



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.13

(21) Номер заявки
201891227

(22) Дата подачи заявки
2016.11.26

(51) Int. Cl. **C12N 15/82** (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)

(54) ХОЛОДОУСТОЙЧИВОЕ РАСТЕНИЕ

(31) 15196721.3

(32) 2015.11.27

(33) EP

(43) 2018.12.28

(86) PCT/EP2016/078920

(87) WO 2017/089601 2017.06.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КВС ЗААТ СЕ (DE)

(72) Изобретатель:
**Озунова Милена, Престерл Томас,
Кнаак Карстен, Шойрманн Даниела,
Урбани Клод, Вестхофф Питер,
Песцова Елена, Эрнст Карин (DE)**

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

(56) DATABASE EMBL [Online] 31 October 2008 (2008-10-31), "Zea mays clone 213309 SAUR31 - auxin-responsive SAUR family member mRNA, complete cds.", XP002757915, retrieved from EBI accession no. EMBL: EU959260 Database accession no. EU959260 sequence -& NICKOLAI N. ALEXANDROV ET AL.: "Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing", PLANT MOLECULAR BIOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 69, no. 1-2, 21 October 2008 (2008-10-21), pages 179-194, XP019648179, ISSN: 1573-5028 the whole document

WO-A1-2008034648
US-A1-2007044171

Nino Baliashvili: "Feinkartierung eines QTL (Quantitative Trait Locus) für Kühltoleranz auf Chromosom 4 in Mais und dessen molekularbiologische und phänotypische Charakterisierung. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität", January 2011 (2011-01), pages I-V, 1-96, XP055273945, Düsseldorf, Germany Retrieved from the Internet: URL: <http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-22792> [retrieved on 2016-05-20] cited in the application the whole document

WO-A1-2014/160304

VÍCTOR M. RODRÍGUEZ ET AL.: "Identification of quantitative trait loci involved in the response to cold

stress in maize (Zea mays L.)", MOLECULAR BREEDING: NEW STRATEGIES IN PLANT IMPROVEMENT., vol. 33, no. 2, 20 September 2013 (2013-09-20), pages 363-371, XP055274060, NL ISSN: 1380-3743, DOI: 10.1007/s11032-013-9955-4 figure 1; table 4

PHILIPP WECKWERTH ET AL.: "Zm CPK1, a calcium-independent kinase member of the Zea mays CDPK gene family, functions as a negative regulator in cold stress signalling", PLANT CELL AND ENVIRONMENT, vol. 38, no. 3, 22 August 2014 (2014-08-22), pages 544-558, XP055273960, GB ISSN: 0140-7791, DOI: 10.1111/pce.12414 page 552, right-hand column; figure 5

SOBKOWIAK ALICJA ET AL.: "Genome-wide transcriptomic analysis of response to low temperature reveals candidate genes determining divergent cold-sensitivity of maize inbred lines", PLANT MOLECULAR BIOLOGY, SPRINGER, DORDRECHT, NL, vol. 85, no. 3, 13 March 2014 (2014-03-13), pages 317-331, XP035314577, ISSN: 0167-4412, DOI: 10.1007/S11103-014-0187-8 [retrieved on 2014-03-13] figure 4

ALEXANDER STRIGENS ET AL.: "Association mapping for chilling tolerance in elite flint and dent maize inbred lines evaluated in growth chamber and field experiments", PLANT CELL AND ENVIRONMENT, vol. 36, no. 10, 13 May 2013 (2013-05-13), pages 1871-1887, XP055274058, GB ISSN: 0140-7791, DOI: 10.1111/pce.12096 the whole document

YUZHU CHEN ET AL.: "Small auxin upregulated RNA (SAUR) gene family in maize: Identification, evolution, and its phylogenetic comparison with Arabidopsis, rice, and sorghum", JOURNAL OF INTEGRATIVE PLANT BIOLOGY, vol. 56, no. 2, 8 November 2013 (2013-11-08), pages 133-150, XP055274021, GB ISSN: 1672-9072, DOI: 10.1111/jipb.12127 table 1

A. MAROCCO ET AL.: "CHILLING STRESS IN MAIZE", MAYDICA, vol. 50, 2005, pages 571-580, XP055270513, the whole document

JOHN A. GREAVES: "Improving suboptimal temperature tolerance in maize-the search for variation", JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, vol. 47, no. 296, March 1996 (1996-03), pages 307-323, XP055273961, GB ISSN: 0022-0957 the whole document

CAI GUOHUA ET AL.: "ZmMKK1, a novel group A mitogen-activated protein kinase kinase gene in maize, conferred chilling stress tolerance and was involved in pathogen defense in transgenic tobacco", PLANT SCIENCE, vol. 214, 4 October 2013 (2013-10-04), pages 57-73, XP028780024, ISSN: 0168-9452, DOI: 10.1016/J.PLANTSCI.2013.09.014 figures 5, 6

-
- (57) Изобретение касается идентификации, молекулярной характеристики и использования генов и маркеров из хромосомного интервала, содержащего локус холодоустойчивости у кукурузы. Изобретение также относится к разработке молекулярных маркеров для содействия росту, в частности, для предотвращения фиксации "селективного выметания" на участке с низкой частотой рекомбинации и получению трансгенных и нетрансгенных растений кукурузы, обладающих новоприсвоенной или повышенной холодоустойчивостью.

Область техники

Настоящее изобретение относится к области модификации растений с использованием молекулярно-биологических методов, технологии маркерной селекции и генной инженерии. Изобретение касается нового растения, в частности растения кукурузы, а также идентификации, молекулярной характеристики и использования генов и маркеров из хромосомного интервала 25,7 kb, в линиях которого содержится локус, определяющий устойчивость к холоду. Еще одним аспектом изобретения является разработка молекулярных маркеров для оказания содействия селекционным процедурам, в частности, для того, чтобы избежать фиксации "селективного выметания" на участке с низкой частотой рекомбинации.

Предпосылки создания изобретения

Выражение "заморозки" означает температуры, которые растение кукурузы может пережить, но которые негативно и иногда весьма негативно влияют на рост растения. Оптимальная температура для прорастания семян кукурузы, роста и развития растений кукурузы 21-27°C (Greaves J.A. (1996), Повышение устойчивости кукурузы к субоптимальным температурам - поиск вариантов, J. Exp. Bot. 47: 307-323, 1996).

Таким образом, растения испытывают стресс уже при температуре ниже плюс 20°C, которая является обычной в Северной Европе во время вегетационного периода. Умеренный холодостресс, вызывающий снижение фотосинтеза на свету и замедление роста, наблюдается при 12-17°C, а сильный холодостресс вместе с водным стрессом, вызванным холодом (наподобие стресса, обусловленного засухой), наблюдается на свету при 2-10°C (Marocco A., Lorenzoni C. и Fracheboud Y., 2005. Воздействие холода на кукурузу. Maydica. 50: 571-580).

Холодостресс сопровождается либо фотоингибированием и окислительным стрессом на свету, либо изменениями в экспрессии генов в темноте (обобщено Marocco et al., 2005). Фаза гетеротрофного роста (развернуты 3 листа) является наиболее чувствительной, но и ранняя фаза аутотрофного роста также подвержена холодострессу (Bhosale et al., 2007. Устойчивость к воздействию холода линий кукурузы Центральной Европы и их факторных перекрестных гибридов, Annals of Botany 100: 1315-1321). Длительное воздействие низких температур приводит к необратимому повреждению клеток и ткани (Greaves, 1996). В результате замедляется рост растений и снижается урожай.

Быстрый рост растения в начальной фазе развития является важным индикатором высоких и стабильных урожаев, например, кукурузы, в частности, в холодном климате Центральной и Северной Европы. Кроме того, сорта кукурузы с улучшенными показателями роста в начальной фазе развития обладают лучшей густотой и, таким образом, способствуют уменьшению эрозии и вымыванию нитратов на начальной фазе роста.

Уже проведены исследования нескольких QTL (локус количественных признаков) для идентификации генетической холодоустойчивости кукурузы. В большинстве исследований анализировались растения кукурузы, которые выращивались в вегетационных камерах в условиях оптимальных (25-22°C) и субоптимальных (15-13°C) температур. В связи с этим измерены такие параметры, как квантовый выход фотосистемы II, максимальный квантовый выход фотосистемы II, флуоресценция хлорофилла, содержание хлорофилла (SPAD) третьего листа, площадь листа и содержание сухого вещества в сеянце (Fracheboud, Y. et al. "Идентификация локусов количественных признаков холодоустойчивости, влияющей на фотосинтез у кукурузы (*Zea mays* L.)". Journal of experimental botany 53.376 (2002): 1967-1977; Fracheboud, Y. et al. "Генетический анализ холодоустойчивости, влияющей на фотосинтез у кукурузы". Plant molecular biology 56.2 (2004): 241-253; Hund, A. et al. "QTL, контролирующее корневые и стеблевые признаки сеянцев кукурузы в условиях холодостресса". Theoretical and applied genetics 109.3 (2004): 618-629; Hund, Andreas et al. "Холодоустойчивость фотосинтетического аппарата: плейотропная связь между фотосинтетической деятельностью и специфической площадью листьев сеянцев кукурузы". Molecular Breeding 16.4 (2005): 321-331; Guerra-Peraza, Orlene et al. "Влияние ночных температур на генетический контроль акклиматизации к холоду у сеянцев кукурузы". Maydica 56.4 (2012)), однако во всех этих экспериментах не был задокументирован ни один QTL вблизи QTL на описанной и клонированной здесь хромосоме 4. Leipner et al. ("QTL исследования показали, что признаки сеянцев, связанные с холодоустойчивостью, мало влияют на урожайность кукурузы". Theor Appl Genet (2008) 116: 555-562) сообщили об эксперименте по картированию QTL, проведенном в полевых условиях во время фазы цветения и плодоношения с посевом в два срока. В эксперименте проведены измерения следующих параметров: времени цветения, высоты растения, содержания сухого вещества в соломе и початке. Авторами проведено сравнение идентифицированных ими QTL сеянцев, выращенных в полевых условиях, с QTL, которые были идентифицированы Jompruk et al. в экспериментах с выращиванием в вегетационной камере во время фазы прорастания ("Картирование локусов количественных признаков, контролирующих холодоустойчивость у кукурузы (*Zea mays* L.)" Journal of experimental botany, 2005, 56. Jg., No. 414, p. 1153-1163). Было обнаружено только несколько общих QTL. На этом основании Leipner et al. сделали вывод, что холодоустойчивость сеянцев, по всей видимости, не оказывает значительного влияния на урожайность.

Jompruk et al. (2005) определены карбогидратный обмен и флуоресценция хлорофилла, операционная величина квантового выхода фотосистемы II, зеленость (SPAD) третьего листа, площадь третьего листа и содержание сухого вещества в сеянцах той же популяции и картирован QTL SPAD для растений

раннего посева и операционная величина квантового выхода фотосистемы II в области 31,1 Mb на хромосоме 4, которая находится приблизительно в 6 Mb от QTL согласно настоящему изобретению на участке 37 Mb.

При помощи SSR-маркеров Presterl et al. ("Локусы количественных признаков, определяющие мощность раннеспелых растений кукурузы, выращиваемых при пониженных температурах". *Theoretical and Applied Genetics* 114.6 (2007): 1059-1070) картирован QTL с интервалом 4 cM на хромосоме 4, но который имеет физический размер приблизительно 155 Mb, что равно приблизительно 7% общего генома кукурузы. В 2011 г. было опубликовано хорошее перспективное исследование Baliashvili [Тонкое картирование QTL (локуса количественных признаков) холодоустойчивости на хромосоме 4 у кукурузы и его молекулярно-биологическая и фенотипическая характеристика, диссертация, университет им. Генриха Гейне, Дюссельдорф, 2011)], однако в нем нет информации о маркерах или других последовательностях.

Недавно опубликовано исследование QTL, проведенное Rodriguez et al. ("Влияние выбора интенсивности окраски на содержание антиоксидантов у кукурузы (*Zea mays* L.)", *Euphytica*, 2013, 193, Jg., No. 3, p. 339-345). Оценку потомков скрещивания кукурузы сорта Flint с кукурузой сорта Dent проводили в контролируемых условиях, при этом линия кукурузы сорта Dent чувствительно реагировала на низкие температуры и демонстрировала резкое снижение содержания хлорофилла. В данном случае контрольные температуры составляли 25-20°C, а пониженные температуры - 14-8°C. Были измерены такие параметры, как число выживших растений в условиях контролируемых температур и пониженных температур, содержание сухого вещества в сеянцах в условиях контролируемых температур, квантовый выход фотосистемы II в условиях контролируемых температур и общее содержание антоцианина. Четыре из 10 детектированных участков QTL совпадали с QTL, картированным Presterl et al. (2007) на хромосоме 4, однако дальнейшее исследование в отношении генетических основ не проводилось, такое, например, как тонкое картирование участков или идентификация генов-кандидатов.

Обычно в исследованиях данного типа анализ родительского происхождения аллелей при помощи маркеров, фланкирующих целевой локус, используется для отбора особей с коротким сегментом интактной хромосомы донора вокруг целевого гена, что помогает уменьшить сцепление генов (linkage drag). Однако Stam и Zeven ("Теоретический размер донорного генома у околоизогенных линий самоопылителей, полученных путем возвратного скрещивания". *Euphytica*, 1981, 30. Jg., No. 2, p. 227-238) показали, что ожидаемая длина сегмента хромосомы донора, сцепленного с целевым геном, даже после шести поколений возвратных скрещиваний и отбора целевого гена, все еще составляет 32 cM от 100 cM хромосомы. Есть примеры отрицательных значений генетически закодированных свойств, которые продолжают оставаться сцепленными с отбираемым целевым геном (Zeven, A.C.; Knott, D.R.; Johnson, R. "Исследование сцепления генов у околоизогенных линий пшеницы путем тестирования реакции сеянцев на действие штаммов стеблевой ржавчины, листовой ржавчины и желтой ржавчины". *Euphytica*, 1983, 32. Jg., No. 2, p. 319-327).

В целом, холодоустойчивость является важным признаком, обеспечивающим дальнейшее развитие сельскохозяйственных культур. В этом отношении известны гены, придающие холодоустойчивость, у других видов культур. Так, например, Ma et al. (в "COLD1 придает холодоустойчивость рису". *Cell*. 2015 Mar 12; 160(6): 1209-21) описан QTL COLD1 у риса. Сверхэкспрессия COLD1 (jap) значительно повышает холодоустойчивость. COLD1 кодирует регулятор каскада передачи сигнала G-белками. Более того, в COLD1 также описан SNP (однонуклеотидный полиморфизм), известный как SNP2. Во многих регионах-производителях кукурузы холодоустойчивость считается одной из важных целей выращивания кукурузы на силос, зерно и как источник энергии, в частности, в холодных регионах Центральной и Северной Европы, но также и Южной Европы, где фермеры предпочитают ранний сев, чтобы лучше использовать зимнюю влагу в почве. Выявление и характеристика генов, придающих холодоустойчивость, и обеспечение новых маркеров холодоустойчивости у растений в целом и, в частности, у сельскохозяйственных растений, а также обеспечение растений с повышенной холодоустойчивостью, без которых невозможна дальнейшая успешная агрономическая или селекционная работа, представляют особый интерес и являются целью настоящего изобретения. Другие аспекты настоящего изобретения станут очевидными специалисту в данной области техники после ознакомления с последующим описанием изобретения и примерами.

В первом аспекте настоящего изобретения эта цель достигается посредством обеспечения нуклеиновой кислоты, которая имеет последовательность, выбираемую из группы, состоящей из а) последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в любой одной из SEQ ID NO: 29, 3, 7, 11, 15, 25 или 35, либо ее функционального фрагмента, б) последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарной к любой последовательности по п. а), в) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% либо предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентична любой последовательности по пп. а) или б), д) последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты по пп. а), б) или в) в зависимости от вырожденности генетического кода, е) последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в жестких условиях с любой последовательностью по пп. а), б) или в), ф) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представленный любой одной из SEQ ID NO: 30, 4, 8, 12, 16 или 26, либо его

гомолог, аналог или ортолог, либо g) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует одну или несколько РНК, которая способна гибридизоваться по меньшей мере с частью самой себя либо которые способны гибридизоваться между собой, образуя, таким образом, двухцепочечную часть, характеризующуюся тем, что эта нуклеиновая кислота соответствует на участке по меньшей мере 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25, предпочтительно по меньшей мере 30, 32, 34, 36, 38 или 40, более предпочтительно по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90 или 100, наиболее предпочтительно по меньшей мере 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 или 1000 последовательных нуклеотидов одной из последовательностей нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из i) последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в любой одной из SEQ ID NO: 27, 17, 19, 5, 7, 23 или 25, ii) последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарной к любой последовательности по п. i), iii) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% либо предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентична любой последовательности по пп. i) или ii), iv) последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты по пп. i), ii) или iii) в зависимости от вырожденности генетического кода, v) последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в жестких условиях с любой последовательностью по пп. i), ii) или iii), vi) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представленный любой одной из SEQ ID NO: 28, 18, 20, 6, 8, 24 или 26, либо его гомолог, аналог или ортолог, либо vii) последовательности нуклеиновой кислоты в бессмысловой ориентации по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты согласно (i)-(vi).

Настоящее изобретение является результатом исследований, проведенных изобретателями с целью точной идентификации и локализации маркерного локуса, контролирующего количественный признак холодоустойчивости (локус количественных признаков (QTL)) на хромосоме 4 кукурузы, клонирования этого QTL, секвенирования и идентификации гена(ов), отвечающего за фенотип холодоустойчивости.

Идентифицированный участок общим размером 25,7 kb (генотип донора) был исследован на молекулярном уровне и были идентифицированы подходящие гены-кандидаты (см. фиг. 1). Проведенная оценка функционального состояния включала идентификацию TILLING-мутантов и изучение экспрессии генов. В этом отношении идентифицированный признак холодоустойчивости впервые стал полезен для селекции и генной инженерии. Во время исследований по картированию и тонкому картированию были разработаны молекулярные маркеры, которые можно использовать в качестве диагностических для отбора растений с повышенной холодоустойчивостью. Кроме того, разработанные маркеры можно также использовать для специфического скрещивания исходного генетического материала, обладающего повышенной холодоустойчивостью, с уже существующим селекционным материалом (например, существующими сортами, элитными линиями и т.п.) и, таким образом, поддерживать интрогрессию на низком уровне. Впервые стало возможным осуществлять перенос признака холодоустойчивости без переноса вместе с ним протяженного генетического участка центромерной области хромосомы 4 донора. Особое преимущество этого состоит в том, что, как обнаружено, этот генетический участок жестко фиксирован и допускает только незначительное генетическое разнообразие и частоту рекомбинации. Если этот генетический участок, который в любом случае составляет более 5% общего генома кукурузы, нужно было бы переносить, то это существенно снижало бы дальнейшую селекционную полезность сортов, обладающих этим важным агрономическим признаком. Таким образом, настоящее изобретение имеет то преимущество, что впервые позволяет использовать идентифицированный признак холодоустойчивости для отбора и одновременно снижает потерю генетического разнообразия (селективное выметание) до минимума.

В результате анализов, проведенных в контексте изобретения, была установлена значительная корреляция фенотипических маркеров холодоустойчивости с участком между маркерами *ma59778s31* и *ma59778l19* (см., например, фиг. 2). Обнаружение QTL на хромосоме 4 в пуле *Dent*, которое объясняет 35% фенотипической изменчивости по степени холодоустойчивости, является определяющим источником для использования в селекционной работе.

Из-за низкой частоты рекомбинации и периферического расположения QTL в данном случае было очень трудно ограничить исходный участок узким интервалом и вместо половины хромосомы размером 122 Mb, на которой могло быть унаследовано даже больше отрицательных признаков и которая могла привести к потере генетического разнообразия, в ходе селекции в скрещивании участвовало только несколько kb. Обладая знанием генетических основ признака холодоустойчивости, теперь возможно использовать его изолированно и избежать сцепления генов и снижения генетического разнообразия.

На участке вокруг QTL посредством сравнений между различными растениями и сравнений ассоциированных сведений из баз данных было возможно идентифицировать (см. примеры) несколько функциональных элементов или генов, которые по отдельности или вместе вовлечены в процесс холодоустойчивости. В следующих табл. 1a, 1b и 1c дается их перечень.

Таблица 1a

Генетические элементы и гены в целевом участке 25,7 kb (ТН генотип; ORF - идентифицированная открытая рамка считывания; SL - чувствительная линия; ТН - устойчивая линия)

SEQ ID NO:	Описание	Позиция (SL)	Аннотация
29	ORF TH-09	88663	Ауксин-чувствительный белок SAUR (SAUR31)
3	ORF TH-01	61977	Белок gag ретротранспозона
7	ORF TH-02	63012	Транспозон Sb07g001920 <i>Sorghum bicolor</i>
11	ORF TH-03	65848	Транспозон Sb07g001880 <i>Sorghum bicolor</i>
15	ORF TH-04	70255	Транспозон Sb07g001880 <i>Sorghum bicolor</i>
25	ORF TH-08	80491	Транспозон Sb07g001900 <i>Sorghum bicolor</i>
35	ORF TH-11	79716	Предполагаемый полипротеин, <i>Oryza sativa</i> ssp. japonica
	Участок TH-12		Транспозон Sb07g001920 <i>Sorghum bicolor</i>

Таблица 1b

Генетические элементы и гены в целевом участке 25,7 kb, которые отсутствуют в ТН генотипе либо обладают измененной, предпочтительно пониженной экспрессией в ТН генотипе (ORF - идентифицированная открытая рамка считывания; SL - чувствительная линия; ТН - устойчивая линия)

SEQ ID NO:	Описание	Позиция (SL)	Аннотация
17	ORF SL-05	71918	Транспозируемый элемент, возможный неохарактеризованный белок, <i>Oryza sativa subsp. Japonica</i>
19	ORF SL-06	74307	Ретротранспозон, возможный неохарактеризованный белок OSJNBb0006B22.8, <i>Oryza sativa subsp. japonica</i>
7	ORF TH-02	63012	Транспозон Sb07g001920 <i>Sorghum bicolor</i>
25	ORF TH-08	80491	Транспозон Sb07g001900 <i>Sorghum bicolor</i>
29	ORF TH-09	88663	Ауксин-чувствительный белок SAUR (SAUR31)

Таблица 1c

Генетические элементы и гены в целевом участке 25,7 kb (SL генотип; ORF - идентифицированная открытая рамка считывания; SL - чувствительная линия; ТН - устойчивая линия)

SEQ ID NO:	Описание	Позиция (SL)	Аннотация
27	ORF SL-09	88663	Ауксин-чувствительный белок SAUR (SAUR31)
1	ORF SL-01	61977	Белок gag ретротранспозона
5	ORF SL-02	63012	Транспозон Sb07g001920 <i>Sorghum bicolor</i>
9	ORF SL-03	65848	Транспозон Sb07g001880 <i>Sorghum bicolor</i>
13	ORF SL-04	70255	
17	ORF SL-05	71918	Транспозируемый элемент, возможный неохарактеризованный белок, <i>Oryza sativa subsp. Japonica</i>
19	ORF SL-06	74307	Ретротранспозон, возможный неохарактеризованный белок OSJNBb0006B22.8, <i>Oryza sativa subsp. japonica</i>
23	ORF SL-08	80491	Транспозон Sb07g001900 <i>Sorghum bicolor</i>
27	ORF SL-09	88663	Ауксин-чувствительный белок SAUR (SAUR31)
	Участок SL-11	79716	Предполагаемый полипротеин, <i>Oryza sativa</i> ssp. japonica
21	ORF SL-12		Транспозон Sb07g001920 <i>Sorghum bicolor</i>

В контексте настоящего изобретения особый интерес представляют ORF-09 (SAUR31), ORF-08 и ORF-02, которые продемонстрировали различную экспрессию между SL и ТН линиями и поэтому являются предпочтительными (см. табл. 1b). Например, уровень экспрессии ORF-09 в условиях холодового стресса был выше у линий, чувствительных к холоду (SL), чем у линий, устойчивых к холоду (ТН), и со временем снижался.

Данные изучения гена ORF-09 или ассоциированной аннотации SAUR31 SEQ ID NO: 27 (нуклеотидная последовательность SL генотипа), SEQ ID NO: 29 (нуклеотидная последовательность ТН генотипа) и SEQ ID NO: 31 (нуклеотидная последовательность генома кукурузы референсной линии B73) с помощью маркерных анализов и оценка частот рекомбинации у различных линий SL, ТН и B73 (фиг. 1) позволили однозначно локализовать SAUR31 внутри сегмента на хромосоме 4 между маркерами ma59778s31 и ma59778i19, предпочтительно между ma59778s32 и ma59778i19. В этом отношении SAUR31 представляет собой ген, кодирующий ауксин-чувствительный белок (ср. SEQ ID NO: 28, 30 и

32). Известно, что гены SAUR вовлечены в увеличение клетки, ауксин-опосредованную трансдукцию сигнала и развитие корневой меристемы, а также являются положительными регуляторами старения листьев (Xu, N.; Hagen, G.; Guilfoyle, T. "Молекулы ауксинового ответа промотора SAUR 15A сои". *Plant Science*, 1997, 126. Jg., No. 2, p. 193-201; Jain, M.; Tyagi, A.K.; Khurana, J.P. "Геномный анализ, эволюционное увеличение и экспрессия семейства ауксин-чувствительных генов первичного ответа SAUR риса (*Oryza sativa*)". *Genomics*, 2006, 88. Jg., No. 3, p. 360-371; Jain, M.; Khurana, J.P. "Транскрипционный анализ свидетельствует о различной роли ауксин-чувствительных генов во время репродуктивного развития и абиотического стресса у риса". *Febs Journal*, 2009, 276. Jg., No. 11, p. 3148-3162; Spartz, A.K. et al. "Подсемейство небольших генов SAUR19 содействует увеличению клетки". *The Plant Journal*, 2012, 70. Jg., No. 6, p. 978-990; Hou et al. "Небольшой ген SAUR36 вовлечен в содействие старению листа *Arabidopsis*". *Plant physiology*, 2013, 161. Jg., No. 2, p. 10012-1009). Гены SAUR - это гены первичного ауксинового ответа, вовлеченные в сигнальный путь ауксина (Chen et al. Jim. "Семейство генов SAUR кукурузы: идентификация, эволюция и его филогенетическое сравнение с *Arabidopsis*, рисом и сорго". *Journal of integrative plant biology*, 2014, 56. Jg., No. 2, p. 133-150). Они могут быть разделены на различные группы и уже обнаружены у *A. thaliana*, риса и сои, где выполняют различные функции. У кукурузы предполагаемые гены SAUR были идентифицированы в B73 генома 79. (Chen et al. Jim. "Семейство генов SAUR кукурузы: идентификация, эволюция и его филогенетическое сравнение с *Arabidopsis*, рисом и сорго". *Journal of integrative plant biology*, 2014, 56. Jg., No. 2, p. 133-150). Ген-кандидат ORF-09 был упомянут как ZmSAUR37, но его способность придавать холодоустойчивость, ранее не упоминалась и оказалась неожиданной. Исследования, лежащие в основе изобретения, показали различные уровни экспрессии SAUR31 в чувствительных линиях (SL) в сравнении с устойчивыми линиями (TH) в условиях холодного стресса (табл. 1b). Последовательность промотора свидетельствует о большом количестве полиморфизмов между исследованными линиями, в то время как аминокислотная последовательность осталась, по существу, без изменений. Хотя можно было бы допустить, что различие в экспрессии гена SAUR, опосредованное изменением в промоторе, определяет холодоустойчивость фенотипа, однако все другие гены и участки (как видно из табл. 1a-c) внутри QTL, придающего холодоустойчивость, индивидуально или вместе, как вариант совместно с SAUR, отвечают за холодоустойчивость фенотипа, либо влияют на уровень холодоустойчивости. В общем, они представляют собой предпочтительные аспекты настоящего изобретения.

Кроме того, цель изобретения также достигается путем обеспечения экспрессионной кассеты, содержащей нуклеиновую кислоту, которая имеет последовательность, выбираемую из группы, состоящей из а) последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в любой одной из SEQ ID NO: 29, 3, 7, 11, 15, 25 или 35, либо ее функционального фрагмента, б) последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарной к любой последовательности по п. а), в) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% либо предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентична любой последовательности по пп. а) или б), д) последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты по пп. а), б) или в) в зависимости от вырожденности генетического кода, е) последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в жестких условиях с любой последовательностью нуклеиновой кислоты по пп. а), б) или в), ф) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представленный любой одной из SEQ ID NO: 30, 4, 8, 12, 16 или 26, либо его гомолог, аналог или ортолог, либо г) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует одну или несколько РНК, которые способны гибридизоваться по меньшей мере с частью самих себя или между собой, образуя, таким образом, двухцепочечный участок, характеризующаяся тем, что эта нуклеиновая кислота соответствует на участке по меньшей мере 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25, предпочтительно по меньшей мере 30, 32, 34, 36, 38 или 40, более предпочтительно по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90 или 100, наиболее предпочтительно по меньшей мере 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 или 1000 последовательных нуклеотидов одной из последовательностей нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из и) последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в любой одной из SEQ ID NO: 27, 17, 19, 5, 7, 23 или 25, ii) последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарной к любой последовательности по п. и), iii) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95%, предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентична любой последовательности по пп. и) или ii), iv) последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты по пп. и), ii) или iii) в зависимости от вырожденности генетического кода, v) последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в жестких условиях с любой последовательностью по пп. и), ii) или iii), vi) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представленный любой одной из SEQ ID NO: 28, 18, 20, 6, 8, 24 или 26, либо ее гомолог, аналог или ортолог, либо vii) последовательности нуклеиновой кислоты в антисмысловой ориентации по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты согласно (i)-(vi).

Нуклеиновая кислота или экспрессионная кассета согласно изобретению предпочтительно подходит после транскрипции или после экспрессии в растении для придания холодоустойчивости растению или повышения холодоустойчивости растения.

Принцип экспрессионных кассет, их конструкция и компоненты известны специалисту в данной

области техники из литературы (Sambrook et al. 2001, Молекулярное клонирование: практикум (трехтомник) (Vol. 999). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Кассеты этого типа содержат по меньшей мере один ген, подлежащий экспрессии, и оперативно связанный с ним промотор. Промоторы этого типа могут быть способны служить посредником в трансгенной экспрессии генов, специфичных для развития или ткани растения, так как показано в WO 2003/006660 или WO 2000/026388. Например, в DE 102005021365 описана экспрессионная кассета с геном, специфичным для стадии цветения. Они могут также содержать одну терминаторную последовательность, функциональную в растительных клетках или растительных организмах (см., например, WO 2003/008596). Экспрессионные кассеты могут также содержать один или несколько генов устойчивости, обеспечивающих отбор успешно трансформированных или трансфицированных клеток. Специалисту в данной области техники известны различные гены устойчивости (селективные маркеры) из уровня техники (Miki, B.; McNugh, Селективные гены-маркеры в трансгенных растениях: применение, варианты и биобезопасность. *Journal of Biotechnology*, 2004, 107. Jg., No. 3, p. 193-232). Устойчивость может, например, включать устойчивость к канамицину, стрептомицину или ампициллину. Экспрессионные кассеты могут быть в виде линейной нуклеиновой кислоты, либо вектора или плазмиды.

В одном варианте выполнения экспрессионной кассеты согласно настоящему изобретению нуклеиновая кислота по данному изобретению оперативно связана с конститутивным промотором, например, таким как промотор 35S (Odell, J.T.; Nagy, F.; Chua, N.H. Идентификация последовательностей ДНК, необходимых для активации промотора 35S из мозаичного вируса цветной капусты. 1985, US 5352605 A), холод-индуцируемым промотором, например, таким как BN115 (US 5847102 A) или промотором, например, таким как р63 (EP 2116606 B1), который проявляет активность особенно на ранней стадии развития растений или в молодой растительной ткани, при этом "ранняя стадия развития" означает первые 12 недель после прорастания, в особенности первые 8 недель после прорастания и в особенности первые 4 недели после прорастания.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессионная кассета включает в себя нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, выбираемую из группы, состоящей из а) последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 29, либо ее функционального фрагмента, б) последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарной к последовательности по п. а), с) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% либо предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности по пп. а) или б), d) последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты по пп. а), б) или с) в зависимости от вырожденности генетического кода, е) последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностью нуклеиновой кислоты по пп. а), б) или с), либо f) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представленный SEQ ID NO: 30, либо его гомолог, аналог или ортолог, предпочтительно оперативно связанную с промотором, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 33, либо с аллельным вариантом или модифицированной формой промотора, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 34, при этом аллельный вариант или модифицированная форма проявляют степень или уровень экспрессии, сравнимый с промотором, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 33. "Аллельный вариант" или "модифицированная форма промотора" означает промотор, обладающий степенью или уровнем экспрессии, уменьшенным более чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 или 50% по сравнению со степенью или уровнем экспрессии, вызываемой промотором, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 34. "Степень или уровень экспрессии, сравнимый с" означает, что аллельный вариант или модифицированная форма промотора, содержащего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 34, по существу, обладает степенью или уровнем экспрессии, отличающимся не более чем на 20, 18, 16, 14 или 12%, предпочтительно не более чем на 10, 9, 8, 7 или 6%, более предпочтительно не более чем на 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0% от степени или уровня экспрессии промотора, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 33.

Кроме того, в настоящем изобретении также раскрывается холодиндуцируемый промотор, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 33 или 34 либо нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 33 или 34, либо нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 33 или 34, либо нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 33 или 34, а также экспрессионную кассету, содержащую холодчувствительный промотор, вектор, содержащий холодчувствительный промотор, либо экспрессионную кассету, содержащую холодчувствительный промотор, клетку хозяина или растение или части растения, содержащие холодчувствительный промотор в качестве трансгена, экспрессионную кассету, содержащую холодчувствительный промотор, или вектор, содержащий холодчувствительный промотор, или экспрессионную кассету, содержащую холодчувствительный промотор.

Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения экспрессионная кассета содержит нуклеиновую кислоту, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или несколько РНК, которые способны гибридизоваться по меньшей мере с

частью самих себя или между собой с образованием двухцепочечного участка, при этом такая нуклеиновая кислота соответствует на участке по меньшей мере 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25, предпочтительно по меньшей мере 30, 32, 34, 36, 38 или 40, более предпочтительно по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90 или 100, наиболее предпочтительно по меньшей мере 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 или 1000 последовательных нуклеотидов одной из последовательностей нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из i) последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в любой из SEQ ID NO: 27, ii) последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарной к последовательности по п. i), iii) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95%, предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности по пп. i) или ii), iv) последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты по пп. i), ii) или iii) в зависимости от вырожденности генетического кода, v) последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностью нуклеиновой кислоты по пп. i), ii) или iii), vi) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представленный любой из SEQ ID NO: 28, либо его гомолог, аналог или ортолог, либо vii) последовательности нуклеиновой кислоты в бессмысловой ориентации по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты согласно (i)-(vi).

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение касается вектора, который содержит нуклеиновую кислоту по данному изобретению и экспрессионную кассету по данному изобретению. Вектор может представлять собой плазмиду, космиду, фаг или экспрессионный вектор, трансформационный вектор, челночный вектор или клонирующий вектор; он может быть одно- или двухцепочечным, линейным или кольцевым и способен трансформировать прокариотического или эукариотического хозяина путем интеграции в его геном или экстрахромосомно.

Предпочтительно нуклеиновая кислота или экспрессионная кассета согласно изобретению оперативно связаны с одной или несколькими регуляторными последовательностями, которые обеспечивают транскрипцию и, как вариант, экспрессию в прокариотической или эукариотической клетке хозяина. Регуляторная последовательность, предпочтительно ДНК, может быть гомологичной или гетерологичной по отношению к нуклеиновой кислоте согласно изобретению. Например, нуклеиновая кислота может находиться под контролем подходящего промотора или терминатора. Подходящими промоторами могут быть промоторы, которые конститутивно индуцируются (например, промотор 35S из мозаичного вируса цветной капусты (Odell et al. 1985); особенно подходящими промоторами являются промоторы типа тка-неспецифических или стресс-специфических (например, холодоустойчивый BN115 (US 5847102 A)), или промоторы, функционирующие на определенной стадии развития (например, промоторы, специфические для цветения, такие как промоторный участок гена *GTCHS1*; Kobayashi, H. et al. Цветение-специфическая экспрессия гена, контролируемая промотором гена халконсинтазы из *Gentiana triflora* у *Petunia hybrida*. *Plant Science*, 1998, 131. Jg., No. 2, p. 173-180). Подходящими промоторами могут также быть синтетические или химерные промоторы, не существующие в природе, которые состоят из нескольких элементов и содержат минимальный промотор, а также, вверх по течению от минимального промотора, по меньшей мере один *cis*-регуляторный элемент, действующий как сайт связывания специальных факторов транскрипции. Химерные промоторы можно создавать согласно желательной специфичности. Они индуцируются или репрессируются различными факторами. Примеры таких промоторов можно найти у Gurr & Rushton (Gurr, S.J.; Rushton, P.J. Инжиниринг растений с повышенной устойчивостью к болезням: что мы намерены экспрессировать? *TRENDS in Biotechnology*, 2005, 23. Jg., No. 6, p. 275-282) или Venter (Синтетические промоторы: генетический контроль путем *cis* инжиниринга. *Trends in Plant Science*, 2007, 12. Jg., No. 3, p. 118-124). Примером подходящего терминатора является *pos*-терминатор (Depicker, A., Stachek, S., Dhaese, P., Zambryski, P. и Goodman, H. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 561-575).

Помимо векторов, указанных выше, настоящее изобретение также обеспечивает способ введения вектора в клетку хозяина. Например, вектор может вводиться с помощью конъюгации, мобилизации, биолиственной трансформации, *Agrobacterium* опосредованной трансформации, трансфекции, трансдукции, вакуумной инфльтрации или электропорации. Эти методы, а также способы получения указанных векторов, известны специалисту в данной области (Sambrook et al. 2001, Молекулярное клонирование: практикум (трехтомник) (Vol. 999). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение касается клетки хозяина, включающей в себя нуклеиновую кислоту, экспрессионную кассету или вектор по данному изобретению. "Клетка хозяина" в контексте изобретения может быть прокариотической (например, бактериальной) или эукариотической клеткой (например, растительной клеткой или дрожжевой клеткой). Предпочтительно клетка хозяина представляет собой агробактерию, такую как *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes*, растительную клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, экспрессионную кассету или вектор согласно настоящему изобретению. Специалисту в данной области техники известны многочисленные методы, например, такие как конъюгация или электропорация, с помощью которых нуклеиновая кислота, экспрессионная кассета или вектор согласно изобретению могут вводиться в агробактерию, а также различ-

ные методы трансформации (биолистическая трансформация, *Agrobacterium* опосредованная трансформация), с помощью которых нуклеиновая кислота, экспрессионная кассета или вектор согласно изобретению могут быть введены в растительную клетку (Sambrook et al., 2001).

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение касается трансгенной растительной клетки, содержащей нуклеиновую кислоту по данному изобретению в качестве трансгена, либо экспрессионную кассету или вектор по данному изобретению, и трансгенного растения или его части, содержащих трансгенную растительную клетку. Примером трансгенной растительной клетки или растения этого вида является растительная клетка или растение, трансформированное с помощью нуклеиновой кислоты по данному изобретению, экспрессионной кассеты или вектора по данному изобретению, предпочтительно стабильно. Трансгенное растение или клетка согласно настоящему изобретению предпочтительно обладает новоприданной холодоустойчивостью или повышенной холодоустойчивостью по сравнению с растением дикого типа, которое является изогенным, но которое не было трансформировано с помощью нуклеиновой кислоты по данному изобретению, экспрессионной кассеты или вектора по данному изобретению, предпочтительно стабильно.

В предпочтительном варианте осуществления трансгенного растения нуклеиновая кислота оперативно связана с одной или несколькими регуляторными последовательностями, которые обеспечивают транскрипцию и, как вариант, экспрессию в растительной клетке. Регуляторная последовательность, предпочтительно ДНК, может быть гомологичной или гетерологичной по отношению к нуклеиновой кислоте согласно изобретению. Общий конструктор, образуемый нуклеиновой кислотой по данному изобретению и регуляторной последовательностью(ми), может представлять собой трансген в виде экспрессионной кассеты. "Часть растения" может представлять собой оплодотворенные и неоплодотворенные семена, зародыш, пыльцу, ткань, орган или растительную клетку, причем оплодотворенные и неоплодотворенные семена, зародыш, пыльца, ткань, орган или растительная клетка получены из трансгенного растения, в геном которого была введена нуклеиновая кислота согласно изобретению в качестве трансгена, либо экспрессионная кассета или вектор. Настоящее изобретение также включает потомка трансгенного растения, в геном которого была введена нуклеиновая кислота согласно изобретению в качестве трансгена, экспрессионная кассета или вектор, и который обладает приданной холодоустойчивостью или повышенной холодоустойчивостью по сравнению с растением дикого типа, которое является изогенным, но которое не было трансформировано с помощью нуклеиновой кислоты по данному изобретению, экспрессионной кассеты или вектора по данному изобретению, предпочтительно стабильно.

Новоприданная или повышенная холодоустойчивость может быть определена видоспецифичными методами или экспериментально. В этом отношении может быть подходящим метод анализа изображения листа, который в основном включает следующие шаги: а) культивирование растений в течение 2-4 недель при нулевой температуре наружного воздуха, б) экспозицию растений значительному холодовому стрессу в течение по меньшей мере одной недели, с) осуществление процесса регенерации в условиях нулевой температуры в течение по меньшей мере одной недели и d) измерение утраты зелени у одного или нескольких листьев, росших во время экспозиции холодовому стрессу. В качестве примера ниже приводится описание этого метода для кукурузы (*Zea mays*): растения культивировали в условиях теплицы в течение двух недель при оптимальной температуре (отсутствие стресса) 25°C (дневная температура) и 22°C (ночная температура). Затем растения переносили в климатическую камеру с температурой 8°C и 6°C на одну неделю. За этим следовала одна неделя регенерации в теплице при температуре 25°C и 22°C. Затем исследовали предпочтительно 4-й или 5-й лист относительно его цвета. Результаты дали 100% полного сохранения зелени листа и 0% полного пожелтения (хлороз). В контексте настоящего изобретения показано, что ТН вариант имел лучший результат по сравнению с SL вариантом в том, что касается сохранения хлорофилла в стрессовых ситуациях (см. табл. 5). В целом были измерены значения зелени листьев от 10 до 85%. Потеря зелени листьев у ТН варианта снизилась с 19 до 75% по сравнению с SL вариантом, т.е. холодоустойчивость значительно повысилась. В этом смысле "холодоустойчивость" означает, но не ограничивается этим, снижение потери зелени листа в условиях холодового стресса на 5, 10, 15, 20%, предпочтительно 30, 40 или 50%, более предпочтительно 60, 70, 80 или 90%, измеренное при помощи метода анализа изображения листа, описанного выше.

Как вариант, новоприобретенную или повышенную холодоустойчивость у растения можно также определять путем измерения высоты растения от начала удлинения в корневом участке. Для этого холодоустойчивые и холодочувствительные растения культивируют в стрессовых условиях сравнительных тестов. В контексте настоящего изобретения было, например, показано, что высота растения кукурузы устойчивого варианта увеличилась приблизительно на 35%, что в абсолютном выражении составляет приблизительно 21 см по сравнению с чувствительным вариантом. Таким образом, "холодоустойчивость" может также означать увеличение высоты растения, обладающего новоприобретенной или повышенной холодоустойчивостью, по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 35% от начала удлинения по сравнению с контрольным растением.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение обеспечивает способ получения холодоустойчивого растения. Этот способ включает следующие стадии: А) мутагенизацию растительных клеток или частей растения и последующую регенерацию растений из мутагенизированных растительных

клеток или мутагенизированных частей, либо мутагенизацию растений, и В) идентификацию растения из стадии А), которое в эндогенной последовательности ДНК, которая идентична последовательности нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из i) последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в любой одной из SEQ ID NO: 27, 17, 19, 5, 7, 23 или 25, ii) последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарной к любой последовательности по п. i), iii) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% либо предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентична любой последовательности по пп. i) или ii), iv) последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты по пп. i), ii) или iii) в зависимости от вырожденности генетического кода, v) последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в жестких условиях с любой последовательностью по пп. i), ii) или iii), либо vi) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представленный любой одной из SEQ ID NO: 28, 18, 20, 6, 8, 24 или 26, либо его гомолог, аналог или ортолог, либо vii) последовательности нуклеиновой кислоты в антисмысловой ориентации по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты согласно (i)-(vi), либо в регуляторной последовательности эндогенной последовательности ДНК, содержит по меньшей мере одну мутацию, которая вызывает изменение степени или уровня транскрипции или экспрессии эндогенной последовательности ДНК в идентифицированном растении по сравнению с немутагенизированным растением дикого типа, либо изменение активности и стабильности белка или полипептида, кодируемого эндогенной последовательностью ДНК в идентифицированном растении по сравнению с немутагенизированным растением дикого типа. Предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна мутация придавала холодоустойчивость идентифицированному растению или увеличивала уже существующую холодоустойчивость.

Предпочтительно эндогенная последовательность ДНК согласно стадии В) кодирует ауксин-чувствительный белок или белок SAUR, более предпочтительно белок SAUR31 последовательности SEQ ID NO: 28 или 30, либо его гомолог, аналог или ортолог. Предпочтительно регуляторная последовательность эндогенной последовательности ДНК согласно стадии В) представляет собой промотор или его часть. Особенно предпочтительно промотор является промотором, имеющим SEQ ID NO: 34, или промотором, который по меньшей мере на 80, 85 или 90%, предпочтительно по меньшей мере на 92, 94, 96 или 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 98,5, 99, 99,5 или 99,8% идентичен промотору, имеющему SEQ ID NO: 34. Примером потенциально мутированной формы регуляторной последовательности эндогенной последовательности ДНК является промотор последовательности SEQ ID NO: 33.

Мутация означает модификацию на уровне ДНК, т.е. изменение в генетике и/или эпигенетике. Например, генетическое изменение может представлять собой замену по меньшей мере одной нуклеобазы в эндогенной последовательности ДНК или регуляторной последовательности эндогенной последовательности ДНК. Если такая замена нуклеобазы имеет место, например, в промоторе, это может вызывать изменение активности промотора, поскольку в результате этого *cis*-регуляторные элементы изменяются так, что изменяется аффинность фактора транскрипции по отношению к мутированным *cis*-регуляторным элементам по сравнению с промотором дикого типа, и активность промотора с мутированными *cis*-регуляторными элементами повышается или понижается, в зависимости от того, является фактор транскрипции репрессором или индуктором, и аффинность фактора транскрипции по отношению к мутированному *cis*-регуляторному элементу усиливается или ослабевает. Если такая замена нуклеобазы имеет место, например, в кодирующей области эндогенной последовательности ДНК, то это может приводить к замещению аминокислоты в кодируемом белке и в результате изменять активность и стабильность белка по сравнению с белком дикого типа. Еще одним примером генетического изменения является делеция нуклеотидов в регуляторной последовательности и/или эндогенной последовательности ДНК, а также добавление нуклеотидов в регуляторную последовательность и/или эндогенную последовательность ДНК. Пример регуляции генов посредством инсерции нуклеотидов с помощью транспозонного мутагенеза у кукурузы показан в Das & Martienssen (Das, Lekha, и Robert Martienssen. "Сайт-специфический транспозонный мутагенез в локусе *hcf106* кукурузы". *The Plant Cell* 7.3 (1995): 287-294). Эпигенетическое изменение может, например, вызываться изменением паттерна метилирования ДНК.

Специалисту в данной области техники известно, что "мутация" в контексте изобретения может быть получена с помощью процесса мутагенизации на стадии А) способа получения холодоустойчивого растения. Мутагенизация в данном случае включает традиционный мутагенез и мутагенез в специфическом локусе, известный как "геномное редактирование". При традиционном мутагенезе модификация на уровне ДНК не является специфической. Растительная клетка или растение подвергаются воздействию какого-либо мутагенного фактора, например, TILLING, УФ-облучения или химикатов (Till, Bradley J., et al. "Выявление индуцированных точечных мутаций в генах кукурузы с использованием TILLING". *BMC Plant Biology* 4.1 (2004): 12). Еще одним методом случайного мутагенеза является мутагенез с использованием транспозона. Обширная коллекция мутантов доступна в рамках проекта UniformMu.

Коллекция и методы описаны McCarty et al. (McCarty, Donald R., et al. "Устойчивый транспозонный мутагенез в инбредной линии кукурузы". *The Plant Journal* 44.1 (2005): 52-61). Мутагенез в специфическом локусе позволяет вводить модификации на уровне ДНК в специально заранее определенные сайты ДНК. В этом отношении могут, например, быть использованы нуклеазы TALEN (WO 2010/079430,

WO 2011/072246), мегануклеазы (Silva, George, et al. "Мегануклеазы и другие инструменты целевого геномного инжиниринга: перспективы и вызовы генной терапии". *Current gene therapy* 11.1 (2011): 11), хоминг-нуклеазы (Stoddard, Barry L. "Хоминг-эндонуклеазы: от микробных генетических инвайдеров до реагентов для таргетированной модификации ДНК". *Structure* 19.1 (2011): 7-15), нуклеазы цинковые пальцы (Lloyd, Alan, et al. "Таргетированный мутагенез с использованием нуклеаз цинковые пальцы *Agrobidopsis*". *Материалы Национальной академии наук Соединенных Штатов Америки* 102.6 (2005): 2232-2237) или систему CRISPR/Cas (Gaj, Thomas, Charles A. Gersbach и Carlos F. Barbas "Методы геномного инжиниринга, основывающиеся на ZFN, TALEN и CRISPR/Cas". *Trends in biotechnology* 31.7 (2013): 397-405). Предпочтительно мутации происходят во всех копиях и аллелях и, если необходимо, во всех гомологах соответствующих эндогенных последовательностей ДНК. Обычно это означает два изменения в отношении диплоидного организма, например, такого как *Zea mays*.

Идентификация растения из стадии В) может, например, быть проведена с помощью молекулярных маркеров или зондов. Например, ДНК-зонды представляют собой праймеры, которые могут быть использованы в ПЦР. TILLING-мутанты могут, например, быть детектированы или идентифицированы путем секвенирования целевого гена в популяции TILLING, либо путем использования других методов, позволяющих детектировать ошибочное спаривание в ДНК, таких как анализ точек плавления или использование нуклеаз, специфических для ошибочного спаривания. Настоящее изобретение включает в себя праймеры/пары праймеров, которые могут быть использованы в этом отношении, такие как праймеры для детекции SAUR31 или мутированной формы промотора SAUR31. Кроме того, можно осуществлять детекцию мутантов, получаемых путем использования транспозонов, транспозон-специфических праймеров и праймеров, специфических для целевого гена, в ПЦР во всей популяции с последующим секвенированием ПЦР-продуктов. Праймеры этого типа также охватываются изобретением. Изменение степени или уровня экспрессии можно, например, определять путем использования ОТ-ПЦР на растительной ткани; изменение стабильности - путем исследования сайтов связывания убиквитина и через изменения - предсказание третичной структуры. Полезны также тесты в области экспрессии рекомбинантного белка дикого типа и соответствующих мутированных белков и последующие биохимические тесты. Специалисту в данной области техники должны быть известны другие агенты и методы из уровня техники, которые могут быть использованы для идентификации растения или растительной клетки из стадии В).

Настоящее изобретение также касается молекулярных маркеров для детекции присутствия или отсутствия мутации в эндогенной последовательности ДНК или в регуляторной последовательности эндогенной последовательности ДНК. Маркеры этого типа основываются, например, на SNP и являются специфичными для мутации (примеры: KASPar или TaqMan маркеры).

Настоящее изобретение также касается растения или части растения, которое может быть получено или которое получают при помощи способа по данному изобретению, где часть растения может представлять собой оплодотворенные и неоплодотворенные семена, зародыш, пыльцу, ткань, орган или растительную клетку, и которое содержит по меньшей мере одну мутацию в своем геноме. Настоящее изобретение также касается потомка растения, который содержит по меньшей мере одну мутацию и является холодоустойчивым.

Настоящее изобретение также раскрывает способ выделения нуклеиновой кислоты, которая придает или повышает холодоустойчивость у растения или растительной клетки, включающий следующие стадии:

А) получение растения по способу, описанному выше, либо обеспечение растения или клетки растения, получаемых при помощи способа, описанного выше, или которые могут быть получены таким способом, и В) выделение нуклеиновой кислоты, содержащей эндогенную последовательность ДНК по меньшей мере с одной мутацией из генома растения или клетки из стадии А). Выделение нуклеиновой кислоты на стадии В) может осуществляться путем экстракции с использованием СТАВ-метода или на ДНК-связывающих колонках, детекции мутации с использованием секвенирования или молекулярных маркеров, таких как KASPar или TaqMan маркеры на основе SNP, либо, в случае инсерции или делеции мутантов, с использованием маркеров на основе полиморфизмов длины.

Настоящее изобретение также охватывает нуклеиновую кислоту, получаемую способом, описанным выше для выделения, либо которая может быть получена способом, описанным выше для выделения, а также экспрессионную кассету или вектор, содержащие выделенную нуклеиновую кислоту.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предложен способ получения трансгенного холодоустойчивого растения. Способ может включать следующие стадии: А) обеспечение нуклеиновой кислоты или экспрессионной кассеты, описанных выше, или обеспечение вектора, описанного выше, В) трансформацию, предпочтительно стабильную трансформацию, по меньшей мере одной растительной клетки путем введения нуклеиновой кислоты, экспрессионной кассеты или вектора из стадии А), С) регенерацию трансгенных растений по меньшей мере из одной трансформированной растительной клетки из стадии В), и D) идентификацию трансгенного холодоустойчивого растения из стадии С). Способ получения трансгенного холодоустойчивого растения также включает обеспечение двух или более нуклеиновых кислот, описанных выше, а также, как вариант, различных вариантов осуществления нук-

леиновой кислоты по данному изобретению и, как вариант, в одной или нескольких экспрессионных кассетах или векторах, и трансформацию растительных клеток путем введения двух или более кислот. И, наконец, кроме нуклеиновой кислоты согласно изобретению в качестве трансгена могут использоваться одна или несколько других нуклеиновых кислот, которые известным образом могут содействовать или повышать холодоустойчивость (например, WO 2002/048378 A2, WO 2008/148298 A1).

В предпочтительном варианте осуществления способа получения растения, идентифицированное на стадии D), предпочтительно обладает измененным паттерном экспрессии по сравнению с растением дикого типа, которое, например, было регенерировано из изогенной нетрансформированной растительной клетки, характеризующимся тем, что вследствие посттранскрипционного сайленсинга гена степень или уровень экспрессии эндогенной последовательности ДНК, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из i) последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в любой одной из SEQ ID NO: 27, 17, 19, 5, 7, 23 или 25, ii) последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарной к любой последовательности по п. i), iii) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% либо предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентична любой последовательности по пп. i) или ii), iv) последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты по пп. i), ii) или iii) в зависимости от вырожденности генетического кода, v) последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в жестких условиях с любой последовательностью по пп. i), ii) или iii), либо vi) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представленный любой одной из SEQ ID NO: 28, 18, 20, 6, 8, 24 или 26, либо его гомолог, аналог или ортолог, снижается.

Настоящее изобретение также касается трансгенного холодоустойчивого растения или части такого растения, которые могут быть получены с использованием указанного способа или которые получают с использованием указанного способа, причем часть растения может представлять собой оплодотворенные и неоплодотворенные семена, зародыш, пыльцу, ткань, орган или растительную клетку, при этом оплодотворенные и неоплодотворенные семена, зародыш или пыльцу получают от трансгенного растения, и в геном которого в качестве трансгена была введена нуклеиновая кислота по данному изобретению, экспрессионная кассета или вектор. Аналогичным образом настоящее изобретение также касается потомка трансгенного растения, обладающего холодоустойчивостью.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение раскрывает способ придания или повышения холодоустойчивости растительной клетке или растению. Этот способ может включать следующие стадии: А) трансформацию, предпочтительно стабильную трансформацию, предпочтительно по меньшей мере одной растительной клетки путем введения описанной выше нуклеиновой кислоты по данному изобретению, или описанной выше экспрессионной кассеты по данному изобретению, или описанного выше вектора по данному изобретению, В) регенерацию трансгенных растений по меньшей мере из одной трансформированной растительной клетки, полученной на стадии А). Способ получения трансгенного холодоустойчивого растения также охватывает трансформацию двух или более описанных выше нуклеиновых кислот по данному изобретению, как вариант, различных вариантов осуществления нуклеиновых кислот по данному изобретению и, как вариант, одной или нескольких экспрессионных кассет или векторов по данному изобретению. В предпочтительном варианте осуществления способа в результате трансформации на стадии А) получают растительную клетку или растение, которая по сравнению с растительной клеткой дикого типа, являющейся, например, изогенной, нетрансформированной растительной клеткой, либо по сравнению с растением, которое было регенерировано из изогенной, нетрансформированной растительной клетки, предпочтительно обладает измененным паттерном экспрессии, характеризующимся тем, что вследствие посттранскрипционного сайленсинга гена степень или уровень экспрессии эндогенной последовательности ДНК, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из i) последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в любой одной из SEQ ID NO: 27, 17, 19, 5, 7, 23 или 25, ii) последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарной к любой последовательности по п. i), iii) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% либо предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентична любой последовательности по пп. i) или ii), iv) последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты по пп. i), ii) или iii) в зависимости от вырожденности генетического кода, v) последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в жестких условиях с любой последовательностью по пп. i), ii) или iii), либо vi) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представленный любой одной из SEQ ID NO: 28, 18, 20, 6, 8, 24 или 26, либо его гомолог, аналог или ортолог, снижается.

В соответствии с альтернативным аспектом настоящего изобретения предлагается использование нуклеиновой кислоты по данному изобретению, экспрессионной кассеты или вектора по данному изобретению для осуществления способа получения трансгенной холодоустойчивой растительной клетки или растения, либо способа придания или повышения холодоустойчивости в растительной клетке или растении.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предлагается агент для внешнего применения на растениях. Этот агент предназначен для внешнего применения на растениях. Он содер-

жит двухцепочечную РНК, одна из цепочек которой содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая соответствует на участке по меньшей мере 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25, предпочтительно по меньшей мере 30, 32, 34, 36, 38 или 40, более предпочтительно по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90 или 100, наиболее предпочтительно по меньшей мере 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 или 1000 последовательных нуклеотидов одной из последовательностей нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из i) последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в любой одной из SEQ ID NO: 27, 17, 19, 5, 7, 23 или 25, ii) последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарной к любой последовательности по п. i), iii) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80, 85, 90 или 95% либо предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентична любой последовательности по пп. i) или ii), iv) последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты по пп. i), ii) или iii) в зависимости от вырожденности генетического кода, v) последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в жестких условиях с любой последовательностью по пп. i), ii) или iii), vi) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представленный любой одной из SEQ ID NO: 28, 18, 20, 6, 8, 24 или 26, либо его гомолог, аналог или ортолог, либо vii) последовательности нуклеиновой кислоты в антисмысловой ориентации по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты согласно (i)-(vi). Двухцепочечная РНК для получения агента по данному изобретению может быть получена способами *in vitro*, которые известны специалисту в данной области техники. Например, синтез двухцепочечной РНК может осуществляться с использованием синтетических механизмов, когда РНК образуется непосредственно *in vitro*. Двухцепочечная РНК может также синтезироваться из двухцепочечной ДНК путем создания мРНК транскрипта, который затем, например, образует шпильчатую структуру.

Агент по данному изобретению может использоваться в виде добавки при обработке семенной оболочки перед посевом или в виде спрея для обработки растений на ранней фазе развития. Кроме того, агент может примешиваться к посевному субстрату до или после появления всходов. В каждом случае агент подходит для придания или повышения холодоустойчивости клетке семени или растения, либо семенам или растениям. До предварительной обработки семян агент может связываться с веществом-носителем и применяться для обработки в комбинации, содержащей двухцепочечную РНК и вещество-носитель, при этом вещество-носитель может, например, обладать РНК-стабилизирующим действием. Примерами РНК стабилизаторов, которые могут применяться, являются липосомы, инкапсулирующие молекулы РНК.

Кроме того, настоящее изобретение охватывает способ придания или повышения холодоустойчивости растительной клетки или растения, включающий стадию внешнего применения агента по данному изобретению.

Предпочтительно оболочку семенного материала или семенную защитную пленку обрабатывают смесью, содержащей агент, либо агент-спрей наносят непосредственно на семенной материал или растение. Настоящее изобретение также касается использования агента по данному изобретению для придания или повышения холодоустойчивости растительной клетки или растения.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение касается холодоустойчивого растения кукурузы или его части, которое содержит первый хромосомный интервал из донора на хромосоме 4 между маркерными позициями *ma59778s31* и *ma59778l19*, содержащий нуклеиновую кислоту, придающую холодоустойчивость, предпочтительно эндогенную нуклеиновую кислоту, придающую холодоустойчивость, и в участке на хромосоме 4, фланкируемом маркерными позициями *ma59778l19* и *ma20205s01*, по меньшей мере еще один хромосомный интервал из того же донора, что и первый хромосомный интервал, и по меньшей мере один хромосомный интервал, который не происходит от донора, причем нуклеиновая кислота, придающая холодоустойчивость, содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, выбираемых из группы, состоящей из а) последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в любой одной из SEQ ID NO: 29, 3, 7, 11, 15, 25 или 35, б) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 98, 99 или 99,5% идентична любой последовательности по пп. а) или б), с) последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты по п. а) в зависимости от вырожденности генетического кода, d) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представленный любой одной из SEQ ID NO: 30, 4, 8, 12, 16 или 26, либо его гомолог, аналог или ортолог. Согласно предпочитаемому варианту осуществления хромосомный интервал на хромосоме 4, содержащий нуклеиновую кислоту, придающую холодоустойчивость, представляет собой интервал между маркерными позициями *ma59778s32* и *ma59778l19* и/или нуклеиновая кислота, придающая холодоустойчивость, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбираемую из группы, состоящей из а) последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 29, б) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 98, 99 или 99,5% идентична последовательности по п. а), с) последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты по п. а) в зависимости от вырожденности генетического кода, либо d) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представленный SEQ ID NO: 30, либо его гомолог, аналог или ортолог; предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты оперативно связана с промотором, который содержит нуклеотидную последова-

тельность SEQ ID NO: 33, либо с аллельным вариантом или модифицированной формой промотора, которые содержат нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 34, при этом аллельный вариант или модифицированная форма проявляют степень или уровень экспрессии, сравнимый с промотором, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 33. "Аллельный вариант" или "модифицированная форма промотора" означает промотор, обладающий степенью или уровнем экспрессии, уменьшенным более чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 или 50% по сравнению со степенью или уровнем экспрессии, вызываемой промотором, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 34. "Степень или уровень экспрессии, сравнимый с" означает, что аллельный вариант или модифицированная форма промотора, содержащего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 34, по существу, обладает степенью или уровнем экспрессии, отличающимся не более чем на 20, 18, 16, 14 или 12%, предпочтительно не более чем на 10, 9, 8, 7 или 6%, более предпочтительно не более чем на 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0% от степени или уровня экспрессии промотора, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 33.

Кроме того, присутствие по меньшей мере одного хромосомного интервала, который не происходит от донора, в участке на хромосоме 4, фланкируемом маркерными позициями *ma59778119* и *ma20205s01*, означает, что вследствие, например, одного или нескольких рекомбинационных событий в процесс скрещивания с растением кукурузы, которое не несет интервал донора, соответствующий интервал донора или соответствующие интервалы донора замещаются по меньшей мере одним хромосомным интервалом, который не происходит от донора. Другими словами, хромосомный интервал, фланкируемый маркерными позициями *ma59778119* и *ma20205s01*, который происходит от донора, присутствует в аллеле донора в усеченном виде.

Как вариант, современная биотехнология предоставляет специалисту в данной области техники много других инструментов, которые могут использоваться для осуществления точного геномного инжиниринга: стратегии генетического инжиниринга, позволяющие замещать специфические донорные сегменты сегментами, которые не являются донорными, уменьшать или предотвращать "селективное выметание", включая использование нуклеаз TALE (TALEN) или нуклеаз цинковые пальцы (ZFN), а также систем CRISPR/Cas, которые, помимо прочего, раскрыты в патентной заявке DE 102013014637, касающейся элиминации нуклеотидных последовательностей, несущих сцепление генов, из генома (гибрида) кукурузы, устойчивой к *Helminthosporium turcicum*; см. DE 102013014637 на стр. 13 и 14, параграфы [0038] - [0042] и содержащиеся там ссылки. Эти технологии, раскрытые также в международной патентной заявке WO 2014/104878, могут аналогичным образом применяться для получения растений по данному изобретению.

В настоящем изобретении также предлагается комбинация традиционной технологии селекции и современной биотехнологии. Например, с помощью новой стратегии рекомбинационного геномного редактирования в растении могут создаваться "горячие точки" в подходящих сайтах, чтобы непосредственно содействовать замене донорных сегментов на участке хромосомы 4, фланкируемом маркерными позициями *ma59778119* и *ma20205s01*, сегментами, которые не являются донорными. Настоящее изобретение предоставляет специалисту в данной области техники информацию, касающуюся локализации "селективного выметания", а также позиции нуклеиновой кислот(ы), придающей холодоустойчивость.

В предпочтительном варианте осуществления растение на участке хромосомы 4, фланкируемом маркерными позициями *ma59778119* и *ma20205s01*, содержит по меньшей мере еще один хромосомный интервал от того же донора и по меньшей мере один хромосомный интервал, который не происходит от донора, причем по меньшей мере еще один хромосомный интервал от того же донора составляет менее 90, менее 80, менее 70%, предпочтительно менее 60, менее 50, менее 40% или особенно предпочтительно менее 30, менее 20, менее 10, менее 5, менее 2 или менее 1% участка на хромосоме 4, фланкируемого маркерными позициями *ma59778119* и *ma20205s01*, и причем по меньшей мере один хромосомный интервал, который не происходит от донора, составляет более 5, более 10, более 20, более 30%, предпочтительно более 40, более 50, более 60% или особенно предпочтительно более 70, более 80, более 90, более 95, более 98 или более 99% участка на хромосоме 4, фланкируемого маркерными позициями *ma59778119* и *ma20205s01*.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения на участке хромосомы 4, фланкируемом маркерными позициями *ma59778119* и *ma20205s01*, растение содержит по меньшей мере еще один хромосомный интервал от того же донора и по меньшей мере один хромосомный интервал, который не происходит от донора, причем по меньшей мере еще один хромосомный интервал от того же донора составляет менее 100 Mb, менее 90 Mb, менее 80 Mb, предпочтительно менее 70, менее 60, менее 50 Mb или особенно предпочтительно менее 40, менее 30, менее 20, менее 15, менее 10 или менее 5 Mb участка хромосомы 4, фланкируемого маркерными позициями *ma59778119* и *ma20205s01*, и причем по меньшей мере один хромосомный интервал, который не происходит от донора, составляет более 5, более 10, более 15, более 20 Mb, предпочтительно более 30, более 40, более 50 Mb или особенно предпочтительно более 60, более 70, более 80, более 90 или более 100 Mb участка на хромосоме 4, фланкируемого маркерными позициями *ma59778119* и *ma20205s01*.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения на участке хромосомы 4,

фланкируемом маркерными позициями ma59778119 и ma20205s01, растение содержит хромосомный интервал от того же донора от маркерной позиции ma59778119 до ma52594s01 и хромосомный интервал, который не происходит от донора, от маркерной позиции ma52594s01 до ma20205s01.

Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления изобретения участок на хромосоме 4, фланкируемый маркерными позициями ma59778119 и ma20205s01, как вариант или дополнительно характеризуется тем, что он обладает более высокой аллельной частотой, по меньшей мере частично.

Предпочтительно хромосомный интервал между маркерными позициями ma59778s31 и ma59778119 и хромосомный интервал между маркерными позициями ma59778119 и ma20205s01 локализуется на хромосоме 4 в геноме кукурузы. Хромосомный интервал между маркерными позициями ma59778119 и ma20205s01 может содержать центромеру хромосомы 4.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения хромосомный интервал, содержащий нуклеиновую кислоту, придающую холодоустойчивость, представляет собой хромосомный интервал между маркерными позициями ma59778s32 и ma59778119. В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения хромосомный интервал между маркерными позициями ma59778s31 и ma59778119 содержит хромосомный интервал, фланкируемый маркерными позициями ma59778s32 и ma59778119.

Предпочтительно хромосомный интервал между маркерными позициями ma59778s31 и ma59778119, а также содержащаяся в нем нуклеиновая кислота, придающая холодоустойчивость, происходит из линии кукурузы пула Dent или является характерной для пула Dent, т.е. специалист в данной области техники способен идентифицировать хромосомный интервал, как происходящий однозначно из пула Dent, например, при помощи молекулярных маркеров.

Селекция с использованием генов с сильными эффектами или хромосомных интервалов, содержащих ген с сильным эффектом, например, таких как геномный интервал по данному изобретению или QTL, придающий холодоустойчивость (в частности, идентифицированный ген SAUR31), приводит к изменению аллельных частот. В зависимости от степени рекомбинации и интенсивности селекции это изменение частот аллелей не только влияет на ген или участок, граничащий с интервалом, но и на соседние хромосомные участки. Результатом этого может быть ограничение генетического разнообразия, известное как "селективное выметание". Для специалиста в области селекции растений это "селективное выметание" чрезвычайно нежелательно, поскольку растительный материал, получаемый в ходе дальнейших процессов селекции, больше не дает исходных результатов. Генетическое истощение означает, что традиционная стратегия селекции от новых рекомбинаций и отборов ничего не получает. Это проиллюстрировано на фиг. 5. На фиг. 5 показано значительное уменьшение генетического разнообразия в пуле генов Dent по сравнению с пулом генов Flint на участке QTL, придающих холодоустойчивость, который содержит, например, ген SAUR31. Все обнаруженные здесь ORF QTL и соответствующие гены происходят из пула генов Dent. Неконтролируемое скрещивание QTL, придающих холодоустойчивость, с другим генетическим фоном (например, пулом Flint) даже в этом пуле будет приводить к существенному сокращению частот аллелей. В контексте изобретения скрещивание хромосомного интервала между маркерными позициями ma59778s31 и ma59778119, содержащего нуклеиновую кислоту, придающую холодоустойчивость, без принятия соответствующих ответных мер будет приводить в каждом случае к значительному ухудшению аллельных частот на хромосоме 4. Перенос идентифицированных QTL или идентифицированной нуклеиновой кислоты, придающей холодоустойчивость, без уменьшения разнообразия селекционного материала представляет собой проблему чрезвычайной важности, которая теперь решена путем очень сложного тонкого картирования участка с помощью маркеров. В этой связи была также необходима идентификация одонуклеотидных полиморфизмов (SNP; результат SNP - гаплотип) в хромосомном интервале и соседних участках. Путем идентификации ТН гаплотипов, обладающих повышенной холодоустойчивостью, и создания новых молекулярных маркеров по данному изобретению стало удивительно возможным, используя вновь созданные молекулярные маркеры для осуществления селекции с помощью маркеров, скрещивать соответствующий хромосомный интервал по данному изобретению, описанный выше, с нуклеиновой кислотой, придающей холодоустойчивость, внутри весьма ограниченного интервала. Получаемые таким образом растения обладали повышенной холодоустойчивостью и одновременно в значительной степени сохраняли генетическое разнообразие. В отношении известных селекционных линий, например, таких как В73, это решило проблему селективного выметания на основе изменения структуры участка.

Частота аллелей, увеличиваемая "по меньшей мере частично", означает, например, что на участке хромосомы 4, фланкируемом маркерными позициями ma59778119 и ma20205s01, частота аллелей увеличилась по меньшей мере на 5 мегабаз (Mb), по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 25 Mb, предпочтительно по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50 или по меньшей мере 60 Mb, либо более предпочтительно по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 Mb. Кроме того, частота аллелей, увеличиваемая "по меньшей мере частично", может означать, например, что на участке хромосомы 4, фланкируемом маркерными позициями ma59778119 и ma20205s01, частота аллелей предпочтительно увеличилась по мень-

шей мере на 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 Mb, предпочтительно по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 25 Mb, либо более предпочтительно по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40 или по меньшей мере 50 Mb с каждой стороны центromеры, предпочтительно хромосомы 4.

"Повышенная аллельная частота" означает, например, отклонение в случае, когда частоты всех аллелей равны 0,5, не более чем на 0,4, 0,375 или 0,35, предпочтительно не более чем 0,325, 0,3 или 0,275, особенно предпочтительно не более чем на 0,25. Кроме того, "повышенная аллельная частота" может также означать, что частота аллелей равна не менее 0,1, 0,125 или 0,15, предпочтительно не менее 0,175, 0,2 или 0,225, особенно предпочтительно не менее 0,25. "Повышенная аллельная частота" может также означать, что по меньшей мере 10%, 15% или 20%, предпочтительно 25%, 30% или 40%, более предпочтительно 45% или 50% хромосомного интервала происходит из пула Flint. Наоборот, "низкая аллельная частота" означает отклонение в случае, когда частоты всех аллелей равны 0,5, не более чем на 0,4 или 0,425. Кроме того, "низкая аллельная частота" может также означать, что частота аллелей равна менее 0,1 или 0,075. "Низкая аллельная частота" может также означать, что менее 5, 6, 7, 8, 9 или 10% хромосомного интервала происходит из пула Flint. В контексте настоящего изобретения "повышенная аллельная частота" может также означать, что хромосомный интервал, который проявляет повышенную частоту аллелей, является усеченным или укороченным, предпочтительно проксимально или дистально по отношению к нуклеиновой кислоте, придающей холодоустойчивость, например, по меньшей мере на 5 мегабаз (Mb), по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 25 Mb, предпочтительно по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50 или по меньшей мере 60 Mb, более предпочтительно по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 Mb.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предлагаются молекулярные маркеры, способные в хромосомном интервале, фланкируемым маркерными позициями *ma59778s31* и *ma20205s01*, или маркерными позициями *ma59778s31* и *ma52594s01*, или маркерными позициями *ma59778s31* и *ma59778l19*, дифференцировать между холодоустойчивым и холодочувствительным гаплотипами. Предпочтительно холодоустойчивый гаплотип соответствует линии TH, содержащей гаплотип согласно табл. 2, и/или холодочувствительный гаплотип соответствует линии SL, содержащей гаплотип согласно табл. 2. Молекулярный маркер в соответствии с настоящим изобретением может, например, представлять собой молекулярный маркер, способный в любой из маркерных позиций *ma59778s31*, *ma59778s32*, *ma59778l19*, *ma52594s01* и *ma20205s01* дифференцировать между холодоустойчивым и холодочувствительным гаплотипами. Молекулярный маркер может быть олигонуклеотидом, в частности олигонуклеотидным праймером, либо он может присутствовать в изолированной форме. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения молекулярный маркер по данному изобретению, один или в комбинации с другими молекулярными маркерами, способен детектировать нуклеиновую кислоту, которая опосредует холодоустойчивость. Помимо этого, настоящее изобретение касается использования по меньшей мере одного из молекулярных маркеров по данному изобретению для идентификации или отбора холодоустойчивого растения кукурузы или его части по данному изобретению.

В еще одном аспекте осуществления настоящего изобретения предлагается способ идентификации холодостойкого растения кукурузы или его части по данному изобретению, описанному выше, который включает стадии А) выделения ДНК из генома растения кукурузы и В) детекцию аллеля в хромосомном интервале, фланкируемым маркерными позициями *ma59778s31* и *ma20205s01*, на хромосоме 4 и, как вариант, С) детекцию по меньшей мере одного хромосомного интервала, который не происходит от донора, либо аллельной частоты, которая по меньшей мере частично повышалась в хромосомном интервале, фланкируемым маркерными позициями *ma59778l19* и *ma20205s01* или маркерными позициями *ma59778l19* и *ma52594s01*. Предпочтительно аллель из стадии В) находится в хромосомном интервале, фланкируемым маркерными позициями *ma59778s31* и *ma59778l19* и *ma20205s01* или *ma59778s32* и *ma59778l19*. В предпочтительном варианте осуществления изобретения аллель из стадии В) является диагностическим для нуклеиновой кислоты, придающей холодоустойчивость. "Диагностический" означает, что аллель располагается непосредственно на нуклеиновой кислоте, придающей холодоустойчивость, или тесно связан с нуклеиновой кислотой, придающей холодоустойчивость. В еще одном особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения молекулярные маркеры по данному изобретению, описанные выше, используются для детекции из стадии В).

В еще одном особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения на стадии В), кроме первого аллеля, детектируется второй аллель, причем первый аллель и второй аллель определяют маркерные позиции, фланкирующие хромосомный интервал, который содержит нуклеиновую кислоту, придающую холодоустойчивость. В этом отношении первый аллель предпочтительно располагается дистально по отношению к нуклеиновой кислоте, придающей холодоустойчивость, предпочтительно в хромосомном интервале между *ma11840s01* и *ma59778s31* или *ma11840s01* и *ma59778s32*, второй аллель располагается проксимально по отношению к нуклеиновой кислоте, придающей холодоустойчивость, предпочтительно в хромосомном интервале между *ma59778l19* и *ma20205s01* или *ma59778l19* и *ma52594s01*.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение касается способа отбора описанного выше растения кукурузы или его частей по данному изобретению, включающего описанный выше способ идентификации холодоустойчивого растения кукурузы или его частей по данному изобретению и дополнительно еще одну стадию отбора холодоустойчивого растения кукурузы или его частей на основании детекции из стадии В) и, как вариант, из стадии С).

Еще один аспект настоящего изобретения касается способа получения растения кукурузы по данному изобретению, включающий первую стадию скрещивания двух растений кукурузы, причем одно растение кукурузы является холодоустойчивым растением, содержащим первый хромосомный интервал между маркерными позициями *ma59778s31* и *ma59778i119*, который содержит нуклеиновую кислоту, придающую холодоустойчивость, и еще один хромосомный интервал, фланкируемый маркерными позициями *ma59778i119* и *ma20205s01*, по меньшей мере части которого происходят от того же донора, что и первый хромосомный интервал, и/или который, по меньшей мере частично, обладает низкой аллельной частотой, и вторую стадию, представляющую собой описанный выше способ отбора холодоустойчивого растения кукурузы по данному изобретению из потомков, полученных в результате скрещивания на первой стадии. Предпочтительно нуклеиновая кислота, придающая холодоустойчивость, содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, выбираемых из группы, состоящей из а) последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в любой одной из SEQ ID NO: 29, 3, 7, 11, 15, 25 или 35, б) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 98, 99 или 99,5% идентична любой последовательности по пп. а) или б), в) последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты по п. а) в зависимости от вырожденности генетического кода, д) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представленный любой одной из SEQ ID NO: 30, 4, 8, 12, 16 или 26, либо его гомолог, аналог или ортолог. В соответствии с предпочитаемым вариантом осуществления изобретения хромосомный интервал расположен на хромосоме 4, и содержит нуклеиновую кислоту, придающую холодоустойчивость, интервал между маркерными позициями *ma59778s32* и *ma59778i119*, и/или нуклеиновая кислота, придающая холодоустойчивость, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбираемую из группы, состоящей из а) последовательности нуклеиновой кислоты, представленной SEQ ID NO: 29, б) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 98, 99 или 99,5% идентична последовательности по п. а), в) последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты по п. а) в зависимости от вырожденности генетического кода, либо д) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представленный SEQ ID NO: 30, либо его гомолог, аналог или ортолог; предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты оперативно связана с промотором, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 33, либо с аллельным вариантом или модифицированной формой промотора, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 34, при этом аллельный вариант или модифицированная форма проявляют степень или уровень экспрессии, сравнимый с промотором, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 33. "Аллельный вариант" или "модифицированная форма промотора" означает промотор, обладающий степенью или уровнем экспрессии, уменьшенным более чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 или 50% по сравнению со степенью или уровнем экспрессии, вызываемой промотором, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 34. "Степень или уровень экспрессии, сравнимый с" означает, что аллельный вариант или модифицированная форма промотора, содержащего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 34, по существу, обладает степенью или уровнем экспрессии, отличающимся не более чем на 20, 18, 16, 14 или 12%, предпочтительно не более чем на 10, 9, 8, 7 или 6%, более предпочтительно не более чем на 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0% от степени или уровня экспрессии промотора, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 33.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение касается способа увеличения выхода растений или растений кукурузы, который включает культивирование трансгенных холодоустойчивых растений по данному изобретению, мутировавших холодоустойчивых растений или холодоустойчивых растений по данному изобретению, а также уборку взрослого выхода. Культивируемые растения обладают повышенной холодоустойчивостью, которая в некоторой степени помогает им во время фазы холодового стресса расти быстрее, чем растение сравнимого генотипа, которое не содержит нуклеиновую кислоту по данному изобретению в своем геноме. Это приводит к тому, что когда происходит уборка трансгенных холодоустойчивых растений по данному изобретению, мутировавшие холодоустойчивые растения или холодоустойчивые растения кукурузы по данному изобретению обеспечивают повышенный выход.

Согласно еще одному дополнительному аспекту осуществления настоящего изобретения предлагается способ снижения использования гербицидов при культивировании растений или растений кукурузы, в частности, на ранней фазе развития растений или растений кукурузы, включающий культивирование трансгенных холодоустойчивых растений по данному изобретению, мутировавших холодоустойчивых растений или холодоустойчивых растений кукурузы по данному изобретению. Культивируемые растения обладают повышенной холодоустойчивостью, которая в некоторой степени помогает им, во время фазы холодового стресса, расти быстрее, чем растение сравнимого генотипа, которое не содержит нуклеиновую кислоту по данному изобретению в своем геноме. Это означает, что растения могут выдерживать

чием клеточной стенки либо их агрегаты или протопласты.

"Функциональный фрагмент" нуклеотидной последовательности означает сегмент нуклеотидной последовательности, обладающий идентичной или сравнимой функциональностью, что и тотальная нуклеотидная последовательность, из которой функциональный фрагмент происходит. Как таковой, функциональный фрагмент может иметь последовательность, идентичную или гомологичную с тотальной нуклеотидной последовательностью по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 97, 98 или 99%. Кроме того, "функциональный фрагмент" нуклеотидной последовательности может также означать сегмент нуклеотидной последовательности, который изменяет функциональность тотальной нуклеотидной последовательности, например, во время посттранскрипционного или транскрипционного сайленсинга гена. Как таковой, функциональный фрагмент нуклеотидной последовательности может содержать по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25, предпочтительно 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 или 140, наиболее предпочтительно 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 последовательных нуклеотидов тотальной нуклеотидной последовательности.

Термин "гетерологичный" означает, что интродуцированный полинуклеотид происходит, например, от клетки или организма с различным генетическим фоном того же вида или другого вида, либо является гомологичным по отношению к прокариотической или эукариотической клетке хозяина, и в таком случае локализуется в разной генетической среде и поэтому отличается от любого естественно встречающегося соответствующего полинуклеотида. Гетерологичный полинуклеотид может присутствовать в добавление к соответствующему эндогенному гену.

В связи с настоящим изобретением термин "регуляторная последовательность" означает нуклеотидную последовательность, которая влияет на специфичность и/или уровень экспрессии. Например, регуляторная последовательность может придавать тканеспецифичность. Такая регуляторная последовательность может быть локализована вверх по течению от точки инициации транскрипции минимального промотора, но также и вниз по течению от нее, как, например, в лидерной последовательности, которая транскрибируется, но не транслируется, либо внутри интрона.

Термин "хромосомный интервал" означает протяженный линейный сегмент геномной ДНК, которая присутствует в единственной хромосоме в растении или в хромосомном интервале. Если хромосомный интервал определяется двумя фланкирующими маркерными позициями, это означает конечные точки интервала с дистальной и проксимальной сторон. Таким образом, маркерные позиции, определяющие концы интервала, могут сами быть частью интервала. В описании изобретения интервал также определяется, как находящийся "между маркерной позицией А и маркерной позицией В". В таком случае интервал образуется протяженным линейным сегментом ДНК, локализованным между двумя определенными маркерными позициями. Маркерные позиции не являются конечными точками интервала с дистальной и проксимальной стороны. Определенные маркерные позиции сами не являются частью интервала.

Термин "аллель" означает одну или две или более нуклеотидных последовательностей, специфических для определенного локуса генома. Первый аллель находится на хромосоме, второй аллель - на второй хромосоме в той же позиции. Если два аллеля разные, они являются гетерозиготными, если аллели одинаковые, они являются гомозиготными.

Разные аллели гена (аллельный ген) различаются по меньшей мере одним SNP. В зависимости от контекста описания изобретения аллель также означает один единственный SNP, который, например, обеспечивает дифференциацию между двумя гаплотипами.

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

Термин "маркер" или "молекулярный маркер" представляет собой нуклеотидную последовательность, которая служит в качестве референсной точки или точки ориентации. Маркер для детекции рекомбинационного события должен быть способным определять различия или полиморфизмы внутри растительной популяции. Для маркеров эти различия находятся на уровне ДНК и представляют собой, например, различия в полинуклеотидах, такие как SSR (простые повторяющиеся последовательности), RFLP (полиморфизмы длин рестрикционных фрагментов), FLP (полиморфизмы длины фрагмента) или SNP (простые нуклеотидные полиморфизмы). Маркеры могут происходить из геномных или экспрессирующихся нуклеиновых кислот, например, таких как сплайсированная РНК, сДНК или EST-последовательности, и могут также относиться к нуклеиновым кислотам, используемым в качестве зондов или праймеров, и, как таковые, способные амплифицировать фрагмент последовательности с использованием ПЦР-методов. Маркеры, характеризующие генетические полиморфизмы между частями популяции, могут детектироваться с помощью разработанных методов, известных из уровня техники (Введение в генетический анализ, 7-е изд., Griffiths, Miller, Suzuki et al., 2000). Эти методы включают секвенирование ДНК, амплификацию специфических последовательностей на основе ПЦР, детекцию RFLP, детекцию полинуклеотидных полиморфизмов с помощью аллель-специфической гибридизации (ASH), детекцию SSR, SNP или ALFP. Помимо этого, известными методами являются также детекция EST (экспрессирующиеся секвенированные последовательности) и RAPD (случайно амплифицированная полиморфная ДНК). В зависимости от контекста термин "маркер" в описании изобретения также означает

специфическую позицию хромосомы в геноме вида, где может находиться специфический маркер (например, SNP). Такая маркерная позиция может быть использована для определения присутствия сцепленного локуса, например сцепленного локуса, который обеспечивает экспрессию специфического фенотипического признака. Например, маркерный локус может также использоваться для отслеживания сегрегации аллелей в определенном локусе (QTL или отдельный ген), которые генетически или физически тесно сцеплены с маркерной позицией.

Настоящее изобретение далее иллюстрируется примерами вариантов его осуществления со ссылками на чертежи. Примеры вариантов осуществления настоящего изобретения приводятся только с целью его иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие его объем. Для целей изобретения все цитируемые здесь документы включены сюда в качестве ссылки.

На фиг. 1 показана диаграмматическая последовательность генов-кандидатов на участке между маркерными позициями *ma59778s31* и *ma59778119*, в сравнении SL, TH и B73 AGPv02. Боксы, отмеченные сплошной линией: аннотированный ген; боксы, отмеченные пунктирной линией: информация о картировании, полученная с помощью маркеров; область, где происходит генетический полиморфизм между SL и TH линиями, представлена ORF-SL-01/ORF-TH-01, ORF-SL-02/ORF-TH-02, Region-SL-13a/Region-TH-13a, Region-SL-13b/Region-TH-13b, ORF-SL-05, ORF-SL-06, Region-SL-11/ORF-TH-11, ORF-SL-11/Region-TH-12, Region-SL-06/Region-TH-06, ORF-SL-09/ORF-TH-09 и Region-SL-07/Region-TH-07; стрелками показано направление 5'-3', независимо от цепочки ДНК, на которой находится соответствующий ген; SL: холодочувствительный генотип; TH: холодоустойчивый генотип; B73: линия кукурузы, геном которой секвенирован и который используется специалистом в данной области техники при селекции кукурузы в качестве референсного генома. Используя данные о B73, возможно также, кроме определения позиции гена-кандидата с помощью маркера, обеспечивать соответствующую позицию (относительно референсного генома B73).

На фиг. 2 показан аддитивный эффект маркера (половина разности между значениями двух гомозиготных маркерных сайтов) по определению фенотипического признака высоты растения и зелености листа на ранней фазе исследуемых растений в полевых экспериментах холодостресса (слева) и в климатической камере (справа). Длина черты за отметкой маркерной позиции показывает влияние генетики на проявление этих признаков после холодостресса. Согласно этому маркерные позиции *ma59778s31*, *ma59778116* и *ma59778119* в значительной степени определяют, является ли растение холодоустойчивым. Измерения и расчеты для фиг. 2 приводятся в табл. 5.

На фиг. 3 показано: в верхней части (A) диаграмматическое представление хромосомы 4 из *Zea mays* размером приблизительно 225 Mb. Позиция центromеры и четырех важных маркерных позиций и их названия четко отмечены. В нижней части (B) показан увеличенный сегмент вокруг маркера *Zm4-5*, в котором может также обнаруживаться ген SAUR31. Это представляет тонкое картирование, которое очень точно демонстрирует позицию SAUR31 с использованием трех маркерных позиций. SAUR31 фланкируется двумя маркерами *ma59778s32* и *ma59778119*.

На фиг. 4 показано среднее значение признака "высота растения" растений с мутациями на участке 5'UTR перед геном SAUR31 в сравнении со средним значением исходной немутагенизированной линии. Показаны две различные точки времени измерения (две разные фазы развития растения): измерение, представленное слева, было сделано через 50 дней после посева и второе измерение - через 27 дней после первого измерения, представленного слева. Полевая всхожесть происходила в условиях холодной весны, и измерения проводили до цветения кукурузы. Данные подтверждают значение SAUR31 в отношении проявления фенотипом признака "холодоустойчивость".

На фиг. 5 показано генетическое разнообразие с использованием аллельных частот в генном пуле Dent (нижняя линия) и в генном пуле Flint (верхняя линия) на хромосоме 4. Максимальное генетическое разнообразие отмечено при аллельной частоте 0,5. Значения 0,0 и 1,0 - это экстремальные значения, демонстрирующие полную фиксацию специфического генетического фона без какого-либо изменения. Как видно из этого чертежа, генный пул Dent демонстрирует четкую генетическую фиксацию по сравнению с генным пулом Flint, особенно пограничный участок придающий холодоустойчивость QTL, содержащий ген SAUR31.

На фиг. 6 показана относительная экспрессия гена SAUR31 в холодочувствительных и холодоустойчивых линиях. Растения культивировались две недели при температуре 22°C и затем подвергались холодовому стрессу при 6°C/8°C в течение 24 ч. С начала холодовой обработки (0 ч), а также спустя 4 и 24 ч надземные части восьми растений использовались для выделения РНК. РНК исследовалась путем ОТ-ПЦР. Тесты проводились дважды, и результаты обоих тестов показаны в двух соседних столбцах. Все значения стандартизированы по значению SL 0 h, которое определено как 1.

SEQ ID NO: 1-35 означают

SEQ ID NO: 1 - открытая рамка считывания ORF-SL-01 из линии SL,

SEQ ID NO: 2 - белок, кодируемый SEQ ID NO: 1,

SEQ ID NO: 3 - открытая рамка считывания ORF-TH-01 из линии TH,

SEQ ID NO: 4 - белок, кодируемый SEQ ID NO: 3,

SEQ ID NO: 5 - открытая рамка считывания ORF-SL-02 из линии SL,

SEQ ID NO: 6 - белок, кодируемый SEQ ID NO: 5,
 SEQ ID NO: 7 - открытая рамка считывания ORF-TH-02 из линии TH,
 SEQ ID NO: 8 - белок, кодируемый SEQ ID NO: 7,
 SEQ ID NO: 9 - открытая рамка считывания ORF-SL-03 из линии SL,
 SEQ ID NO: 10 - белок, кодируемый SEQ ID NO: 9,
 SEQ ID NO: 11 - открытая рамка считывания ORF-TH-03 из линии TH,
 SEQ ID NO: 12 - белок, кодируемый SEQ ID NO: 11,
 SEQ ID NO: 13 - открытая рамка считывания ORF-SL-04 из линии SL,
 SEQ ID NO: 14 - белок, кодируемый SEQ ID NO: 13,
 SEQ ID NO: 15 - открытая рамка считывания ORF-TH-04 из линии TH,
 SEQ ID NO: 16 - белок, кодируемый SEQ ID NO: 15,
 SEQ ID NO: 17 - открытая рамка считывания ORF-SL-05 из линии SL,
 SEQ ID NO: 18 - белок, кодируемый SEQ ID NO: 17,
 SEQ ID NO: 19 - открытая рамка считывания ORF-SL-06 из линии SL,
 SEQ ID NO: 20 - белок, кодируемый SEQ ID NO: 19,
 SEQ ID NO: 21 - открытая рамка считывания ORF-SL-12 из линии SL,
 SEQ ID NO: 22 - белок, кодируемый SEQ ID NO: 21,
 SEQ ID NO: 23 - открытая рамка считывания ORF-SL-08 из линии SL,
 SEQ ID NO: 24 - белок, кодируемый SEQ ID NO: 23,
 SEQ ID NO: 25 - открытая рамка считывания ORF-TH-08 из линии TH, которая идентична ORF-SL-08 из линии SL,
 SEQ ID NO: 26 - белок, кодируемый SEQ ID NO: 25,
 SEQ ID NO: 27 - открытая рамка считывания ORF-SL-09 из линии SL, которая соответствует гену SAUR 31,
 SEQ ID NO: 28 - белок, кодируемый SEQ ID NO: 27,
 SEQ ID NO: 29 - открытая рамка считывания ORF-TH-09 из линии TH, которая соответствует гену SAUR 31, причем ген присутствует в аллельной вариации, которая очевидным образом способствует проявлению холодоустойчивости,
 SEQ ID NO: 30 - белок, кодируемый SEQ ID NO: 29,
 SEQ ID NO: 31 - открытая рамка считывания ORF-B73-09 из генома кукурузы референсной линии B73, которая соответствует гену SAUR 31,
 SEQ ID NO: 32 - белок, кодируемый SEQ ID NO: 31,
 SEQ ID NO: 33 - промоторный участок гена SAUR 31, соответствующий аллельной вариации ORF-TH-09, причем промоторный участок присутствует в аллельной вариации, которая очевидным образом способствует проявлению холодоустойчивости,
 SEQ ID NO: 34 - промоторный участок гена SAUR 31, соответствующий аллельной вариации ORF-SL-09,
 SEQ ID NO: 35 - открытая рамка считывания ORF-TH-11 из линии TH,
 SEQ ID NO: 36 - праймер,
 SEQ ID NO: 37 - праймер,
 SEQ ID NO: 38 - мутированная версия гена SAUR 31 с замещением аденина на гуанин в позиции 25 (относительно начала трансляции); кодогенная цепочка показана в направлении 5' - 3'.

Примеры

Картирование QTL проводили с использованием бипарентальной (двуродительской) картирующей популяции инбредных линий SL и TH.

Инбредная линия SL является чувствительной к холодным температурам на ранних фазах развития растения в полевых условиях, в то время как линия TH является холодоустойчивой родительской линией.

Полевые испытания проводили с использованием 720 двойных гаплоидных линий в 8 местностях (Presterl et al., 2007). 720 двойных гаплоидных линий генотипировали с помощью SSR-маркеров, распределенных по геному. Фенотипирование развития растений осуществляли на ранней фазе (6-8 полностью развившихся листьев), и общий выход свежего растительного материала и количество растений определяли оценкой холодоустойчивости в полевых условиях.

Картирование QTL рассчитывали на уровне линии *per se* и тестовых скрещиваний. В результате смогли определить 7 участков QTL на 6 хромосомах, причем самый сильный QTL был определен на хромосоме 4 в интервале размером 4 сМ с определенной фенотипической изменчивостью 33,7%. При первом картировании QTL только 3 SSR-маркера покрывали геномную область (Presterl et al., 2007). На физической карте B73 AGPv01 эта область составляла 155 Mb. Картирование QTL позднее было проведено в этой популяции. Затем было проведено картирование этой области. Для участка QTL были разработаны 23 маркера и были генотипированы окколоизогенные линии (NIL) для большого участка QTL, получены последующие рекомбинационные растения от скрещиваний NIL и чувствительного SL родителя с целью разработки NIL с меньшими хромосомными сегментами. Можно было картировать два флан-

кирующих полиморфных маркера для участка QTL в 36,7 Mb (Zm4-5) и 156,4 Mb (Zm4-6) на физической карте B73 AGPv01 (см. фиг. 3). Вновь разработанные маркеры можно было картировать в 37,1 Mb. Новые маркеры сузили участок QTL до 119,7 Mb, однако вследствие низкой частоты рекомбинации на этом участке (периферический участок) и недостаточности геномных ресурсов меньший интервал невозможно было определить (Baliashvili, 2011).

Было проведено фенотипическое тестирование для определения чувствительности к холоду, при котором растения культивировали в вегетационной камере в течение 14 дней (фаза трех листьев) при температуре 25°C днем и 22°C ночью. Затем температуру снижали до 8°C днем и 6°C ночью в течение одной недели. Результатом при 25°C днем и 22°C ночью после холодовой обработки стало хлоротическое поражение четвертого и пятого листа у растений, чувствительных к холодовой обработке (SL линия). Листа холодоустойчивых растений оставались зеленой (TH линия).

Молекулярный анализ и геномные ресурсы: для обогащения участка QTL новыми молекулярными маркерами были разработаны новые геномные ресурсы. Так, с помощью стратегии с захватом последовательности линий SL, TH и NIL TH-N4-32-линии было получено 28 новых SNP-маркеров полиморфизма при сравнении SL и TH. Были приготовлены последовательности ВАС из двух ВАС-библиотек, полученных из линии, несущей чувствительный SL аллель на QTL, и линии, несущей устойчивый TH аллель на QTL. Был проведен скрининг, секвенирование ВАС-библиотек и созданы скаффолды. Скрининг обеих ВАС-библиотек проводили с помощью известных маркеров для участка QTL. Три ВАС клона из SL-ВАС библиотек и четыре ВАС клона из TH-ВАС секвенировали при помощи трех разных технологий секвенирования нового поколения. SL-ВАС скаффолд общим размером 284 kb и TH-ВАС скаффолд общим размером 356 kb соединяли вместе. Оба скаффолда содержали целевой участок между ma59778s31 и ma59778119, включая фланкирующие участки. Отсутствующий маркер полиморфизма в направлении к центромере можно было определить путем сравнения последовательностей ВАС из обеих библиотек. За пределами 38729663 bp на карте B73 AGPv02 полиморфизм между двумя линиями не детектировался. В позиции 37297901 bp в качестве функционального маркера подтверждался ma59778119. Этот маркер позволил определить участок QTL в направлении 3', так как от позиции 38729663 и далее между SL и TH другие полиморфизмы не наблюдались. Без этого маркера было бы невозможно идентифицировать небольшие интрогрессии порядка 35 kb (от маркера ma59778s31 до ma59778119) (см. фиг. 3).

Идентификация генов-кандидатов: аннотировали ВАС скаффолды обеих ВАС-библиотек. Гены/участки-кандидаты подтверждались, если они совпадали с результатами рекомбинантных скринингов, их функциональной аннотации, результатами анализов экспрессии, и если они демонстрировали полиморфизмы между линиями SL и TH. Всего девять открытых рамок считывания (ORF) можно было аннотировать на SL-ВАС скаффолде и семь на TH-ВАС скаффолде между ma59778s31 и 7202707. ORF можно было детектировать, причем большая их часть кодировала целые или укороченные мобильные элементы (табл. 1а-с). Известно, что такие элементы, если они локализируются вблизи генов, способны влиять на их экспрессию (Butelli, Eugenio, et al. "Транспозоны контролируют специфическое для фруктов холодозависимое накопление антоцианинов в красных апельсинах". *The Plant Cell* 24.3 (2012): 1242-1255; Meihls, Lisa, et al. "Природная вариабельность устойчивости к тлям связана с активностью 2,4-дигидрокси-7-метокси-1,4-бензоксазин-3-он глюкозид метилтрансферазы". *The Plant Cell* 25.6 (2013): 2341-2355).

Две аннотированные ORF (ORF-SL-03/ORF-TH-03, ORF-SL-08/ORF-TH-08) не демонстрировали различий между геномными последовательностями SL и TH. Четыре аннотированные ORF (ORF-SL-02/ORF-TH-02, ORF-SL-04/ORF-TH-04, ORF-SL-09/ORF-TH-09, ORF-TH-11/Region-SL-11, ORF-SL-12/Region-TH-12) демонстрировали полиморфизмы либо индивидуальных нуклеотидов, либо инсерций/делеций; установлено только частичное соответствие между генотипами одной ORF (ORF-SL-01/ORF-TH-01). Две ORF (ORF-SL-05, ORF-SL-06), которые были идентифицированы и аннотированы у SL, отсутствовали у TH. В результате все ORF, которые являются полиморфными, отсутствуют в том или ином генотипе, либо демонстрируют различную экспрессию, представляют собой подходящие гены-кандидаты для наблюдаемого признака холодоустойчивости. Особый интерес представляет ORF-09, которая была идентифицирована как SAUR31 в базе данных, касающейся кукурузы. Гены SAUR (small auxin upregulated RNA) реагируют на ауксин.

Валидация генов-кандидатов: для генов-кандидатов был начат скрининг популяции TILLING с помощью устойчивого аллеля из TH для определения участка QTL, придающего холодоустойчивость, на хромосоме 4, в частности, ORF-SL-09, ORF-TH-09 (B73: GRMZM2G420812). В мутантах обнаруживались две аминокислотные замены, два мутанта демонстрировали полиморфизмы на участке 5' гена.

Экспрессию отобранных генов-кандидатов анализировали с помощью qOT-ПЦР в обеих родительских линиях и в двух NIL с различной холодоустойчивостью. Растения культивировали в вегетационной камере в условиях, описанных выше, и экспрессию генов-кандидатов анализировали в три временных этапа в ходе холодовой обработки:

- 1) до холодовой обработки (t0),
- 2) через 4 ч после начала холодовой обработки (t4) и
- 3) через 24 ч после начала холодовой обработки (t24).

Экспрессия гена SAUR31 (ORF-09) была выше у холодоустойчивых линий и становилась меньше на каждом этапе измерений. Два анализируемых мобильных элемента (ORF-08 и ORF-092) также демонстрировали различную экспрессию между чувствительными и устойчивыми линиями (фиг. 6). В табл. 1а-с обобщены данные о генах-кандидатах: приводятся их аннотация, наблюдаемые полиморфизмы и результаты анализов экспрессии. Можно предположить, что различия в экспрессии являются причиной замедления роста в условиях холода.

Развитие мутанта SAUR31 и его анализ в полевых испытаниях: вследствие особого влияния SAUR31 на проявление фенотипом холодоустойчивости проводили функциональную валидацию этого гена. Использовали стратегию неуправляемого EMS мутагенеза пыльцы, обработанной полиамидимом (см. Neuffer и Coe, 1978; Использование парафинового масла при обработке зрелой пыльцы кукурузы химическими мутагенами. Maydica 23: 21-28). После мутагенеза исходной линии (KWS279) семена M1 культивировали и затем собирали листья с соответствующих индивидуальных растений. Из собранных проб листьев экстрагировали ДНК с помощью специфических праймеров (SEQ ID NO: 36 и 37), получали фрагмент ДНК гена SAUR31 для амплификации. Путем секвенирования этого фрагмента ДНК специфически детектировали отклонения от исходной последовательности гена SAUR31 и устанавливали связь с соответствующим индивидуальным растением. Данный метод позволил успешно идентифицировать один мутант, имеющий мутацию гена SAUR31 в 5'-UTR (нетранслируемой области). При этом в исходной последовательности наблюдалось замещение G/C на A/T в позиции (-25), начиная от начала ATG. Ассоциированная последовательность приведена в SEQ ID NO: 38. Гетерозиготная мутация, идентифицированная в поколении M1, фиксировалась путем оплодотворения самоопылением соответствующего индивидуального растения в следующем поколении M2.

В полевых испытаниях в местности А мутанты культивировали рядами по 20 растений в каждом, использовали 5 рядов. Немутагенизированную исходную линию культивировали в непосредственной близости от мутанта, чтобы добиться лучшего сравнения. Статистическая оценка средних значений мутантов в сравнении с исходной линией показала, что мутанты обладали значительно более слабым ростом в условиях холодной весны по сравнению с исходной линией (фиг. 4). На фиг. 4 показаны средние значения признака роста в высоту растения мутантов относительно средних значений немутагенизированной исходной линии двух этапов измерений (двух различных фаз развития растения): второе измерение, показанное справа на фиг. 4, проводили через 27 дней после первого измерения, показанного слева. Полевая всхожесть определялась в условиях холодной весны.

Развитие рекомбинантных NIL: используя новые молекулярные маркеры, получали рекомбинантные NIL, происходящие от NIL TH-N4-8X, TH-N4-56X и TH-N4-32. Было возможно идентифицировать очень незначительные рекомбинационные события, которые составляли 34,729 kb на физической карте B73AGPv02, 32,731 kb на SL-BAC скаффолде и 25,662 kb на TH-BAC скаффолде (концы определены маркером ma59778s31 и маркером ma59778i19) (табл. 2). Обзор NIL, использовавшихся для разных тестов, приведен в табл. 2.

Таблица 2

Обзор NIL и родителей, использовавшихся для разных тестов
Маркерные позиции в отношении AGPv02: ma11840s01=31306276 bp; ma59778s31=37263172 bp;
ma59778s32=32966726 bp; ma59778i19=37297901 bp; ma52594s01=58033711 bp;
ma20205s01=156998152 bp

линии	ma11840s01	ma59778s31	ma59778s32	ma59778i19	ma52594s01	ma20205s01	гипотип
SL	A	C	C	A	A	G	HP1
TH	G	T	T	C	A	A	HP2
TH-N4-32	G	T	T	C	A	G	HP3
TH-N4-8X	G	T	T	C	A	A	HP2
TH-N4-56X	G	T	T	C	A	G	HP3
SL-BAC библиотека	A	C	C	A	A	G	HP1
TH-BAC библиотека	G	T	T	C	A	A	HP2
KWS279-TILLING	G	T	T	C	A	A	HP2
NIL-003-RNAseq	G	T	T	C	A	G	HP3
NIL-011-RNAseq	A	C	C	A	A	G	HP1
NIL1 фенотип		T	T	C	A		HP1
NIL2 фенотип		C	T	C	A		HP4
NIL3 фенотип		T	C	A	A		HP5
NIL4 фенотип		T	C	C	A		HP6

Оценка фенотипа: NIL, которые содержали сегмент донора на маркер ma59778s32, а SL аллель содержал маркер ma59778s31, и наоборот, фенотипировали в полевых условиях и в условиях вегетационной камеры.

NIL и родительские линии оценивали в отношении развития растений на ранней фазе в двух местностях А и В Северной Германии, которые известны тем, что здесь преобладают низкие температуры на ранних стадиях роста кукурузы. Эксперимент 1 проводили в двух местностях по 27 рекомбинантным растениям в 20-кратной повторности, эксперимент 2 проводился в 10-кратной повторности по 38 рекомбинантным растениям, оценку осуществляли по результатам, полученным в местности А. В обоих экспериментах растения высаживали рядами по 20 растений в каждом ряду. Развитие растения определяли по высоте растения в начале фазы удлинения стебля.

Таблица 3

Влияние местности проведения экспериментов 1 и 2 по определению высоты растения на ранней фазе его развития на среднее значение наследственности

Параметр	Эксперимент 1			Эксперимент 2
	Несколько местностей	Местность А	Местность В	Местность А
Среднее значение [см]	67,4	61,0	73,8	58,0
Среднее значение ТН [см]	83,0	76,2	89,8	79,9
Среднее значение SL [см]	64,8	59,0	70,6	58,7
LSD 5 % [см]	1,9	2,4	3,0	2,6
Наследственность [%]	98,5	97,2	97,2	97,4

Высота растения на ранней стадии развития демонстрировала очень высокую наследственность (>97%, табл. 3). В экспериментах участвовали две родительские линии - SL и ТН, высота растений которых на ранней стадии развития сильно отличалась.

Высоту растений NIL на ранней стадии развития рассчитывали в процентах от чувствительных SL родителей (табл. 3). Рекомбинантные NIL с идентичными генотипами в хромосомном интервале между маркерами ma59778s31 и ma59778i19 собирали вместе в качестве гаплотипов (табл. 4). Растения рекомбинантных NIL, которые демонстрировали SL генотип на маркерах ma59778s32, ma59778i19 и ma59778i16, имели заметно более низкую высоту на ранней стадии развития, чем соответствующие ТН генотипы. Удивительно, но высота растения варианта ТН увеличилась почти на 35%, в абсолютном выражении - приблизительно на 21 см. Растения двух NIL с SL генотипом на маркерах ma59778i19 и ma59778i16 схожим образом демонстрировали низкую высоту.

Кроме того, NIL фенотипировали в климатической камере с помощью тестов, описанных выше. Линии культивировали в течение двух недель в теплице (25/22°C) и переносили в климатическую камеру на одну неделю при 8/6° (условия холода); после восстановления в течение одной недели в теплице (25/22°C) оценивали зеленость четвертого и пятого листа от 0 (желтый) до 100 (зеленый). В этом отношении значение 100% означало полное сохранение листом зелености, значение 0% - полное пожелтение (хлороз). Было отмечено, что вариант ТН превосходил вариант SL даже при сохранении хлорофилла в условиях холода. В целом, определены значения от 10 до 85%. В этом отношении потеря зелености вариантами ТН снизилась с 19 до 75% по сравнению с SL вариантами.

Таблица 4

Обзор в табличной форме гаплотипов NIL, представленных различным номером (N) индивидуальных NIL, и результаты их фенотипов относительно признаков высоты растений на ранней стадии развития (SL=100%) и зелености листьев

Линии	Гаплотип	Высота растения на ранней стадии развития [% SL]	N	Зеленость [%]	N
NIL1 фенотип	HP2	107,6	22	83,1	10
NIL2 фенотип	HP4	106,1	6	63,1	7
NIL3 фенотип	HP5	92,8	16	34,2	5
NIL4 фенотип	HP6	94,3	2	15,0	2
SL	HP1	100	1	10	1

Более того, рассчитывали влияния маркера в целевом интервале на результаты, полученные в полевых условиях и условиях климатической камеры, при помощи регрессионного анализа (фиг. 1). Маркеры, которые физически ближе к гену ORF-09 (ma59778i120-ma59778i119), демонстрировали самое большое влияние и значительно ассоциировались с двумя фенотипическими определениями. В полевых испытаниях 6% дополнительного влияния соответствовали разнице между двумя гомозиготными классами маркеров в 12%. В абсолютном выражении это составляет 7,8 сМ, что равно 40% разницы между фенотипами SL и ТН. Что касается вегетационной камеры, дополнительный эффект двух самых близких фланкирующих маркеров составил 22,7%.

Таблица 5

LOD-величины (логарифм отношения шансов, статистическая оценка вероятности сцепленного наследования маркера и признака, LOD=3 обычно принимают за пороговое значение) и аддитивные маркерные эффекты (соответствует половине разности между двумя проявлениями гомозиготного маркерного признака) в отношении высоты растений и зелености листьев фенотипов на ранней стадии развития исследуемых растений в полевых условиях и условиях климатической камеры

Маркер	Позиция	Высота растения на ранней фазе		Зеленость	
		LOD	Эффект [%]	LOD	Эффект [%]
zm00139s01	37227335	0	0,52	0	0,29
ma59778s17	37250743	0,3	1,09	0	2,27
ma59778s20	37255740	0,2	1,02	0	2,27
ma59778s21	37255778	0,2	0,94	0	1,45
ma59778s22	37257777	0,1	0,79	0	1,67
ma59778s24	37258325	0,2	0,89	0	2,27
ma35241s01	37258811	0,3	1,09	0,1	4,10
ma59778s25	37258935	0,3	1,09	0	2,27
ma59778s26	37260907	0,3	1,09	0,1	5,32
ma59778s27	37260916	0,3	1,09	0,1	4,10
ma59778s30	37263151	0,2	0,89	0,1	4,10
ma59778s31	37263172	0,2	1,00	0	1,69
ma59778s32	37296672	19,5	5,99	4,4	24,20
ma59778119	37297901	14,1	5,37	3,2	22,70

Важность созданного маркера для холодоустойчивости: идентификация гена-кандидата гаплотипа и создание новых маркеров означает, что используя селекцию с помощью маркера, соответствующий ген-кандидат можно скрещивать в пределах очень ограниченного интервала с холодоустойчивым селекционным материалом. Получаемые в результате растения обладают повышенной холодоустойчивостью, при этом максимально возможно сохраняется биоразнообразие.

Анализ 5598 генотипов из генного пула Dent, использовавшихся для селекции, показал, что 86% генотипов имели в желательном варианте аллеля ген-кандидат и, таким образом, являются желательными гаплотипами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Экспрессионная кассета, содержащая нуклеиновую кислоту, которая имеет последовательность нуклеиновой кислоты, выбираемую из группы, состоящей из а) последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 29, б) последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарной к последовательности по п. а), с) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности по п. а) или б), d) последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты по пп. а), б) или с) в зависимости от вырожденности генетического кода, е) последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностью по пп. а), б) или с), f) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представленный в SEQ ID NO: 30,

причем нуклеиновая кислота подходит после транскрипции или после экспрессии в растении для придания холодоустойчивости растению или повышения холодоустойчивости растения,

где нуклеиновая кислота оперативно связана с промотором, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 33, либо с аллельным вариантом или модифицированной формой промотора, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 34, при этом аллельный вариант или модифицированная форма проявляют степень или уровень экспрессии, сравнимый с промотором, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 33.

2. Вектор, содержащий экспрессионную кассету по п.1.

3. Трансгенная холодоустойчивая растительная клетка, содержащая экспрессионную кассету по п.1 или вектор по п.2.

4. Трансгенное холодоустойчивое растение или его часть, содержащее трансгенную растительную клетку по п.3.

5. Способ получения трансгенного холодоустойчивого растения, включающий следующие стадии: А) обеспечение экспрессионной кассеты по п.1 или вектора по п.2, В) трансформацию по меньшей мере одной растительной клетки путем введения экспрессионной кассеты или вектора из стадии А), С) регенерацию трансгенных растений по меньшей мере из одной трансформированной растительной клетки из стадии В), и D) идентификацию трансгенного холодоустойчивого растения из стадии С).

6. Холодоустойчивое растение кукурузы или его часть, содержащее I) первый хромосомный интервал из донора на хромосоме 4 между маркерными позициями ma59778s31 и ma59778119, который содержит эндогенную нуклеиновую кислоту, придающую холодоустойчивость, и II) в участке на хромосоме 4, фланкируемым маркерными позициями ma59778119 и ma20205s01, по меньшей мере еще один

хромосомный интервал из того же донора и по меньшей мере один хромосомный интервал, который не происходит из донора, причем нуклеиновая кислота, придающая холодоустойчивость, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которую выбирают из группы, состоящей из а) последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 29, б) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 98% идентична последовательности по п. а), в) последовательности нуклеиновой кислоты, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты по п. а) в зависимости от вырожденности генетического кода, д) последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, представленный в SEQ ID NO: 30,

причем растение кукурузы содержит Т в маркерной позиции ma59778s31, Т в маркерной позиции ma59778s32, С в маркерной позиции ma59778119, А в маркерной позиции ma52594s01 и Г в маркерной позиции ma20205s01, или

причем растение кукурузы содержит С в маркерной позиции ma59778s31, Т в маркерной позиции ma59778s32, С в маркерной позиции ma59778119 и А в маркерной позиции ma52594s01;

причем маркерные позиции в отношении генома кукурузы референсной линии B73 AGPv02: ma59778s31=37263172 bp, ma59778s32=37296672 bp, ma59778119=37297901 bp, ma52594s01=58033711 bp и ma20205s01=156998152 bp.

7. Растение кукурузы или его часть по п.6, отличающееся тем, что участок на хромосоме 4, фланкируемый маркерными позициями ma59778119 и ma20205s01, обладает повышенной аллельной частотой, по меньшей мере частично,

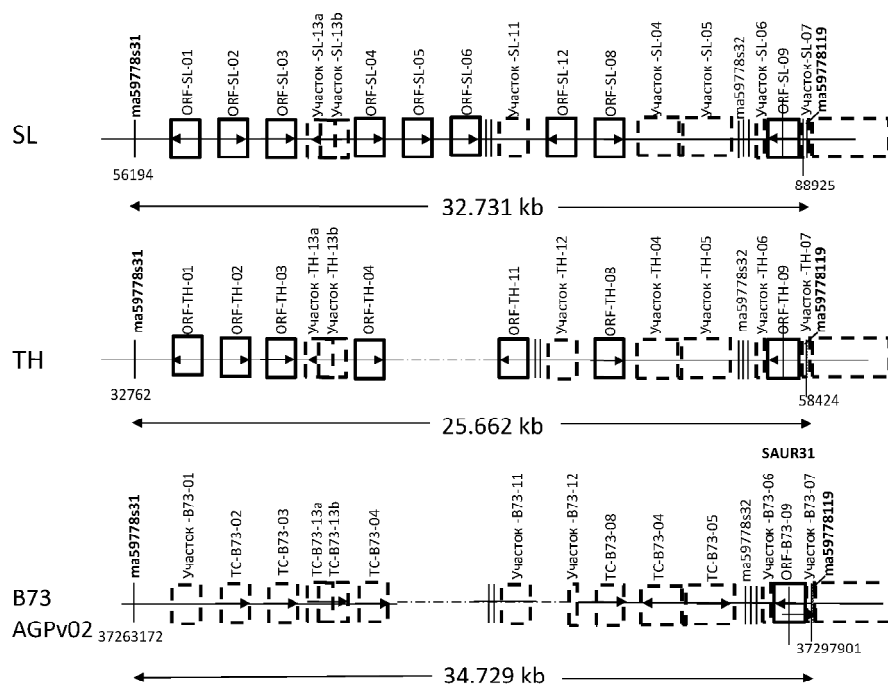
причем маркерные позиции в отношении генома кукурузы референсной линии B73 AGPv02: ma59778119=37297901 bp и ma20205s01=156998152 bp.

8. Способ идентификации холодоустойчивого растения кукурузы по п.6 или 7, включающий стадии А) выделения ДНК из генома растения кукурузы и В) детекцию аллелей в маркерных позициях ma59778s31, ma59778s32 и ma59778119, которые являются диагностическими для нуклеиновой кислоты, придающей холодоустойчивость по п. 6, в хромосомном интервале, фланкируемом маркерными позициями ma59778s31 и ma20205s01,

причем в маркерной позиции ma59778s31 аллель - Т, в маркерной позиции ma59778s32 аллель - Т и в маркерной позиции ma59778119 аллель - С, или

причем в маркерной позиции ma59778s31 аллель - С, в маркерной позиции ma59778s32 аллель - Т и в маркерной позиции ma59778119 аллель - С, и

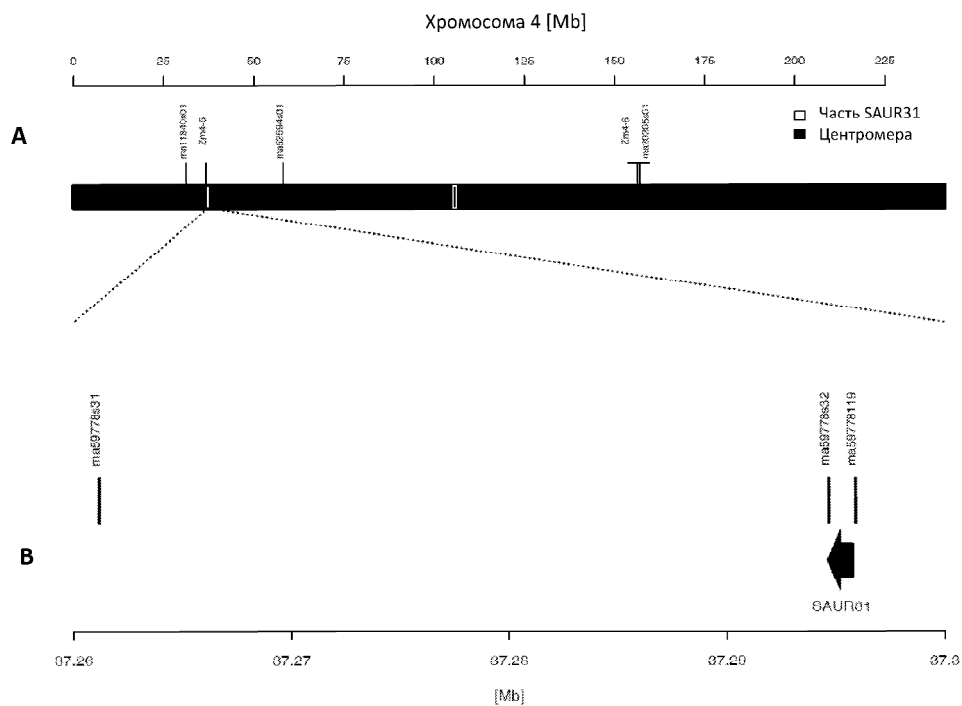
причем маркерные позиции в отношении генома кукурузы референсной линии B73 AGPv02: ma59778s31=37263172 bp и ma20205s01=156998152 bp.



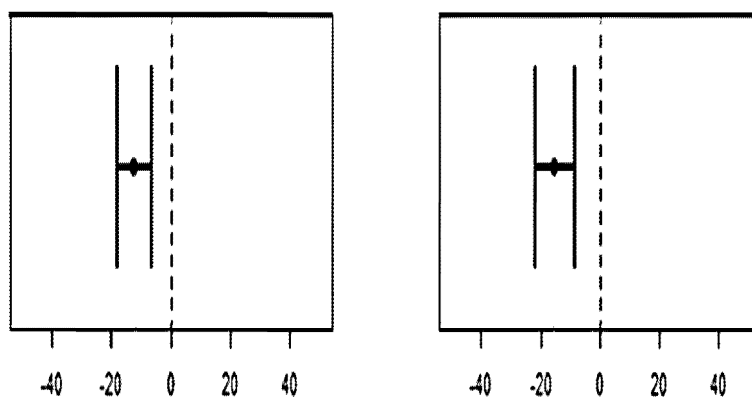
Фиг. 1



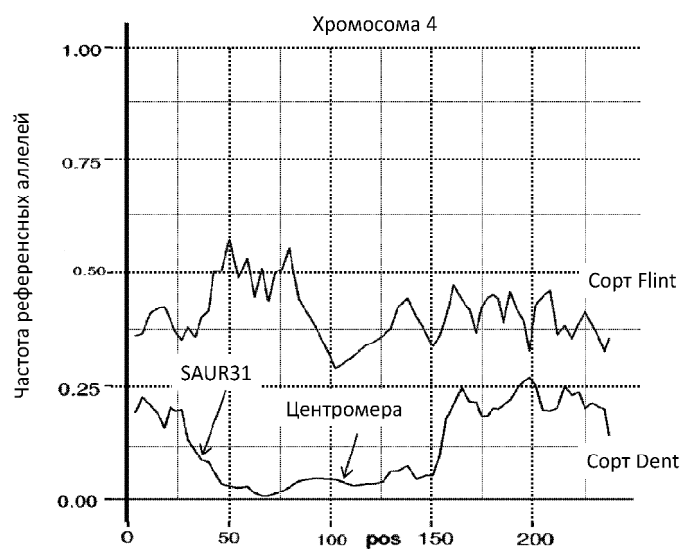
Фиг. 2



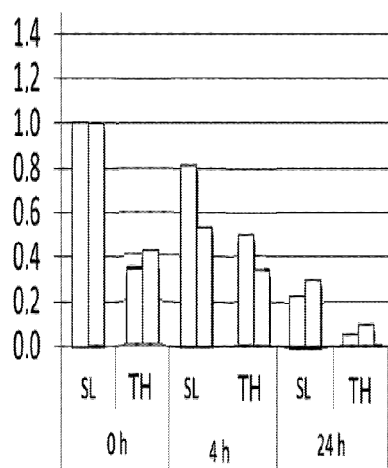
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2