCIMB 42817

Таблица 22: Полные данные линий-восстановителей относительно происхождения, процесса селекции, гаплотипа Rf, идентифицированного маркерами, и номера депозита NCIMB «HD»: гомозиготное растение, полученное после процесса двойного гаплоида, «F6»: гомозиготное растение, полученное через шесть поколений самоопылений.

Пример 21. Испытание кумулятивного действия генов Rf1, Rf3 и Rf7 на открытом воздухе.

Фертильность 4 гибридов, полученных с использованием линий-восстановителей LGWR17-0022, LGWR17-0153, LGWR17-0154 и LGWR17-0157, оценивали в полевых условиях, как описано в примере 19, для оценки фертильности основных побегов. Линии-восстановители имеют сорта и гаплотипы, как описано в Таблице 23.

Анализы выполнены с использованием агрономически адаптированных гибридов в трех разных странах: Франции, Германии и Великобритании. Всего протестировали 28 гибридов и сравнено с 26 контрольными элитными инбредными растениями. Результаты показывают, что в полевых условиях гибриды, включающие комбинацию трех аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf7, работали так же, как и элитные инбредные растения (таблица 24). Также следует отметить, что в этой комбинации слабый Rf3 или Rf3 не оказывают никакого влияния на уровень фертильности.

Код	Происхождение	Гаплотип Rf	депозит NCIMB
LGWR17-0022	R204/R213//ARISTOTE///NIC07-5520	Rf1+Rf3+Rf7	да
LGWR17-0153	R204/R213//ARISTOTE	Rf1+Rf3weak+Rf7	нет

LGWR17-0154	R204/R213//ARISTOTE	Rf1+Rf3weak+Rf7	да
LGWR17-0157	R204/R213//ARISTOTE///NIC07-5520	Rf1+Rf3+Rf7	да

Таблица 23: происхождение и гаплотип линий-восстановителей

		Колосья	среднее	Станд. Откл.
Гибриды	Всего	169	2,71	0,47
	Rf1+Rf3слабый+Rf7	43	2,72	0,38
	Rf1+Rf3+Rf7	126	2,71	0,49
Элитные инбредные линии		226	2,73	0,43

Таблица 24: Фертильность (выраженная в виде количества семян/колос) серии колосьев из гибридов, полученных с линиями-восстановителями LGWR17-0022, LGWR17-0153, LGWR17-0154 и LGWR17-0157 и из панели элитных линий. Каждый колосок происходит из самого высокого побега. Стандартное отклонение «Станд. Откл.» даны для каждой из трех групп.

Пример 22. Модификация последовательности эндогенного гена RFL29с с помощью технологий CRISPR для превращения аллеля rf3 в аллель Rf3.

Как показано в примере 11, на фигуре 5А и фигуре 12, нуклеотидная последовательность RFL29с характеризуется делецией из 2 нуклеотидов по сравнению с нуклеотидной последовательностью RFL29а, создавая сдвиг рамки и приводя к неактивному укороченному белку. Выравнивание последовательностей на фигуре 12 показывает, что один «Т» нуклеотид в последовательности гена RFL29с может быть удален или 2 нуклеотида добавлены для того, чтобы превратить рамку последовательности гена RFL29с в полный и функциональный белок RFL29.

Такая модификация может быть достигнута в Fielder, который содержит RFL29с, как представлено в SEQ ID NO: 3457, путем разработки, как описано в примере 15, подходящей направляющей последовательности, нацеленной на сдвиг рамки, и использования ее в комбинации с технологией редактирования оснований, такой как описано в WO2015089406. На Фигуре 12 показан подходящий мотив PAM и последовательность-мишень для редактирования CRISPR cas9.

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Ahmed et al, 2001. QTL analysis of fertility restoration against cytoplasmic male sterility in wheat. *Genes Genet Syst*, 76:33-38.

Bahl PN, Maan SS, 1973. Chromosomal location of fertility restoring genes in six lines of common wheat. *Crop Sci* 13: 317-320.

Bennetzen JL et al, 2012. Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. *Nat Biotechnol* 30 (6):555-+. doi:10.1038/nbt.2196

Brenchley R, et al , 2012. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome

shotgun sequencing. *Nature* 491 (7426):705-710. doi:10.1038/nature11650

Cannarozzi G, et al, 2014. Genome and transcriptome sequencing identifies breeding targets in the orphan crop tef (*Eragrostis tef*). *Bmc Genomics* 15. doi:Artn 58110.1186/1471-2164-15-581

Chen JF et al, 2013. Whole-genome sequencing of *Oryza brachyantha* reveals mechanisms underlying *Oryza* genome evolution. *Nature Communications* 4. doi:ARTN 159510.1038/ncomms2596

Cheng SF, Gutmann B, Zhong X, Ye YT, Fisher MF, Bai FQ, Castleden I, Song Y, Song B, Huang JY, Liu X, Xu X, Lim BL, Bond CS, Yiu SM, Small I (2016) Redefining the structural motifs that determine RNA binding and RNA editing by pentatricopeptide repeat proteins in land plants. *Plant Journal* 85 (4):532-547. doi:10.1111/tpj.13121.

Christensen AH and Quail PH, 1996. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res*, May;5(3):213-8.

Christian et al, 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol*. 18(4):675-89.

Curtis and Lukaszewski, 1993. Localization of genes in Rye that restore male fertility to hexaploid wheat with timopheevii cytoplasm. *Plant breeding*, 11:106-112.

Depigny-This D et al, 1992. The cruciferin gene family in radish. *Plant Molecular Biology*, 20: 467-479.

Fehr WR et al, 1987. *Principles of Cultivar Development Vol.1 Theory and Technique*. Macmillan, New York..

Fujii S, Bond CS, Small ID (2011) Selection patterns on restorer-like genes reveal a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout angiosperm evolution. *P Natl Acad Sci USA* 108 (4):1723-1728. doi:DOI 10.1073/pnas.1007667108.

Geyer M et al, 2016. Distribution of the fertility-restoring gene Rf3 in common and spelt wheat determined by an informative SNP marker. *Mol Breeding*, 36:167. DOI 10.1007/s11032-016-0592-6.

Götz H et al, 2011. Transgene Expression Systems in the Triticeae Cereals. *Journal of Plant Physiology* 168, no. 1 : 30–44. doi:10.1016/j.jplph.2010.07.007.

International Brachypodium I (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463 (7282):763-768. doi:10.1038/nature08747

Jacquemin J, et al, 2013. The International *Oryza* Map Alignment Project: development of a genus-wide comparative genomics platform to help solve the 9 billion-people question. *Curr*

Opin Plant Biol 16 (2):147-156. doi:10.1016/j.pbi.2013.02.014.

Jefferson, R.A., 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Report.* 5, 387–405. DOI:10.1007/BF02667740

Jia J, et al, 2013. *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature* 496 (7443):91-95. doi:10.1038/nature12028.

Jones HD, 2015. *Wheat Biotechnology: Current Status and Future Prospects.* K. Azhakanandam et al. (eds.), *Recent Advancements in Gene Expression and Enabling Technologies in Crop Plants*, DOI 10.1007/978-1-4939-2202-4\_8.

Kay R, et al 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236:1299–1302.

Kawahara Y et al, 2013. Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice* 6. doi:Artn 410.1186/1939-8433-6-4.

Kihara, 1951, *Genome analysis in Triticum and Aegilops X.* Concluding review. *Cytologia*, 16: 101-123.

Kojima et al, 1997, High-resolution RFLP mapping of the fertility restoration (Rf3) gene against *Triticum timopheevii* cytoplasm located on chromosome 1BS of common wheat. *Genes Genet Syst*, 72: 353-359.

Krasileva KV et al, 2013. Separating homeologs by phasing in the tetraploid wheat transcriptome. *Genome Biol* 14 (6). doi:ARTN R66 10.1186/gb-2013-14-6-r66.

Li et al, 2003. OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes. *Genome Res.* 2003 Sep; 13(9): 2178–2189.

Li H. and Durbin R, 2010. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*, Epub. [PMID: 20080505]

Ling HQ et al, 2013. Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*. *Nature* 496 (7443):87-90. doi:10.1038/nature11997

Longin et al, 2012, Hybrid breeding in autogamous cereals. *Theor Appl Genet.*: 125:1007-1096. DOI 10.1007/s00122012-1967-7.

Ma ZQ and Sorrells ME, 1995, Genetic analysis of fertility restoration in wheat using RFLP. *Crop Sci.*, 35:1137-1143.

Mace ES et al, 2013. Whole-genome sequencing reveals untapped genetic potential in Africa's indigenous cereal crop sorghum. *Nat Commun* 4:2320. doi:10.1038/ncomms3320.

McElroy D et al, 1990. Isolation of an Efficient Actin Promoter for Use in Rice Transformation. *The Plant Cell*, Vol. 2, 163-171.

Martis MM et al, 2013. Reticulate Evolution of the Rye Genome. *Plant Cell* 25 (10):3685-3698. doi:10.1105/tpc.113.114553

Mayer KFX, et al, 2014. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science* 345 (6194). doi:ARTN 125178810.1126/science.1251788

Mayer KFX et al, Conso IBGS, 2012. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491 (7426):711-+. doi:10.1038/nature11543.

Ouyang S et al, 2007. The TIGR Rice Genome Annotation Resource: Improvements and new features. *Nucleic Acids Res* 35:D883-D887. doi:10.1093/nar/gkl976.

Pallavi Sinha P et al 2013. Genetic analysis and molecular mapping of a new fertility restorer gene Rf8 for *Triticum timopheevii* cytoplasm in wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers. *Genetica*, 141: 131-141.

Paterson AH et al, 2009. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature* 457 (7229):551-556. doi:10.1038/nature07723.

Rathburn and Hedgcoth, 1991. Chimeric open reading frame in the 5' flanking region of coxI mitochondrial DNA from cytoplasmic male-sterile wheat. *Plant Mol. Biol.*, 16:909-912.

Rice P et al, 2000. A. EMBOSS: The European molecular biology open software suite. *Trends Genet* 16, 276–277, 10.1016/S0168-9525(00)02024-2.

Sakai H, et al, 2013. Rice Annotation Project Database (RAP-DB): An Integrative and Interactive Database for Rice Genomics. *Plant Cell Physiol* 54 (2):E6-+. doi:10.1093/pcp/pcs183.

Schnable PS, et al, 2009. The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science* 326 (5956):1112-1115. doi:10.1126/science.1178534.

Singh SK et al , 2010. Perspective of hybrid wheat research: a review. *Indian J Agric Sci* 80:1013–1027.

Song and Hedgcoth, 1994. Influence of nuclear background on transcription of a chimeric gene orf256 and cox1 in fertile and cytoplasmic male sterile wheats. *Genome*, vol.37

Stojalowski S et al, 2013. The importance of chromosomes from the sixth homeologic group in the restoration of male fertility in winter triticale with *Triticum timopheevii* cytoplasm. *J. Appl. Genetics*, 54:179-184.

Verdaguer et al, 1996. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. *Plant Molecular Biology* 31: 1129–1139.

Wang MH et al, 2014. The genome sequence of African rice (*Oryza glaberrima*) and evidence for independent domestication. *Nat Genet* 46 (9):982-+. doi:10.1038/ng.3044

Wilson JA, Ross WM. 1962. Male sterility interaction of the *Triticum aestivum* nucleus and *Triticum timopheevii* cytoplasm. *Wheat Information Service (Kyoto)* 14: 29–30.

Wilson JA, Ross WM. 1962. Male sterility interaction of the *Triticum aestivum* nucleus

and *Triticum timopheevii* cytoplasm. Wheat Information Service (Kyoto) 14, 29–30.

Wilson, 1984. Hybrid wheat breeding and commercial seed development. *Plant Breeding Rev.*, 2: 303-319. 2

Whitford R et al, 2013. Hybrid breeding in wheat: technologies to improve hybrid wheat seed production. *Journal of Experimental Botany*. doi:10.1093/jxb/ert333.

Zhou et al, 2005. SSR marker associated with fertility restoration genes against *Triticum timopheevii* cytoplasm in *Triticum aestivum*. *Euphytica*, 141:33-40.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная нуклеиновая кислота Rf1, кодирующая белок Rf1, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS T. timopheevii, где соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 361.

2. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 1, содержащая SEQ ID NO: 3119.

3. Трансгенное растение пшеницы, содержащее нуклеиновую кислоту Rf1 по п. 1 или 2 и, необязательно, одну или более нуклеиновых кислот, содержащих аллель (аллели)-восстановители Rf3, Rf4 и/или Rf7 в качестве трансгенного элемента (элементов).

4. Генетически сконструированное растение пшеницы, содержащее нуклеиновую кислоту Rf1 по п. 1 или 2 и, необязательно, одну или более нуклеиновых кислот, содержащих аллель (аллели)-восстановители Rf3, Rf4 и/или Rf7, в качестве генетически сконструированного элемента (элементов).

5. Растение пшеницы по п. 3 или 4, отличающееся тем, что указанный трансгенный элемент (элементы) или генетически сконструированный элемент (элементы) экспрессируют полипептиды, которые восстанавливают или улучшают мужскую фертильность растения по сравнению с родительским растением без такого трансгенного элемента (элементов) или генетически сконструированного элемента (элементов).

6. Восстановитель фертильности растения пшеницы цитоплазмы CMS T. timopheevii, включающий аллель-восстановитель Rf1 по п. 1 или 2 и, по меньшей мере, два аллеля-восстановителя фертильности в локусах восстановителя, выбранных из числа Rf3, Rf4 и Rf7, где

i. locus Rf3 находится на расстоянии по большей мере 10 cM от маркера cfn1249269 SEQ ID NO: 3205 или маркера BS00090770 SEQ ID NO: 3228,

ii. locus Rf7 находится на расстоянии по большей мере 10 cM от маркера cfn0919993 SEQ ID NO: 3231, и,

iii. locus Rf4 находится на расстоянии по большей мере 10 cM от маркера cfn0393953 SEQ ID NO: 3233.

7. Растение пшеницы по любому из пп. 3-6, отличающееся тем, что растение содержит аллели-восстановители Rf1, Rf3 и Rf7.

8. Растение пшеницы по любому из пп. 3-7, отличающееся тем, что оно включает, по меньшей мере, один аллель-восстановитель Rf3 в локусе Rf3, причем указанный

аллель-восстановитель Rf3 локализован в хромосомном фрагменте между маркерами SNP cfn1249269 и BS00090770.

9. Растение пшеницы по п. 8, отличающееся тем, что соответствующая аминокислотная последовательность аллеля-восстановителя Rf3 имеет, по меньшей мере, 95% идентичности, предпочтительно, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящий из SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 676 и SEQ ID NO: 684.

10. Растение пшеницы по п. 8 или 9, отличающееся тем, что указанный локус Rf3 содержит SEQ ID NO: 1712, SEQ ID NO: 3147 или SEQ ID NO: 2230, SEQ ID NO: 3148 или SEQ ID NO: 2238.

11. Растение пшеницы по любому из пп. 3-10, отличающееся тем, что оно включает, по меньшей мере, один аллель-восстановитель Rf7 в локусе Rf7, причем указанный локус Rf7 характеризуется наличием одного или более из следующих SNP аллелей-восстановителей:

SNP#	Название маркера	SEQ ID маркера	Аллель-восстановитель
SNP44	cfn0917304	3230	T
SNP45	cfn0919993	3231	G
SNP46	cfn0920459	3232	C

SNP49	cfn0915987	3445	G
SNP50	cfn0920253	3446	A
SNP51	cfn0448874	3447	T
SNP52	cfn0923814	3448	C
SNP53	cfn0924180	3449	G
SNP54	cfn0919484	3450	G

12. Растение пшеницы по любому из пп. 3-11, отличающееся тем, что оно включает, по меньшей мере, один аллель-восстановитель Rf4, кодирующий белок Rf4, восстановитель фертильности цитоплазмы CMS T. timopheevii, где соответствующая аминокислотная последовательность имеет, по меньшей мере, 95%, предпочтительно, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 477 и SEQ ID NO: 3136-3138.

13. Растение пшеницы по любому из пп. 3-5 и 7-12, содержащее аллели-восстановители Rf1, Rf3 и Rf7 в одном и том же локусе.

14. Способ получения трансгенного растения пшеницы по любому из пп. 3 и 5-13,

отличающийся тем, что способ включает стадии трансформации исходного растения пшеницы одной или более нуклеиновыми кислотами, кодирующими белок-восстановитель цитоплазмы CMS T. timopheevii по п. 1. или 2, выбора растения, содержащего указанную одну или более нуклеиновых кислот в качестве трансгена (трансгенов), восстановления и выращивания указанного трансгенного растения пшеницы.

15. Способ получения генетически модифицированного растения пшеницы по любому из пп. 4-13, отличающийся тем, что способ включает стадии генетической модификации родительского растения пшеницы для получения в его геноме одной или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок-восстановитель цитоплазмы CMS T. timopheevii. как определено по п. 1 или 2, предпочтительно путем редактирования генома, стадии выбора растения, содержащего указанные одну или более нуклеотидных последовательностей в качестве генетически сконструированных элементов, восстановления и выращивания указанного генетически сконструированного растения пшеницы.

16. Способ получения растения пшеницы по п. 6, отличающийся тем, что указанный способ включает следующие стадии:

a. предоставление первого растения пшеницы, содержащего один или два аллеля-восстановителя, выбранные из аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf7,

b. скрещивание указанного первого растения пшеницы со вторым растением пшеницы, содержащим один или два аллеля-восстановителя, выбранные из аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf7, где аллели-восстановители Rf1, Rf3 и Rf7 представлены, по меньшей мере, один раз на панели аллелей-восстановителей, представленной первым растением и вторым растением,

c. сбор гибридного семени F1,

d. получение гомозиготных растений из растений F1,

e. необязательно детекцию присутствия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf7 в гибридном семени и/или в каждом поколении.

17. Способ по п. 14, 15 или 16, отличающийся тем, что показатель фертильности полученного растения пшеницы выше, чем показатель фертильности у родительского растения пшеницы.

18. Способ получения трансгенного или генетически сконструированного растения

пшеницы, где уровень фертильности указанного растения модифицируют, причем способ включает стадию нокдауна экспрессии аллеля-восстановителя Rf1, где указанный аллель-восстановитель Rf1 содержит нуклеиновую кислоту по п. 1 или 2.

19. Способ модификации уровня фертильности растения пшеницы путем редактирования генома, включающий предоставление инструмента редактирования генома, способного модулировать экспрессию аллеля-восстановителя Rf1, где аллель-восстановитель Rf1 содержит нуклеотидную последовательность, как определено в п.1 или 2.

20. Способ получения гибридного растения пшеницы, включающий стадии:

a. скрещивание стерильного женского растения, содержащего цитоплазму *T. timopheevii*, с фертильным мужским растением пшеницы по любому из пп. 3-13;

b. сбор гибридных семян;

c. необязательно детекцию уровня гибридности гибридных семян.

21. Способ по п. 20, дополнительно включающий стадию детекции присутствия цитоплазмы *T. timopheevii* и/или, по меньшей мере, трех локусов Rf, выбранных из числа Rf1, Rf3, Rf4 и Rf7, в гибридных семенах.

22. Гибридное растение пшеницы, полученное способом по п. 20 или 21.

23. Способ идентификации растения пшеницы по любому из пп. 3-13, отличающийся тем, что указанное растение пшеницы идентифицируют путем детекции присутствия, по меньшей мере, одного аллеля-восстановителя Rf1 и, необязательно, одного или более дополнительных аллелей-восстановителей, выбранных из группы, состоящей из Rf3, Rf4 и Rf7.

24. Зонды нуклеиновой кислоты или праймеры для специфической детекции аллеля-восстановителя Rf1 в растении пшеницы и, необязательно, одного или более из аллелей-восстановителей Rf3, Rf4 и Rf7.

25. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-восстановитель цитоплазмы CMS *T. timopheevii* по п. 1 или 2, функционально связанный с регуляторными элементами.

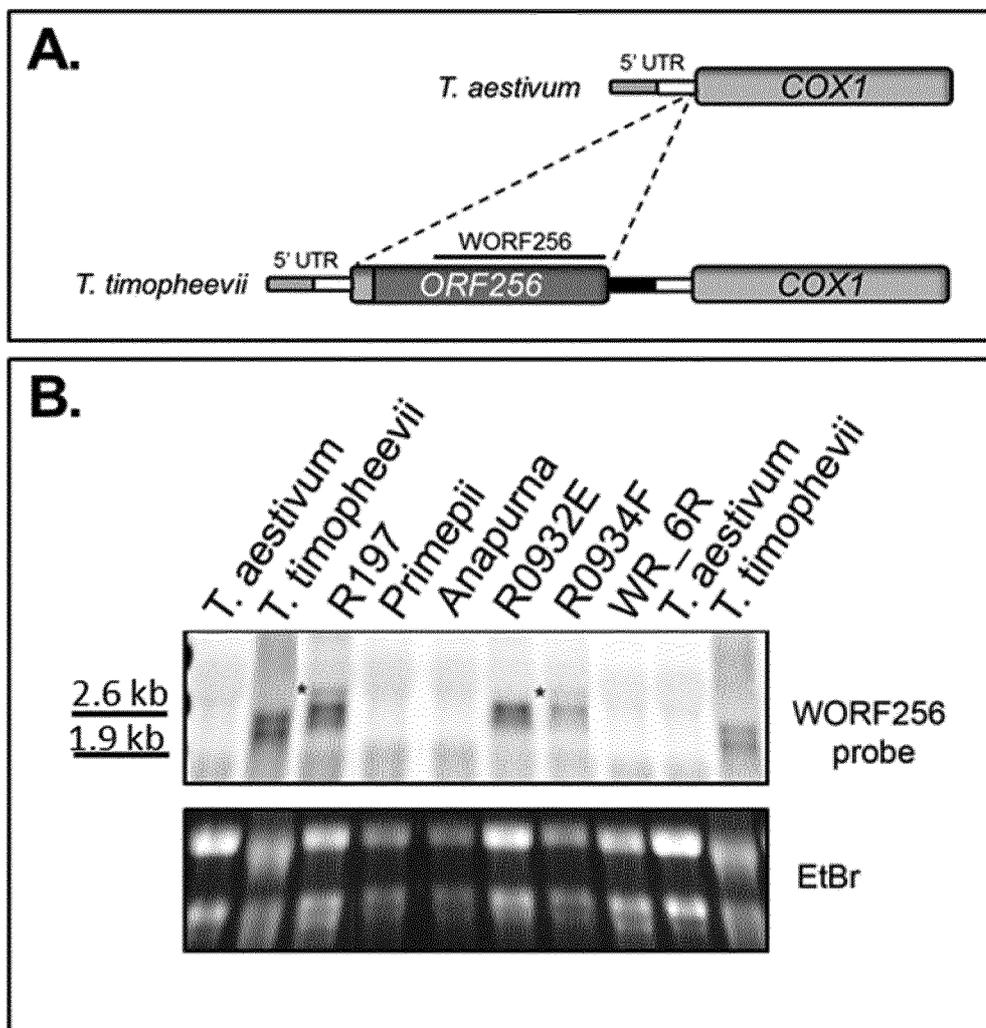
26. Вектор для применения в трансформации растения пшеницы, содержащий рекомбинантную нуклеиновую кислоту по п. 25.

No.	Триба	Вид	Сорт	Веб-сайт	Источники	Количество идентифицированных белков RFL
1	Triticeae	<i>Aegilops tauschii</i> (1)	AL8/78	<a href="http://plants.ensembl.org/Aegilops_tauschii/Info/Index">http://plants.ensembl.org/Aegilops_tauschii/Info/Index</a>	Jia et al., 2013	46
2		<i>Aegilops tauschii</i> (2)		<a href="http://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies">http://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies</a>	Jia et al., 2013	31
3		<i>Aegilops speltoides</i>		<a href="http://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies">http://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies</a>	Mayer et al., 2014	20
4		<i>Aegilops sharonensis</i>		<a href="http://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies">http://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies</a>	Mayer et al., 2014	32
5		<i>Triticum aestivum</i>		<a href="http://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Index">http://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Index</a>	Mayer et al., 2014	98
6		<i>Triticum durum</i>	cv. Cappeli	<a href="http://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies">http://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies</a>	Mayer et al., 2014	30
7		<i>Triticum durum</i>	cv. Strongfiled	<a href="http://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies">http://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies</a>	Mayer et al., 2014	30
8		<i>Triticum monococcum</i>		<a href="http://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies">http://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies</a>	Brenchley et al., 2012	12
9		<i>Triticum turgidum</i>		<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA191054">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA191054</a>	Krasileva et al., 2013	25
10		<i>Triticum urartu</i>		<a href="http://archive.gramene.org/Triticum_urartu/Info/Annotation/">http://archive.gramene.org/Triticum_urartu/Info/Annotation/</a>	Ling et al., 2013	24
11		<i>Hordeum vulgare</i>	Barke	<a href="http://pgsb.helmholtz-muenchen.de/plant/barley/index.jsp">http://pgsb.helmholtz-muenchen.de/plant/barley/index.jsp</a>	Mayer et al., 2013	13
12		<i>Hordeum vulgare</i>	Morex	<a href="http://pgsb.helmholtz-muenchen.de/plant/barley/index.jsp">http://pgsb.helmholtz-muenchen.de/plant/barley/index.jsp</a>	Mayer et al., 2013	12
13		<i>Hordeum vulgare</i>	Bowman	<a href="http://pgsb.helmholtz-muenchen.de/plant/barley/index.jsp">http://pgsb.helmholtz-muenchen.de/plant/barley/index.jsp</a>	Mayer et al., 2013	13
14		<i>Hordeum vulgare</i>	var. distichum	<a href="http://plants.ensembl.org/Hordeum_vulgare/Info/Index">http://plants.ensembl.org/Hordeum_vulgare/Info/Index</a>	Mayer et al., 2012	0
15		<i>Lolium perenne</i>	P226/135/1	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GAYX00000000">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GAYX00000000</a>	Farrel et al., 2014	2
16		<i>Secale cereale</i>		<a href="http://pgsb.helmholtz-muenchen.de/plant/rye/index.jsp">http://pgsb.helmholtz-muenchen.de/plant/rye/index.jsp</a>	Martis et al., 2013	0
17	Oryzeae	<i>Oryza sativa</i>		<a href="http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!bulk?org=Org_Osativa">http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!bulk?org=Org_Osativa</a>	Ouyang et al., 2007	14
18		<i>Oryza sativa japonica</i>		<a href="http://plants.ensembl.org/Oryza_sativa/Info/Index">http://plants.ensembl.org/Oryza_sativa/Info/Index</a>	Kawahara et al., 2013	14
19		<i>Oryza indica</i>	Nipponbare	<a href="http://plants.ensembl.org/Oryza_indica/Info/Index">http://plants.ensembl.org/Oryza_indica/Info/Index</a>	Sakai et al., 2013	18
20		<i>Oryza sativa Nipponbare</i>		<a href="http://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html">http://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html</a>	Kawahara et al., 2013	14
21		rice cultivar 'Kasalath'	Kasalath	<a href="http://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html">http://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html</a>	Sakai et al., 2013	11
22		<i>Oryza barthii</i>		<a href="http://plants.ensembl.org/Oryza_barthii/Info/Index">http://plants.ensembl.org/Oryza_barthii/Info/Index</a>	Jacquemin et al., 2012	13

Фиг. 1А

23		<i>Oryza brachyantha</i>		<a href="http://plants.ensembl.org/Oryza_brachyantha/Info/Index">http://plants.ensembl.org/Oryza_brachyantha/Info/Index</a>	Chen et al., 2013	4	
24		<i>Oryza glaberrima</i>		<a href="http://plants.ensembl.org/Oryza_glaberrima/Info/Index">http://plants.ensembl.org/Oryza_glaberrima/Info/Index</a>	Wang et al., 2014	2	
25		<i>Oryza glumaepatula</i>		<a href="http://plants.ensembl.org/Oryza_glumaepatula/Info/Index">http://plants.ensembl.org/Oryza_glumaepatula/Info/Index</a>	Jacquemin et al., 2012	12	
26		<i>Oryza meridionalis</i>		<a href="http://plants.ensembl.org/Oryza_meridionalis/Info/Index">http://plants.ensembl.org/Oryza_meridionalis/Info/Index</a>	Jacquemin et al., 2012	15	
27		<i>Oryza nivara</i>		<a href="http://plants.ensembl.org/Oryza_nivara/Info/Index">http://plants.ensembl.org/Oryza_nivara/Info/Index</a>	Jacquemin et al., 2012	13	
28		<i>Oryza punctata</i>		<a href="http://plants.ensembl.org/Oryza_punctata/Info/Index">http://plants.ensembl.org/Oryza_punctata/Info/Index</a>	Jacquemin et al., 2012	7	
29		<i>Oryza rufipogon</i>		<a href="http://plants.ensembl.org/Oryza_rufipogon/Info/Index">http://plants.ensembl.org/Oryza_rufipogon/Info/Index</a>	Jacquemin et al., 2012	12	
30	<i>Brachypodieae</i>	<i>Brachypodium distachyon</i>		<a href="http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!bulk?org=Org_Bdistachyon">http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!bulk?org=Org_Bdistachyon</a>	Brachypodium Initiative	11	
31	<i>Eragrostideae</i>	<i>Eragrostis tef</i>		<a href="http://www.tef-research.org/index.html">http://www.tef-research.org/index.html</a>	Cannarozzi et al., 2014	33	
32	<i>Poniceae</i>	<i>Setaria italica</i>		<a href="http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!bulk?org=Org_Sitalica">http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!bulk?org=Org_Sitalica</a>	Bennetzen et al., 2012	15	
33	<i>Andropogoneae</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	BTx623	<a href="http://plants.ensembl.org/Sorghum_bicolor/Info/Index">http://plants.ensembl.org/Sorghum_bicolor/Info/Index</a>	Paterson et al., 2006	20	
34	<i>Andropogoneae</i>	<i>Zea mays</i>	B73	<a href="http://plants.ensembl.org/Zea_mays/Info/Index">http://plants.ensembl.org/Zea_mays/Info/Index</a>	Schnable et al., 2010	6	
					<b>Total</b>	<b>633</b>	
					Reference RFLs	Fujii et al., 2011	49
					Sorghum WGS data sets	Mace et al., 2013	517
					<b>Total</b>	<b>1188</b>	

Фиг. 1В



Фиг. 2

Фиг. 3

	Происхождение	T. timophevi 	A. speltoides	T. timophevi 	T. timophevi 					
	Закрепитель	Восстановитель Rf4+	Восстановитель Rf4+	Восстановитель Rf4+	Восстановитель Rf4+	Закрепитель r	Закрепитель r	Восстановитель Rf4-	Восстановитель Rf4-	T. timophevii
RFL group	Репрезентативная последовательность	17F3R- 0377	GSTR435	L13	R113	ANAPURN A	FIELDER	R0934F	R197	TRI13159
RFL120	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_67_1	103	42	101	93	0	0	0	0	157
RFL211	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_99_1	110	0	126	94	0	0	1	0	182
RFL123	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_65_1	102	0	96	89	0	0	0	0	160
RFL204	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_100_1	89	0	100	91	0	0	0	0	144
RFL130	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_53_2	84	0	91	101	0	0	0	0	132
RFL207	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_62_1	92	0	91	85	1	0	1	0	155
RFL135	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_93_1	78	0	78	77	0	0	0	0	135
RFL162	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_94_1	79	0	66	77	0	0	0	0	131
RFL340	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_91_1	65	6	74	71	1	2	1	1	128
RFL160	Triticum-timopheevii.300k_Assembly_Contig_111_1	52	0	54	52	0	0	0	0	100

## Фиг. 4А

```

Query 1      AAAAAAGAGAAACGTTTTTATTCAGCAAAGCCACTTCTTGAGAGAGCCGAGGTCTCCCAG 60
              |
Sbjct 391    AAAAAAGAGAAACGTTTTTATTCAGCAAAGCCACTTCTTGAGAGAGCCGAGGTCTCCCAG 450
Query 61     GCCAGTGGCGGCGGGCGGAAATACAGAGTGGCGGCG-----GTCCGG 101
              |
Sbjct 451    GCCAGTGGCGGCGGGCGGAAAAACAGAGTGGCGGCGGTCGTCCTCACCGGCGGGCGTCCGG 510
Query 102    GACGCAGCGCGCGGCGACGGAGGGTTCGATTCTTTCATCGGCGTCAGGGCCCGCCGACG 161
              |
Sbjct 511    GACGCAGCGCGCGGCGACGGAGGGTTCGATTCTTTCATCGGCGTCAGGGCCCGCCGACG 570
Query 162    CAGCGCCGAGCACGGAGATCTCGTCCTCGCCCCCTCAACGCTGCGGCCGTGTCGACCAG 221
              |
Sbjct 571    CAGCGCCGAGCGCGGAGATCTCGTCCTCGCCCCCTCAACGCTGCGGCCGTGTCGACCAG 630
Query 222    CTCGCCGGCGGTCAGATCTCCTGTACATCGCATTTACCTACTGCAGCAGCTGCAGCTCGA 281
              |
Sbjct 631    CTCGCCGGCGGCCAGATCTCCTGTACAGCGCATTTACCTACTGCAGCAGCTGCAACTCGA 690
Query 282    CGGTGAGCATCCTGGCATCCTGACATCTCTTCATCTTGCTCTGCTTTCCTTCCTTCTAA 341
              |
Sbjct 691    AGGTGAGCATCCTGG-----CATCTCGTCCATCTTGCTCTGCTTTCCTTCCTTCTAA 742
Query 342    CCCAGGTTTCATGCCAGGCTGCGCCGGTGGTGAGCGGCGGGCGGCCATCCTATCCCCT 401
              |
Sbjct 743    CCCAGGTTTCATGCCAGGCTGCGCCGGTGGTGAGCGGCGGGCGGCCATCCTATCCCCT 802
Query 402    CGAGGGATTCTTCCGGCCAGGTGGAGCTATGAGCCGCGCTTTGTCCCCGTCGGCAGACG 461
              |
Sbjct 803    CGAGGGATTCTTCCGGCCAGGTGGAGCTATGAGCCGCGCTTTGTCCCCGTCGGCAGACG 862
Query 462    CATCTTAGAGCAGAACATCAAGGCTCGGTACCACGCCGAGACATTGGCACCGAGGACGC 521
              |
Sbjct 863    CATCTTAGAGCAGAACATCAAGGCTCGGTACCACGCCGAGACATTGGCACCGAGGACGC 922
Query 522    ACTCCACCTGTTTGACGAATTGCTCCAGGTTGCTGGGCGCTCCTCGATCCATGCCATCAA 581
              |

```

Sbjct 923 ACTCCACCTGTTTGGACGAATTGCTCCAGGTTGCTGGGCGCTCCTCGATCCATGCCATCAA 982  
Query 582 CTGCCTCCTCACCGTTGTTCGGCCGTGATTGCCCTGCGCTCGGCGTCTCCCTCTTCAACCG 641  
|||||

Sbjct 983 CTGCCTCCTCACCGTTGTTCGGCCGTGATTGCCCTGCGCTTGGCGTCTCCCTCTTCAATCG 1042  
Query 642 CGTCGCAAGGGCCAAGGTGGCACCCCTGCAGTATCACCTATGCCATTCTGGTCGACTGCTG 701  
|||||

Sbjct 1043 CGTCGCAAGGTCCAAGGTGGCACCCCTGCAGTATCACCTATGCCATTCTGGTCGACTGCTG 1102  
Query 702 CTGCCGCACTGGCCGCCAGGACCTTGGTTTCGCTGCCATGGGACACGTCATCAAGATGGG 761  
|||||

Sbjct 1103 CTGCCGCGCTGGCCGCCAGGACCTTGGTTTCGCTGCCATGGGACACGTCATCAAGATGGG 1162  
Query 762 ATTTACTGCAGATGCTATGATCACTTTCAGCCACCTACTAAAGGCCATCTGTGCGGAGAA 821  
|||||

Sbjct 1163 ATTTACTGCAGATGCTATGATCACTTTCAGCCACCTACTAAAGGCCATCTGTGCGGAGAA 1222  
Query 822 CAAGACCAGCTATGCAATGGACATCGTACTCCGAATAATGCCCATGTTAACTGCATACC 881  
|||||

Sbjct 1223 CAAGACCAGCTATGCAATGGACATCGTACTCCGAATAATGCCCGTGTTTAACTGCATACC 1282  
Query 882 GGATGTCTTCTCTTACAACATTCTTTTCAAGGGTCTCTGCAACGAGAAGAGAAGCCAAGA 941  
|||||

Sbjct 1283 GGATGTCTTCTCTTACAACATTCTTTTCAAGGGTCTCTGCAACGAGAAGAGAAGCCAAGA 1342  
Query 942 GGCTCTCGAGCTGATTTCAGGTGATGGTTGAGCATGGAGGTGCGTGCCAACCTGATGTGGT 1001  
|||||

Sbjct 1343 GGCTCTCGAGCTGATTTCAGGTGATGGTTGAGCATGGAGGTGGCTGCCAACCTGATGTGGT 1402  
Query 1002 GTCCTATAGCACCGTAATTGATGGCTTGTGAAAGAGGGTTGGTGGGCAAGGTTTACAT 1061  
|||

Sbjct 1403 GTCATATAGCACTGTAATTGATGGCTTGTGAAAGAGGGTGAGGTGAACAAGGCTTACAG 1462  
Query 1062 CCTATTTTGTGAAATGATACAGAGAGGAATT-TCGCCGAATGCTGTGACCTATAACTCAA 1120  
|||||

Sbjct 1463 TCTATTTTGTGAAATGCTGC-GTCAGGGGGTATCGCCGAATGTTGTGACCTGTAGTTCAA 1521  
Query 1121 TCATCTCTGGCATGTGCAAGGTTTCATGCGATGGACAAGGCTGAGCAGGTTCTTCAACAGA 1180  
|||||

Sbjct 1522 TCATCTCTGGCATGTGCAAGGTTTCATGCGATGGACAAAGCTGAGGAGGTTCTTCAACAGA 1581  
Query 1181 TGCCTGATAGAGGAATTCTGCCAAATGTTGCCACGTATACTAGTCTAATACATGGATATT 1240

```

|||||
Sbjct 1582 TGCTTGATAGAGGAATTCTGCCAAATGTTGCCACGTATACTAGTCTAATACATGGATATT 1641
Query 1241 TTTCATTAGGACAGTGCAAAGAGGTGGATCGGATTTTCAAAGAAATGTCTAGAAATGGTG 1300
|||||
Sbjct 1642 TTTCATTAGGACAGTGCAAAGAGGTTGATCGGATTTTCAAAGAAATGTCTAGAAATGGTG 1701
Query 1301 TTCAACCAAATGTTGTAACCTATAATATACAGATGGATTATCTTTGCAAGAATGGAAGAT 1360
|||||
Sbjct 1702 TTCAACCAAATATTTTAACTTACAATATACAGATGGATTATCTTTGCAAGAATGGAAGAT 1761
Query 1361 GCGCAGAAGCTAGGAAGATTTTGGATTCCATGGTCAGTTTGGGCCAAAAACCGACTGTTA 1420
|||||
Sbjct 1762 GCGCAGAAGCTAGGAAGATTTTGGATTCCATGGTCAGTTTGGGCCAAAAACCGACTGTTA 1821
Query 1421 CTACCTACAGCATTGCTTCATGGGTATGCTCTGGAACGATCTTTTCATGAGATACATT 1480
|||||
Sbjct 1822 CTACCTACAGCATTGCTTCATGGGTATGCTCTGGAACGATCTTTTCATGAGATGCATT 1881
Query 1481 GTCTCATTGATTTGATGGTGGGAAATGGTATTGCGCCAAATCATTTTCTCTACAACATAC 1540
|||||
Sbjct 1882 GTCTCATTGATTTGATGGTGGGAAATGGTATTGCGCCAAATCATTTTCTCTACAACATAC 1941
Query 1541 TCATATCTGCATATGCTAAAGAAGAAATGATTGGTGAAGTAATGCATATATTTaaaaaaa 1600
|||||
Sbjct 1942 TCATATCTGCATGTGCTAAAGAAGAAATGATTGGTGAAGTAATGCATATATTTAAAAAAA 2001
Query 1601 TGCGGCAGCATGGATTGAACCCTAATGTAGCGACCTATGGAGCGGTAGTAAACTTACTTT 1660
|||||
Sbjct 2002 TGCGGCAGCATGGATTGAACCCTAATGTAGTGACCTATGGAGCGGTAGTAAACTTACTTT 2061
Query 1661 CCAAGATTGGCCGAATGGATGATGCTATGTCCCAATTC AATCAAATGATAACTGAAGGGT 1720
|||||
Sbjct 2062 CCAAGATTGGCCGAATGGATGATGCTATGTCCCAATTC AATCAAATGATAACTGAAGGGT 2121
Query 1721 TAGCTCCTGATATCATAGTTTTACCCTCCTTATTAGTGGTTTCTGTTCTTGTGGCAAAT 1780
|||||
Sbjct 2122 TAGCTCCTGATATCATAGTTTTACCCTCCTTATTAGTGGTTTCTGTTCTTGTGGCAAAT 2181
Query 1781 GGGAGAAGGTTGATGAACTATTTTCTGAGATGTTGGATCGCGGCATCTGTCCCAACACAG 1840
|||||
Sbjct 2182 GGGAGAAGGTTGATGAACTATTTTCTGAGATGTTGGATCGCGGCATCTATCCCAACACAG 2241

```

Query 1841 TGTTCCTTCAACATAATTATGGACTGCCTCTGCAAAAATGAAAGGGTTATGGAAGCCCAAG 1900  
|||||  
Sbjct 2242 TGTTCCTTCAACACAATTATGGACTGCCTTTGCAAAAATGAAAGGGTTATGGAAGCCCAAG 2301  
Query 1901 ATCTCTTCGACCTGATGGTACACATGGGTGTGAAGCCTGATGTGTGTACTTATAACACAC 1960  
|||||  
Sbjct 2302 ATCTCTTCGATCTGATGGTACACATGGGTGTGAAGCCTGATGTGTGTACTTATAACACAC 2361  
Query 1961 TGATAGGTGGATACTTGTTCATTGGTAAGATGGATGAAGTGAGGAAGTTACTTGACAATA 2020  
|||||  
Sbjct 2362 TGATAGGTGGATACTTGTTCATTGGTAAGATGGATGAAGTGAGGAAGTTACTTGACAATA 2421  
Query 2021 TGGTCTCAATTGGCTTGAAACCAAATGTTATCACATATAGCATACTGATTGATGGTTACT 2080  
|||||  
Sbjct 2422 TGGTCTCAATTGGCTTGAAACCAAATGTTATTACATATAGCATACTGATTGATGGTTACT 2481  
Query 2081 CTAAGAATGGAAGCATAGATGATGCATTGGTTGTTTCCAGGGAAATGTTGGCCGGGAAGG 2140  
|||||  
Sbjct 2482 CTAAGAATGGAAGGATAGATGATGCATTGGTTGTTTCCAGGGAAATGTTGGCCGGGAAGG 2541  
Query 2141 TTAAGCCTTGTGTTATCACTTTTAATATTATGATTGGTGCATTGCTTAAATGTGGCAGGA 2200  
|||||  
Sbjct 2542 TTAAGCCTTGTGTTATCACTTTTAATATTATGATTGGTGCATTGCTTAAATGTGGCAGGA 2601  
Query 2201 AGGCAGAAGCCAAAGATTTGTTTGACGGTATCTGGGCCAACGGATTAGTGCCCGATGTTA 2260  
|||||  
Sbjct 2602 AGGCAGAAGCCAAAGATTTGTTTGACGGTATCTGGGCCAACGGATTAGTGCCCGACGTTA 2661  
Query 2261 TTACATATAGCTTAATGATACAAAACCTTATTGAAGAAGGTCTCTACAAGAGTCTGATG 2320  
|||||  
Sbjct 2662 TTACATATAGCTTAATGATACAAAACCTTATTGAAGAAGGTCTCTACAAGAGTCTGATG 2721  
Query 2321 ATCTATTCCCTTTCTATGGAGAAGAATGGATGTGTTGCCGACTCCCATATGCTAAATGCTA 2380  
|||||  
Sbjct 2722 ATCTATTCCCTTTCTATGGAGAAGAATGGATGTGTTGCCGACTCCCATATGCTAAATGCTA 2781  
Query 2381 TAGTTAGAAGCTTACTTCAGAAAGGGGAGGTGCCAAGGGCTGGGACTTATCTGTCTAAAA 2440  
|||||  
Sbjct 2782 TAGTTAGAAGCTTACTTCGAAAGGGGAGGTGCCAAGGGCTGGGACTTATCTGTCTAAAA 2841  
Query 2441 TTGATGAGAGGAGGTTTACCTTTGAAGCTTCCACAGCTAGCTTGTGGTTGCACTTGCGT 2500  
|||||



# Фиг. 4B

```
RFL120-17F3R-0377_1 -----NIKARYHAGDIGTEDALHLFDELLOVAGRSSIHAINCLLTVVGRD
RFL120-L13_1 MSRRFVPVGRRILEQNIKARYHAGDIGTEDALHLFDELLOVAGRSSIHAINCLLTVVGRD
RFL120-R113_1 MSRRFVPVGRRILEQNIKARYHAGDIGTEDALHLFDELLOVAGRSSIHAINCLLTVVGRD
RFL120-timo_1 MSRRFVPVGRRILEQNIKARYHAGDIGTEDALHLFDELLOVAGRSSIHAINCLLTVVGRD
RFL120-GSTR435_1 MSRRFVPVGRRILEQNIKARYHAGDIGTEDALHLFDELLOVAGRSSIHAINCLLTVVGRD
*****

RFL120-17F3R-0377_1 CPALGVSLFNRRVARAKVAPCSITYAILVDCCCRTRGRQDLGFAAMGHVIKMGFTADAMITF
RFL120-L13_1 CPALGVSLFNRRVARAKVAPCSITYAILVDCCCRTRGRQDLGFAAMGHVIKMGFTADAMITF
RFL120-R113_1 CPALGVSLFNRRVARAKVAPCSITYAILVDCCCRTRGRQDLGFAAMGHVIKMGFTADAMITF
RFL120-timo_1 CPALGVSLFNRRVARAKVAPCSITYAILVDCCCRTRGRQDLGFAAMGHVIKMGFTADAMITF
RFL120-GSTR435_1 CPALGVSLFNRRVARAKVAPCSITYAILVDCCCRTRGRQDLGFAAMGHVIKMGFTADAMITF
*****:*****:*****

RFL120-17F3R-0377_1 SHLLKAICAENKTSYAMDIVLRIMPVFNCPDVFSYNILFKGLCNEKRSQEALELIQVMV
RFL120-L13_1 SHLLKAICAENKTSYAMDIVLRIMPVFNCPDVFSYNILFKGLCNEKRSQEALELIQVMV
RFL120-R113_1 SHLLKAICAENKTSYAMDIVLRIMPVFNCPDVFSYNILFKGLCNEKRSQEALELIQVMV
RFL120-timo_1 SHLLKAICAENKTSYAMDIVLRIMPVFNCPDVFSYNILFKGLCNEKRSQEALELIQVMV
RFL120-GSTR435_1 SHLLKAICAENKTSYAMDIVLRIMPVFNCPDVFSYNILFKGLCNEKRSQEALELIQVMV
*****:*****:*****

RFL120-17F3R-0377_1 EHGGRCPDQVVSYSTVIDGLLKEGLVGKVIILFCEMIQRGISPNAVITYNSIISGMCKVHA
RFL120-L13_1 EHGGRCPDQVVSYSTVIDGLLKEGLVGKVIILFCEMIQRGISPNAVITYNSIISGMCKVHA
RFL120-R113_1 EHGGRCPDQVVSYSTVIDGLLKEGLVGKVIILFCEMIQRGISPNAVITYNSIISGMCKVHA
RFL120-timo_1 EHGGRCPDQVVSYSTVIDGLLKEGLVGKVIILFCEMIQRGISPNAVITYNSIISGMCKVHA
RFL120-GSTR435_1 EHGGRCPDQVVSYSTVIDGLLKEGLVGKVIILFCEMIQRGISPNAVITYNSIISGMCKVHA
**** ***** *.*.* *****:.*:***.*.*****:**

RFL120-17F3R-0377_1 MDKAEQVLQMPDRGILPNVATYTSLIHGYSFSLGQCKEVDRIFKEMSRNGVQPNVVITYNI
RFL120-L13_1 MDKAEQVLQMPDRGILPNVATYTSLIHGYSFSLGQCKEVDRIFKEMSRNGVQPNVVITYNI
RFL120-R113_1 MDKAEQVLQMPDRGILPNVATYTSLIHGYSFSLGQCKEVDRIFKEMSRNGVQPNVVITYNI
RFL120-timo_1 MDKAEQVLQMPDRGILPNVATYTSLIHGYSFSLGQCKEVDRIFKEMSRNGVQPNVVITYNI
RFL120-GSTR435_1 MDKAEQVLQMPDRGILPNVATYTSLIHGYSFSLGQCKEVDRIFKEMSRNGVQPNVVITYNI
*****:***** *****:*****

RFL120-17F3R-0377_1 QMDYLCKNGRCAEARKIFDSMVSLGQKPTVTTYSILLHGYALERSFHEIHCLIDLTVVGRD
RFL120-L13_1 QMDYLCKNGRCAEARKIFDSMVSLGQKPTVTTYSILLHGYALERSFHEIHCLIDLTVVGRD
RFL120-R113_1 QMDYLCKNGRCAEARKIFDSMVSLGQKPTVTTYSILLHGYALERSFHEIHCLIDLTVVGRD
RFL120-timo_1 QMDYLCKNGRCAEARKIFDSMVSLGQKPTVTTYSILLHGYALERSFHEIHCLIDLTVVGRD
RFL120-GSTR435_1 QMDYLCKNGRCAEARKIFDSMVSLGQKPTVTTYSILLHGYALERSFHEIHCLIDLTVVGRD
*****:*****

RFL120-17F3R-0377_1 IAPNHFLYNILISAYAKEEMIGEVMHIFKKMRQHGLNPNVATYGAVVNLLSKI GRMDDAM
```

RFL120-L13\_1 IAPNHFLYNILISAYAKEEMIGEVMHIFKKMRQHGLNPNVATYGAVVNLLSKI GRMDDAM  
RFL120-R113\_1 IAPNHFLYNILISAYAKEEMIGEVMHIFKKMRQHGLNPNVATYGAVVNLLSKI GRMDDAM  
RFL120-timo\_1 IAPNHFLYNILISAYAKEEMIGEVMHIFKKMRQHGLNPNVATYGAVVNLLSKI GRMDDAM  
RFL120-GSTR435\_1 IAPNHFLYNILISACAKEEMIGEVMHIFKKMRQHGLNPNVVTYGAVVNLLSKI GRMDDAM  
\*\*\*\*\*  
RFL120-17F3R-0377\_1 SQFNQMITEGLAPDIIVFTLLISGFCSGKWEKVDL FSEMLDRGICPNTVFFNIIMDCL  
RFL120-L13\_1 SQFNQMITEGLAPDIIVFTLLISGFCSGKWEKVDL FSEMLDRGICPNTVFFNIIMDCL  
RFL120-R113\_1 SQFNQMITEGLAPDIIVFTLLISGFCSGKWEKVDL FSEMLDRGICPNTVFFNIIMDCL  
RFL120-timo\_1 SQFNQMITEGLAPDIIVFTLLISGFCSGKWEKVDL FSEMLDRGICPNTVFFNIIMDCL  
RFL120-GSTR435\_1 SQFNQMITEGLAPDIIVFTLLISGFCSGKWEKVDL FSEMLDRGIYPNTVFFNTIMDCL  
\*\*\*\*\*  
RFL120-17F3R-0377\_1 CKNERVMEAQDLFDLMVHMVGKPDVCTYNTLIGGYLFIGKMDEV RKLLDNMVSIGLKPNV  
RFL120-L13\_1 CKNERVMEAQDLFDLMVHMVGKPDVCTYNTLIGGYLFIGKMDEV RKLLDNMVSIGLKPNV  
RFL120-R113\_1 CKNERVMEAQDLFDLMVHMVGKPDVCTYNTLIGGYLFIGKMDEV RKLLDNMVSIGLKPNV  
RFL120-timo\_1 CKNERVMEAQDLFDLMVHMVGKPDVCTYNTLIGGYLFIGKMDEV RKLLDNMVSIGLKPNV  
RFL120-GSTR435\_1 CKNERVMEAQDLFDLMVHMVGKPDVCTYNTLIGGYLFIGKMDEV RKLLDNMVSIGLKPNV  
\*\*\*\*\*  
RFL120-17F3R-0377\_1 ITYSILIDGYSKNGSIDDALVVSREMLAGKVKPCVITFNIMIGALLKCGRKA EAKDLFDG  
RFL120-L13\_1 ITYSILIDGYSKNGSIDDALVVSREMLAGKVKPCVITFNIMIGALLKCGRKA EAKDLFDG  
RFL120-R113\_1 ITYSILIDGYSKNGSIDDALVVSREMLAGKVKPCVITFNIMIGALLKCGRKA EAKDLFDG  
RFL120-timo\_1 ITYSILIDGYSKNGSIDDALVVSREMLAGKVKPCVITFNIMIGALLKCGRKA EAKDLFDG  
RFL120-GSTR435\_1 ITYSILIDGYSKNGRIDDALVVSREMLAGKVKPCVITFNIMIGALLKCGRKA EAKDLFDG  
\*\*\*\*\*  
RFL120-17F3R-0377\_1 IWANGLVPDVI TYSLMIQKLI EEGSLQESDDLFLSMEKNGCVADSHMLN AIVRSLLQKGE  
RFL120-L13\_1 IWANGLVPDVI TYSLMIQKLI EEGSLQESDDLFLSMEKNGCVADSHMLN AIVRSLLQKGE  
RFL120-R113\_1 IWANGLVPDVI TYSLMIQKLI EEGSLQESDDLFLSMEKNGCVADSHMLN AIVRSLLQKGE  
RFL120-timo\_1 IWANGLVPDVI TYSLMIQKLI EEGSLQESDDLFLSMEKNGCVADSHMLN AIVRSLLQKGE  
RFL120-GSTR435\_1 IWANGLVPDVI TYSLMIQKLVEEGSLQESDDLFLSMEKNGCVADSHMLN AIVRSLLRKGE  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*  
RFL120-17F3R-0377\_1 VPRAGTYLSKIDERRFTFEASTASLLVALASGRKSQEYKELLPEKYHYFLEEGTD  
RFL120-L13\_1 VPRAGTYLSKIDERRFTFEASTASLLVALASGRKSQEYKELLPEKYHYFLEEGTD  
RFL120-R113\_1 VPRAGTYLSKIDERRFTFEASTASLLVALASGRKSQEYKELLPEKYHYFLEEGTD  
RFL120-timo\_1 VPRAGTYLSKIDERRFTFEASTASLLVALASGRKSQEYKELLPEKYHYFLEEGTD  
RFL120-GSTR435\_1 VPRAGTYLSKIDERSFTLEASTASLLTALASGGKGQEYKGLLPENYHSFLE----  
\*\*\*\*\* \*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\* \*.\*\*\*\* \*:\*\* \*\*

RFL29a MPRFSSTTPMSPPRLR--LRLCARHSSSTSHPSRIWDPHAAFAAAAQRASSGTLTTEDAH  
RFL29b MPRFSSTTPMSPPRLRLRLRLCARHSSSTSHPSRIWDPHAAFAAAAQRASSGTLTTEDAH  
RFL29c\_1 MPRFSSTTPMSPPRLR--LRLCARHSSCTSHPSRIWDPHAAFAAAAQRASSGTLTTEDAH  
RFL29c\_2 -----

RFL29a HLFDPELLRRGNPVQERPLNKFLAALARAPASASCCDGPALAVALFGRLSRDVGRRVAQPN  
RFL29b HLFDPELLRRGNPVQERPLNKFLAALARAPASASCCDGPALAVTLFGRLSRDVGRRVAQPN  
RFL29c\_1 HLFDPELLRRGNPVQERPLNKFLAALARAPASASCCDGPALAVALFGRLSQDVRRRVAQPN  
RFL29c\_2 -----

RFL29a VFTYGVLMDCCCRACRTDLVLAFFGRLLKTGLEANQVVFNTLLKGLCHTKRADEALDVLL  
RFL29b VFTYGVLMDCCCRACRTDLVLAFFGRLLKTGLEANQVVFNTLLKGLCHTKRADEALDVLL  
RFL29c\_1 VFTYGVLMDCCCRACRTDLAFAFFGRLLKTGLEANQVVFNTLLKGLCHTKRADEALDVLL  
RFL29c\_2 -----

RFL29a HRMPELGCTPNWAYNTVIHGFFKEGHVSKACNLFHEMAQQGVKPNVVTYNSVIDALCKA  
RFL29b HRMPELGCTPNWAYNTVIHGFFKEGHVSKACNLFHEMAQQGVKPNVVTYNSVIDALCKA  
RFL29c\_1 HRMPELGCTPDVWAYNTVIHGFFKEGHVSKACNLFHEMAQQGVKPNVVTYNSVIDALCKA  
RFL29c\_2 -----

RFL29a RAMDKAEVWLRQMIDDGVGPDNVTYSSLIHGYSSSGHWKEAVRVFKEMTSRRVTADVHTY  
RFL29b RAMDKAEVWLRQMIDDGVGPDNVTYSSLIHGYSSSGHWKEAVRVFKEMTSRRVTADVHTY  
RFL29c\_1 RAMDKAEVWLRQMIDDGVGP-----  
RFL29c\_2 -----MMVLDLNVTYSSLIHGYSSSGHWKEAVRVFKEMTSRRVTADVHTY

RFL29a NMFMTFLCKHGRSKEAAGIFDTMAIKGLKPDNVSYAILLHGAAEGCLVDMINLFNMSER  
RFL29b NMFMTFLCKHGRSKEAAGIFDTMAIKGLKPDNVSYAIRLHGAYATEGCLVDMINLFNMSAT  
RFL29c\_1 -----  
RFL29c\_2 NMFMTFLCKHGRSKEAAGIFDTMAIKGLKPDNVSYAILLHGAAEGCLVDMINLFNMSER

RFL29a DCILPDCRIFNILINAYAKSGKLDKAMLIFNEMQKQGVSPNAVITYSTVIHAFCKKGRLLDD  
RFL29b HCILPNCHIFNILINAYAKSGKLDKAMLIFNEMQKQGVSPNAVITYSTVIHAFCKKGRLLDD  
RFL29c\_1 -----  
RFL29c\_2 DCILPDCRIFNILINAYAKSGKLDKAMLIFNEMQKQGVSPNAVITYSTVIHAFCKKGRLLDD

RFL29a AVIKFNQMIDTGVRPDASVYRPLIQGFCTHGDLVKAKEYVTEMMKKGMPDPDIMFFSSIM  
RFL29b AVIKFNQMIDTGVRPDASVYRPLIQGFCTHGDLVKAKEYVTEMMKKGMPDPDIMFFSSIM  
RFL29c\_1 -----  
RFL29c\_2 AVIKFNQMIDTGVRPDASVYRPLIQGFCTHGDLVKAKEYVTEMMKKGMPDPDIMFFSSIM

RFL29a QNLCTEGRVTEARDILDILVHIGMRPNVIIIFNLLIGGYCLVRKMADALKVFDDMVSYGLE  
RFL29b QNLCTEGRVTEARDILDILVHIGMRPNVIIIFNLLIGGYCLVRKMADALKVFDDMVSYGLE  
RFL29c\_1 -----  
RFL29c\_2 QNLCTEGRVTEARDILDILVHIGMRPNVIIIFNLLIGGYCLVRKMADALKVFDDMVSYGLE

RFL29a PCNFTYGILINGYCKNRRIDDGLILFKEMLHKGLKPTTFNYNVILDGLFLAGQTVAAKEK  
RFL29b PCNFTYGILINGYCKNRRIDDGLILFKEMLHKGLKPTTFNYNVILDGLFLAGQTVAAKEK  
RFL29c\_1 -----  
RFL29c\_2 PCNFTYGILINGYCKNRRIDDGLILFKEMLHKGLKPTTFNYNVILDGLFLAGQTVAAKEK

RFL29a FDEMVESGVSVCIDTYSIILGGLCRNSCSSEAITLFRKLSAMNVKFDITIVNIIIGALYR  
RFL29b FDEMVESGVSVCIDTYSIILGGLCRNSCSSEAITLFRKLSAMNVKFDITIVNIIIGALYR  
RFL29c\_1 -----  
RFL29c\_2 FDEMVESGVSVCIDTYSIILGGLCRNSCSSEAITLFRKLSAMNVKFDITIVNIIIGALYR

RFL29a VERNQEAKDLFAAMPANGLVPNAVITYVMMTNLIKEGSVEEADNLFLSMEKSGCTANSCL  
RFL29b VERNQEAKDLFAAMPANGLVPNAVITYVMMTNLIKEGSVEEADNLFLSMEKSGCTANSCL  
RFL29c\_1 -----  
RFL29c\_2 VERNQEAKDLFAAMPANGLVPNAVITYVMMTNLIKEGSVEEADNLFLSMEKSGCTANSCL

RFL29a LNHIIRRLLEKGEIVKAGNYMSKVDAKSYSLEAKTVSLLISLFSRKGKYREHIKLLPTKY  
RFL29b LNHIIRRLLEKGEIVKAGNYMSKVDAKSYSLEAKTVSLLISLFSRKGKYREHIKLLPTKY  
RFL29c\_1 -----  
RFL29c\_2 LNHIIRRLLEKGEIVKAGNYMSKVDAKSYSLEAKTVSLLISLFSRKGKYREHIKLLPTKY

RFL29a QFLEEAATVE  
RFL29b QFLEEAATVE  
RFL29c\_1 -----  
RFL29c\_2 QFLEEAATVE

Фиг. 5А

## Фиг. 5В

RFL164a MPGFSSAASMSPLRLRLRLHARHSS-ASQPSRRQGWDPHAAFAAATECARSGNLTPEDAH  
 RFL164b MPGFSSAASMSPLRLRLRLHARHSSASQPSRRQGWDPHAAFAAATECARSGNLTPEDAH

RFL164a NLFDELLRQGNPVLGRPLNLLAALARAPASSACRDGPALVVALFSRISQGARLRVLHPT  
 RFL164b HLFDELLRQGNPVLGRPLNLLAALARAPASSACRDGPALAVLFSRISQGARLRVLHPT

RFL164a ACTYGILMDCSCRAHRLDLAFAFFGRLRLRTGLKAGVIEVNSLLKGLCHAKRADEAMEVLL  
 RFL164b ACTYGILMDCSCRAHRLDLAFAFFGRLRLRTGLKAGVIEVNSLLKGLCHAKRADEAMEVLL

RFL164a HRMPELFIGVQGTAVYRSLIQGFCTHGDLVKAKEYVTEMMKKGMPDIMPFFSSIMQNLC  
 RFL164b HRMPELFIGVQGTAVYRSLIQGFCTHGDLVKAKEYVTEMMKKGMPDIMPFFSSIMQNLC

RFL164a TEGRVIEARDILDIVRIGMRPDVIFNILIGGYCLVGKMEDASKIFDDMVSYGLEPCNF  
 RFL164b TEGRVIEARDILDIVRIGMRPDVIFNILIGGYCLVGKMEDASKIFDDMVSYGLEPCNF

RFL164a TYGILINGYCKNKRIDDGLILFKEMLRKGLKPTTFNYNVILDGLFLAGQTVAAKEKFDDEM  
 RFL164b TYGILINGYCKNKRIDDGLILFKEMLRKGLKPTTFNYNVILDGLFLAGQTVAAKEKFDDEM

RFL164a VESGVSVCIDTYSIVLGGLCRNSCSSEAITLF-----  
 RFL164b VESGVSVCIDTYSIVLGGLCRNSCSSEAITLFRKLSAMNVKFNITIVNTIIGAFYRVERN

RFL164a -----  
 RFL164b QEAKDLFAAIPASGLVNPVWVYTIMIKNLIKEGSVEEADNLFLSMEKSGCSANSYLLNHI

RFL164a -----  
 RFL164b IRRLLEKGEIVKAGNYMSKVDKSYSLEAKTVSLLISLFSRKGKYREHIKLLPTKYQFLE

|  
 RFL164a -----  
 RFL164b EAATVE

## Фиг. 5С

RFL166a MPRLSSTTPMSPRLRLRLRGRHSSSTSHPSRIWDPHAAFAGATQRAHSGNLTPEDAHHL  
 RFL166b -----

RFL166a FDELLRQGNPVQERPLTNFLAALARAPASASCSDGPALAVALFGRLSRGAGRRVAQPNVF  
 RFL166b -----

RFL166a TYGVLMDCCCRCRCPDLALAFFGRLFRKGLEANRVIFCTLLKGLCHAKRTDEALDVLLHR  
 RFL166b -----

RFL166a MPELGCTPNVVAYTTVIHGFFKEGQVGKACNLFHGMAQQGVAPNLVTYNSVIDALCKAKA  
 RFL166b MPELGCTPNVVAYTTVIHGFFKEGQVGKACNLFHGMAQQGVAPNLVTYNSVIDALCKAKA

RFL166a MDKAEYFLGQMVDDGVWPDNVTYNSLIHGYSSSGHWKEAVRVFKEMTSRRVTADVHTYNM  
 RFL166b MDKAEYFLGQMVDDGVWPDNVTYNSLIHGYSSSGHWKEAVRVFKEMTSRRVTADVHTYNM

RFL166a FMTFLCKHGRSKEAAGIFDTMAIKGLKPDNVSYAILLHGYATEGCLVDMINLFNSMERDC  
 RFL166b FMTFLCKHGRSKEAAGIFDTMAMKGLKPDNVSYAILLHGYATEGCLVDMINLFNSMERDC

RFL166a ILPDCRIFNILINAYAKSGKLDKAMLIFNEMQKQGVSPNAVTYSTVIHTFCCKGRLLDDAV  
 RFL166b ILPDCRIFNILINAYAKSGKLDKAMLIFNEMQKQGVSPNAVTYSTVIDAFCKKGQLDDAM

RFL166a IKFNQIMIDTGVRQGTAVYGSLIQGFCTHGDLVKAKELLTEMMNKGMLPPDIKFFHSIMQN  
 RFL166b IKFNQIMIDTGVRQGTAVYGSLIQGFCTHGDLVKAKELLTEMMNKGMLPPDIKFFHSIMQN

RFL166a LCTEGRVIEARDVLGLIAHIGMRPDVCTFNILIGGYCLVGKMEDASKIFDDMMSYGLEPS  
 RFL166b LCTEGRVIEARDVLGLIAHIGMRPDVCTFNILIGGYCLVGKMEDASKIFDDMMSYGLEPS

RFL166a NC-----  
 RFL166b NITYGILINGYCKNRRIDDGLILFKEMLHKGLKPTTFNYNIILDGLLLAGRTVAAKEKFN

## Фиг. 6

RFL29a\_5UTR CTCCGTCCGAAAATACTTGTCGAAGAATTTGATGAAAATGGATGCATCTAGAACAAGAAT  
 RFL29b\_5UTR CTCCGTCCGAAAATACTTGTCGAAGAATTTGATGAAAATGGATGCATCTAGAACAAGAAT

RFL29a\_5UTR ACATCTAGATACATCAATCTCCCCGACAAGTATTTCCGAACGGAGGGAGTACTAGATAAT  
 RFL29b\_5UTR ACATCTAGATACATCAATCTCCCTGACAAGTATTTCCGAGCGGAGGGAGTACTAGATAAT

RFL29a\_5UTR A-----  
 RFL29b\_5UTR ACTCCCTCCGTTCTAAATAATTGTCTTTCTAGCTATCTCAAATAAACTACAACATACGG

RFL29a\_5UTR -----  
 RFL29b\_5UTR ATGTATGTAGACATGTTTTAGAGTGTAGATTCACCTCATTTTGTTCGGTATGTAGTCATTT

RFL29a\_5UTR -----AGATAACTATCCAAAA  
 RFL29b\_5UTR GTTGAAATCTCTAGAGAGACAATTATTTAGGAACGGAGGGAGTAAGATAACTACCC-TAA

RFL29a\_5UTR AAAAAAAGATAACTGAAGGTTGCCACCTAGCACATTACATTGGTACAACCTTGGAAAAGC  
 RFL29b\_5UTR AAAAAAAGATAACTGAAGGTTGCCACCTAGCACATTACATTGGTACAACCTTGGAAAAGC

RFL29a\_5UTR ACAGCCCCGTCGTCCTGCTCCCAGTTGAGTTCGCGACCTACACACCGGCC  
 RFL29b\_5UTR ACAGCCCCGTCGTCCTGCTCCCAGTTGAGTTCGCGACCTACACACCGGCC

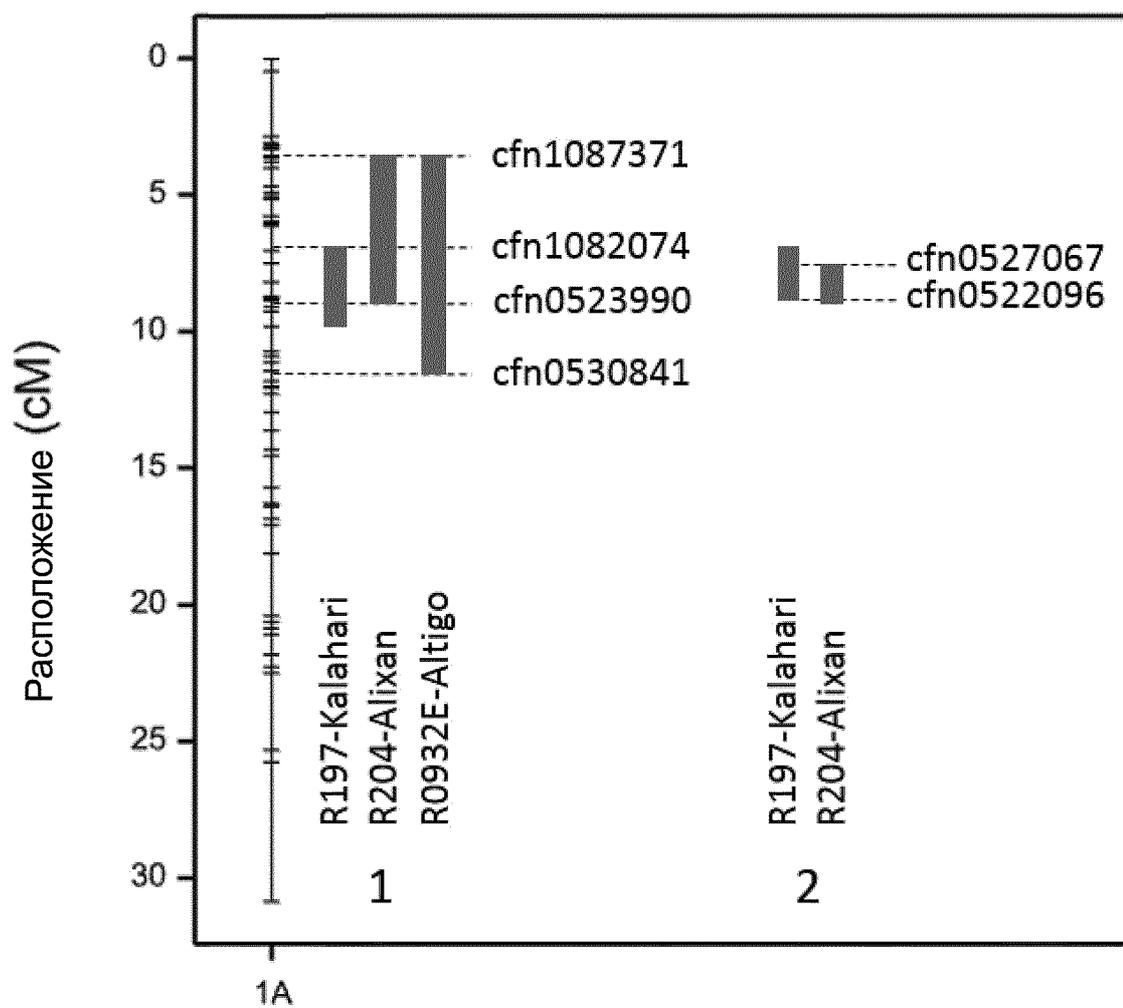
17/28

```

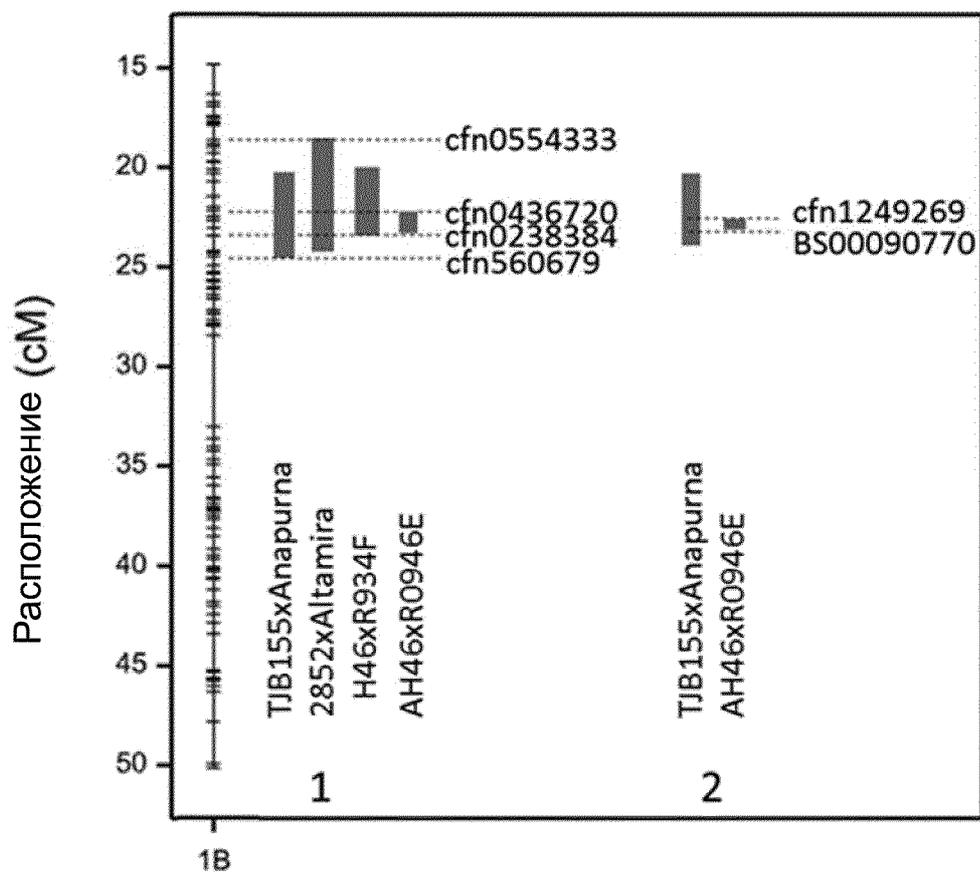
NGG_100_14
.....
promPFL29b_sRNA_extra_100
.....
TTTT_100_23
.....
promPFL29b_sRNA
1861 TACTCAATC TCCGAGCA GATTTCGA GCGAGGGAG TACTAGTAA TA
ATCTACTTAG AGGACTGCT CATRAGGCT CCGTCCCTC ATGACTATT AT
.....
TTTT_100_42
.....
TTTT_100_41
.....
NGG_100_63
.....
NGG_100_98
.....
TTTT_100_67
.....
NGG_100_54
.....
NGG_100_55
.....
NGG_100_103
.....
NGG_100_104
.....
promPFL29b_sRNA_extra_100
.....
promPFL29b_sRNA
1911 ..... AGATA ACTACCTAA AAAAAGAT ACTGAGGT TCCACTAG
..... ACTAT TGAGGATT TTTTTCIA TTAGCTTCA AGGAGATC
.....
NGG_100_105
.....

```

Φ NL 7



Фиг. 8



ФИГ. 9

Фиг. 10А

ID маркера	Расположение относительно точно-картированного интервала	Физическое расположение
cfn0523072	Left	13857528
cfn0523109	Left	14161545
276113_96B22_97797	Left	14184332
Cfn0522096	Interval	14505168
cfn0527763	Interval	14550727
104A4_105172	Interval	14603881
104A4_105588	Interval	14604601
cfn0373248	Interval	14620761
cfn1097828	Interval	15052112
Cfn0527067	Interval	15346090
cfn0528390	right	16373906
BWS0267	right	16389969
cfn0527718	right	16409826
cfn0524469	right	17257737
cfn0524921	right	18291418
cfn1122326	right	20205981

КОД	R: восстановитель/ M: закрепитель	Аллели Rf	cfn0523072	cfn0523109	z10112_90bzz_97797	cfn0527763	104A4_105172	104A4_105588	cfn0373248	cfn1097828	cfn0528390	BWS0267	cfn0527718	cfn0524469	cfn0524921	cfn1122326
R197	R	Гомозиготный Rf1, rf3, Rf7	T	A	C	C	TG	A	T	C	G	A	T	G	G	C
R204	R	Гомозиготный Rf1, rf3, Rf7	T	A	C	C	TG	A	T	C	G	A	T	G	G	C
R0932E	R	Гомозиготный Rf1, rf3, ff7	T	A	C	C	TG	A	T	C	G	A	T	G	G	C
LGWR16-0016	R	Гомозиготный Rf1, Rf3, Rf7	C	A	C	C	TG	A	T	C	G	A	C	G	G	C
LGWR16-0026	R	Гомозиготный Rf1, Rf3, Rf7	C	A	C	C	TG	A	T	C	G	A	C	G	G	C
AIGLE	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	T	C	T	C	-	C	T	C	A	G	T	-	A	T
AIRBUS	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	T	A	T	C	CA	C	T	C	G	G	T	-	A	T
ALHAMBR A	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	T	C	T	C	-	C	T	C	A	G	T	T	A	T

Фиг. 10B

КОД	R: восстано- витель/ M: закрепи- тель		cfn0523072	Аллеби cfn0523109	270112_90BZZ_ 97797	cfn0527763	104A4_105172	104A4_105588	cfn0373248	cfn1097828	cfn0528390	BWS0267	cfn0527718	cfn0524469	cfn0524921	cfn1122326
ALIXAN	M	Гомозиготный s rf1, rf3, rf7	T	-	T	T	CA	C	T	T	A	G	T	-	A	T
AMADEUS	M	Гомозиготный s rf1, rf3, rf7	T	A	T	T	CA	C	T	T	G	A	T	-	A	T
ANAPURN A	M	Гомозиготный s rf1, rf3, rf7	T	C	T	C	-	C	T	C	A	H	T	-	A	T
APACHE	M	Гомозиготный s rf1, rf3, rf7	T	A	T	T	CA	C	T	T	G	G	T	-	A	T
ARKEOS	M	Гомозиготный s rf1, rf3, rf7	T	C	T	T	CA	C	T	T	A	G	T	-	A	T
ARLEQUIN	M	Гомозиготный s rf1, rf3, rf7	T	A	T	T	CA	C	T	T	G	G	T	-	A	T
ARTDECO	M	Гомозиготный s rf1, rf3, rf7	T	C	T	C	-	C	T	C	A	G	T	T	H	T
ARTURNIC K	M	Гомозиготный s rf1, rf3, rf7	T	C	T	T	CA	C	T	T	H	G	T	G	A	T

22/28

Фиг. 10С

КОД	R: восстано- витель/ M: закрепи- тель	Аллели Rf	cfn0523072	cfn0523109	Z70115_90BZZ_ 97797	cfn0527763	104A4_105172	104A4_105588	cfn0373248	cfn1097828	cfn0528390	BWS0267	cfn0527718	cfn0524469	cfn0524921	cfn1122326
ATOMO	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	T	C	T	T	CA	C	T	C	G	A	T	G	A	T
AVENUE	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	T	C	T	C	-	C	T	C	A	G	T	-	A	T
CEZANNE	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	T	A	T	T	CA	C	T	T	G	A	T	-	A	T
CROISADE	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	C	A	T	-	-	C	A	-	G	A	C	G	G	C
FRUCTIDO R	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	T	A	T	T	CA	C	T	T	G	G	T	-	A	T
GAZUL	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	T	A	T	T	CA	C	T	T	A	G	T	T	A	T
HERMANN	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	T	C	T	C	CA	C	T	C	G	H	C	-	H	T
HORATIO	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	C	C	T	C	-	C	T	C	A	G	T	T	A	C
KALAHARI	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	T	C	T	C	-	C	T	C	A	G	T	T	A	T

23/28

Фиг. 10D

Названия маркеров	Расположение относительно точно-картированного интервала	Физическое расположение
cfn1252000	Left	1670498
IWB14060*	Left	1762323
Cfn1249269	Interval	1778039
219K1_166464	Interval	1789599
219K1_158251	Interval	1789721
219K1_111446	Interval	1796283
219K1_110042	Interval	1796422
219K1_110005	Interval	1796428
219K1_107461	Interval	1796680
219K1_99688	Interval	1797457
219K1_37	Interval	1807903
cfn1270524	Interval	1816050
136H5_3M5_7601	Interval	1823908
cfn1288811	Interval	1825046
136H5_3M5_89176	Interval	1825372
136H5_3M5_89263	Interval	1825378
136H5_3M5_138211	Interval	1826466
cfn0556874	Interval	1842122
136H5_3M5_64154	Interval	1903965
136H5_3M5_68807	Interval	1904430
136H5_3M5_77916	Interval	1905289
cfn1246088	Interval	1984106
cfn1287194	Interval	1991502
cfn1258380	Interval	2012753
IWB72107*	Interval	2058798
_BS00090770	Interval	2058919
cfn1239345	Right	3087865

Фиг. 11А

КОД	R: восстановитель/ M: закрепитель		Аллели Rf	cfm1252000 IWB14060* cfm1249269 219K1_166464 219K1_158251 219K1_111446 219K1_110042 219K1_110005 219K1_107461 219K1_99688 219K1_37 cfm1270524 136H5_3M5_7601 cfm1288811 136H5_3M5_89176 136H5_3M5_89263 136H5_3M5_138211 cfm0556874 136H5_3M5_64154 136H5_3M5_68807 136H5_3M5_77916 cfm1246088 cfm1287194 cfm1258380 IWB72107* BS00090770 cfm1239345																											
	1	R		Гомозиготный rf1, Rf3, rf7	A	G	G	T	G	A	T	C	A	T	C	T	T	G	A	T	T	C	C	G	A	A	G	A	A	T	A
TJB155	1	R	Гомозиготный rf1, Rf3, rf7	A	G	G	T	G	A	T	C	A	T	C	T	T	G	A	T	T	C	C	G	A	A	G	A	A	T	A	
LGWR16-0016	2	R	Гомозиготный rf1, Rf3, Rf7	A	G	G	T	G	A	T	C	A	T	C	T	T	G	A	T	T	C	C	G	A	A	G	A	A	T	A	
LGWR16-0026	3	R	Гомозиготный rf1, Rf3, Rf7	A	G	G	T	G	A	T	C	A	T	C	T	T	G	A	T	T	C	C	G	A	A	G	A	A	T	A	
AIGLE	4	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	G	A	A	C	G	-	T	C	A	-	-	-	C	-	G	C	A	T	C	-	-	C	H	-	G	C	A	
AIRBUS	5	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	G	G	G	C	G	-	T	C	A	-	-	-	C	-	G	C	A	C	T	A	G	C	A	C	G	C	A	
ALHAMBRA	6	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	A	A	A	C	G	-	T	-	A	-	C	-	C	-	G	C	A	T	C	-	-	C	H	-	G	C	A	
ALIXAN	7	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	G	G	G	C	G	-	T	-	A	-	T	-	C	-	G	C	A	C	T	A	G	C	A	C	G	C	-	
AMADEUS	8	M	Гомозиготный rf1, rf3, rf7	G	G	G	C	G	-	T	-	A	-	C	-	C	-	G	C	A	C	T	A	G	C	A	C	G	C	G	

Фиг. 11В

КОД		R: восстановитель/ M: закрепитель	Аллели Rf																												
				cfn1252000	IWB14060*	cfn1249269	219K1_166464	219K1_158251	219K1_111446	219K1_110042	219K1_110005	219K1_107461	219K1_99688	219K1_37	cfn1270524	136H5_3M5_7601	cfn1288811	136H5_3M5_89176	136H5_3M5_89263	136H5_3M5_138211	cfn0556874	136H5_3M5_64154	136H5_3M5_68807	136H5_3M5_77916	cfn1246088	cfn1287194	cfn1258380	IWB72107*	BS00090770	cfn1239345	
ANAPUR NA	9	M	Гомозигот- ный rf1, rf3, rf7	H	G	G	C	G	A	T	H	A	T	C	-	C	G	G	C	A	C	T	A	H	C	H	C	G	T	G	
APACHE	1 0	M	Гомозигот- ный rf1, rf3, rf7	A	G	A	C	G	-	T	T	A	-	-	-	C	-	G	C	A	T	C	-	-	C	H	-	G	C	G	
ARKEOS	1 1	M	Гомозигот- ный rf1, rf3, rf7	G	A	-	T	G	H	H	T	A	-	-	-	C	-	G	C	A	T	C	-	-	C	G	-	G	C	G	
ARLEQUI N	1 2	M	Гомозигот- ный rf1, rf3, rf7	A	G	A	C	G	-	T	-	A	-	-	-	C	-	G	C	A	T	C	-	-	C	H	-	G	C	G	
ARTDEC O	1 3	M	Гомозигот- ный rf1, rf3, rf7	H	A	A	C	-	-	T	-	-	-	-	-	C	-	G	C	A	T	C	-	-	C	H	-	G	C	A	
ARTURNI CK	1 4	M	Гомозигот- ный rf1, rf3, rf7	H	G	G	T	G	A	C	T	A	-	-	A	C	G	G	C	A	C	T	A	G	C	A	C	G	H	H	
ATOMO	1 5	M	Гомозигот- ный rf1, rf3, rf7	A	G	-	T	G	A	C	T	A	-	C	A	C	G	G	C	A	C	T	A	G	C	A	C	G	C	A	
AVENUE	1 6	M	Гомозигот- ный rf1, rf3, rf7	G	G	G	C	-	-	T	-	A	-	-	-	C	-	G	C	A	C	T	A	G	C	A	C	G	C	A	

26/28

Фиг. 11С

КОД		R: восстановитель/ M: закрепитель	Аллели Rf																												
				cfn1252000	IWB14060*	cfn1249269	219K1_166464	219K1_158251	219K1_111446	219K1_110042	219K1_110005	219K1_107461	219K1_99688	219K1_37	cfn1270524	136H5_3M5_7601	cfn1288811	136H5_3M5_89176	136H5_3M5_89263	136H5_3M5_138211	cfn0556874	136H5_3M5_64154	136H5_3M5_68807	136H5_3M5_77916	cfn1246088	cfn1287194	cfn1258380	IWB72107*	BS00090770	cfn1239345	
CEZANN E	17	M	Гомозигот- ный rf1, rf3, rf7	G	G	G	C	G	-	T	-	A	-	-	-	C	-	G	T	T	C	T	A	H	C	A	C	G	C	A	
CROISAD E	18	M	Гомозигот- ный rf1, rf3, rf7	G	G	G	T	G	A	C	T	A	-	-	A	C	G	G	C	A	C	T	A	G	C	A	C	G	C	A	
FRUCTID OR	19	M	Гомозигот- ный rf1, rf3, rf7	-	G	G	T	G	A	C	T	A	-	-	A	C	G	G	C	A	-	T	A	G	C	A	C	G	C	A	
GAZUL	20	M	Гомозигот- ный rf1, rf3, rf7	G	A	A	T	H	-	T	-	A	-	-	T	C	-	G	C	A	-	C	-	-	C	H	-	G	C	A	
HERMAN N	21	M	Гомозигот- ный rf1, rf3, rf7	G	A	G	T	H	-	H	T	C	-	C	-	C	-	G	T	A	C	T	A	G	C	A	C	G	H	G	
HORATIO	22	M	Гомозигот- ный rf1, rf3, rf7	G	A	A	T	G	-	T	T	H	-	-	-	C	-	G	C	A	T	C	-	-	C	H	-	G	C	H	
KALAHAR I	23	M	Гомозигот- ный rf1, rf3, rf7	G	A	G	T	G	-	T	-	H	-	-	-	C	-	G	C	A	C	T	A	G	C	A	C	G	C	A	

FIGURE 11D

## Фиг. 12

RFL29a AGGAAGGCCATGTAAGCAAGGCCTGCAATCTGTTCCATGAAATGGCGCAGCAGGGCGTTA  
RFL29c AGGAAGGCCATGTAAGCAAGGCCTGCAATCTGTTCCATGAAATGGCGCAGCAGGGCGTTA

RFL29a AGCCTAATGTGGTGACATATAACTCAGTTATCGATGCGCTGTGCAAGGCCAGAGCCATGG  
RFL29c AGCCTAATGTGGTGACATATAACTCAGTTATCGATGCGCTGTGCAAGGCCAGAGCCATGG

RFL29a ACAAGGCAGAGGTGGTCCTTCGTCAGATGATTGATGATGGTGTGGACCTGATAATGTGA  
RFL29c ACAAGGCAGAGGTGGTCCTTCGTCAGATGATTGATGATGGTGTTGGACCT--TAATGTGA

RFL29a CGTATAGTAGCCTCATCCATGGATATTCCTCTTCAGGCCACTGGAAGGAGGCAGTTAGGG  
RFL29c CGTATAGTAGCCTCATCCATGGATATTCCTCTTCAGGCCACTGGAAGGAGGCAGTTAGGG

RFL29a TATTCAAAGAGATGACAAGTCGGAGGGTTACAGCAGATGTGCATACTTACAACATGTTTA  
RFL29c TATTCAAAGAGATGACAAGTCGGAGGGTTACAGCAGATGTGCATACTTACAACATGTTTA

RFL29a TGACCTTTCTTTGCAAACATGGAAGAAGCAAAGAAGCTGCAGGAATTTTTGATACCATGG  
RFL29c TGACCTTTCTTTGCAAACATGGAAGAAGCAAAGAAGCTGCAGGAATTTTTGATACCATGG

RFL29a STATCAAGGGCCTGAAACCTGACAACGTTTCATATGCTATTCTCCTTCATGGGTATGCCG  
RFL29c STATCAAGGGCCTGAAACCTGACAACGTTTCATATGCTATTCTCCTTCATGGGTATGCCG