

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040147**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.25

(21) Номер заявки
201891223

(22) Дата подачи заявки
2016.12.21

(51) Int. Cl. **A01H 5/10** (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(54) **РАСТЕНИЕ-ВОССТАНОВИТЕЛЬ ФЕРТИЛЬНОСТИ**(31) **10 2015 016 445.7**(32) **2015.12.21**(33) **DE**(43) **2018.12.28**(86) **PCT/EP2016/082268**(87) **WO 2017/109012 2017.06.29**

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

(72) Изобретатель:
**Уайлд Пир, Корзун Виктор, Мензель
Ютта, Жоу Руонан, Штайн Нилс,
Хакауф Бернд (DE)**

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

(56) BERND HACKAUF ET AL.: "Development of conserved ortholog set markers linked to the restorer gene in rye", MOLECULAR BREEDING, vol. 30, no. 3, 9 May 2012 (2012-05-09), pages 1507-1518, XP035118106, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO ISSN: 1572-9788, DOI:10.1007/S11032-012-9736-5, cited in the application, page 1512, left-hand column, paragraph 2, figure 2
DATABASE EMBL [Online], 29 September 2009 (2009-09-29), "Sequence 52057 from patent US 7569389.", XP002768181, retrieved from EBI

accession no.EM_PAT:GP689296, Database accession no. GP689296, sequence

DATABASE EMBL [Online], 25 June 2009 (2009-06-25), "Triticum aestivum cDNA, clone: SET4_K09, cultivar: Chinese Spring.", XP002768182, retrieved from EBI accession no.EM_HTC:AK330518, Database accession no. AK330518, sequence

DATABASE UniProtKB [Online], 31 May 2011 (2011-05-31), "Predicted Protein", XP002768183, retrieved from UniProt Database accession no. F2E8U5, sequence

DATABASE UniProtKB [Online], 19 March 2014 (2014-03-19), "Uncharacterised Protein", XP002768184, retrieved from UniProt Database accession no. W5DS50, sequence

STRACKE S. ET AL.: "Development of PCR-based markers linked to dominant genes for male-fertility restoration in Pampa CMS of rye (Secale cereale L.)", THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, vol. 106, no. 7, May 2003 (2003-05), pages 1184-1190, XP055354691, ISSN: 0040-5752, DOI: 10.1007/S00122-002-1153-4, cited in the application, the whole document

K. C. FALKE ET AL.: "Rye introgression lines as source of alleles for pollen-fertility restoration in Pampa CMS", PLANT BREEDING, vol. 128, no. 5, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 528-531, XP055068330, ISSN: 0179-9541, DOI: 10.1111/j.1439-0523.2008.01589.x, cited in the application, the whole document

(57) Изобретение касается гибридных злаковых растений, получаемых путем восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) и характеризующихся уменьшенным "сопутствующим грузом". Обеспечиваются растения, в частности рожь, которые как растения пыльцы мужского родителя способны восстанавливать фертильность пыльцы при ЦМС Р-типа. Также обеспечиваются молекула нуклеиновой кислоты, несущая необходимую информацию в отношении восстановления ЦМС Р-типа, ДНК и векторы, содержащие такую молекулу нуклеиновой кислоты, соответствующие клетки-хозяева, а также белок, который может кодироваться молекулой нуклеиновой кислоты, и направленные к нему антитела. Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способы получения соответствующих гибридных растений и трансгенных растений.

B1**040147****040147 B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к селекции растений и зеленой биотехнологии и касается получения гибридных растений путем использования молекулярно-биологических методов, маркерной технологии и генной инженерии. В частности, изобретение обеспечивает гибридные злаковые, получаемые путем восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС Р-типа), возникающей в цитоплазме Пампа, и/или содержащие полное восстановление фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС Р-типа), возникающей в цитоплазме Пампа. Они характеризуются тем, что сохраняются негативные эффекты, обычно эффекты снижения урожайности, которые в принципе связаны с интрогрессией хромосомных сегментов, содержащих локус, ответственный за восстановление фертильности в культиварах. В этом отношении настоящее изобретение обеспечивает растения, в частности, растения ржи, которые, как растения пыльцы мужского родителя, способны восстанавливать фертильность пыльцы при ЦМС Р-типа, в результате чего у гибридных растений, получаемых путем скрещивания этих растений пыльцы мужского родителя с женским ЦМС родителем, "сопутствующий груз", в принципе сцепленный с признаком восстановления фертильности, уменьшается или полностью элиминируется.

Изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, несущие необходимую информацию в отношении восстановления фертильности при ЦМС Р-типа, ДНК и векторы, содержащие такую молекулу нуклеиновой кислоты, соответствующие клетки-хозяева, а также белок, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, и направленные к нему антитела. Изобретение также касается использования молекул нуклеиновой кислоты, ДНК, векторов и антител, например, для получения гибридных растений.

Предпосылки создания изобретения

Вследствие своей резко выраженной устойчивости к стрессу при выращивании в местах с недостатком питания и недостатком влаги, а также на площадях водосборного бассейна с ограниченным использованием пестицидов, рожь демонстрирует значительные преимущества в смысле урожайности перед ячменем и пшеницей и поэтому имеет большой сельскохозяйственный потенциал. Использование цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) у ржи открыло, помимо прочего, возможность селекции гибридных сортов, обладающих высоким потенциалом урожайности, с помощью гетерозиса (Geiger, H. H. и T. Miedaner, "гибридная рожь и гетерозис". Генетика и использование гетерозиса в растениеводстве. Crop Science Society, Америка, Мадисон, Висконсин, США (1999): 439-450). Значение гибридов ржи в сельскохозяйственном производстве Европы постоянно растет. Только в Германии, Дании и Австрии гибридные сорта ржи составляют более 70% от всех культивируемых сортов. В будущем ожидается существенное использование гибридных сортов ржи в других регионах, особенно в Восточной Европе. Рожь в основном используется на корм для животных и для производства хлеба, при этом рожь обычно смешивают с другими зерновыми. Кроме того, рожь приобретает все большее значение в качестве субстрата для получения биоэнергии.

В настоящее время гибридные системы ржи основываются на использовании цитоплазмы Рампа (Р), которая, вместе с невосстановителями, опосредует мужскую стерильность (ЦМС Р-типа) в ядерном геноме. Это было обнаружено в конце 1960-х гг. среди растений аргентинской ржи (Geiger, H. H., и F.W. Schnell. "Цитоплазматическая мужская стерильность у ржи (*Secale cereale* L.)" Crop Science 10.5 (1970): 590-593). Эта ЦМС демонстрирует отличную стабильность в условиях окружающей среды и стабильно сохраняется во всех европейских селекционных популяциях генотипов линий-невосстановителей. Поиск эффективных восстановителей мужской фертильности при ЦМС Р-типа был богато вознагражден обнаружением примитивных популяций ржи IRAN IX, Pico Gentario или Altevogt 14160 в генном банке (Geiger H. H., Miedaner T. (1996) Генетическая основа и фенотипическая стабильность восстановления мужской фертильности у ржи. Vortr plantszüchtg 35:27-38; Miedaner T., Glass C, Dreyer F., Wilde P., Wortmann H., Geiger H. H. (2000) Картирование генов для восстановления мужской фертильности Р-ЦМС у озимой ржи (*Secale cereale* L.). Theor Appl Genet 101: 1226-1233; Falke K. C., Wilde P., Miedaner T. (2009) Интрогрессивные линии ржи как источник аллелей для восстановления фертильности пыльцы Р-ЦМС. Plant Breeding 128:528-531). IRAN IX - это самонесовместимая популяция ржи, собранная Kuckuck в регионе Альборз-Кередж (1956; Доклад правительству Ирана о распределении и разновидности зерновых культур в Иране. Отчет ФАО № 517:1-22) и помещенная в генный банк Федерального центра сельскохозяйственных исследований (FAL). Pico Gentario происходит из Аргентины, и популяция Altevogt 14160 также происходит из Ирана. Обе эти популяции являются самонесовместимыми и могут быть получены в Ботаническом саду Польской академии наук в Варшаве. В отличие от генотипов-восстановителей, происходящих из источников Центральной Европы, IRAN IX, Pico Gentario и Altevogt 14160 обладают высокой и стабильной способностью к восстановлению фертильности. По сравнению с источниками из Центральной Европы они характеризуются хорошим осыпанием пыльцы, что играет решающую роль в минимизации поражения спорыньей. Заражение спорыньей является одним из самых экономически значимых заболеваний ржи (*Claviceps purpurea* [Fr.] Tul.). В результате, начиная с 2008 г., сорта ржи, восприимчивые к спорынье, вносятся в список сортов Федерального ведомства по сортоиспытанию и Исследовательского центра сортоиспытаний Польши (COBORU) для оценки гибридов ржи. Улучшение признака осыпания пыльцы у гибридных сортов, например озимой ржи при помощи эффективных локусов-

восстановителей, таких как Rfp1, сегодня является наиболее экологически безопасной и рассчитанной на долгосрочную перспективу стратегией по минимизации заражения сортов гибридной ржи спорыньей. В общем, интрогрессия этих источников-восстановителей в пыльцу родительских линий свидетельствует о значительном прогрессе в деле восстановления фертильности у гибридов.

Анализ с помощью картирования для определения локализации локуса-восстановителя фертильности Rfp1 донорной IRAN IX, Rfp2 донорной Pico Gentario или локуса из Altevogt 14160 показал, что каждый из локусов занимал позицию на длинном плече хромосомы 4R (Miedaner et al., 2000. Картирование генов-восстановителей мужской фертильности Р-ЦМС у озимой ржи (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet* 101:1226-1233; Stracke et al., 2003. Создание ПЦР-маркеров, связанных с доминантными генами-восстановителями мужской фертильности Р-ЦМС у ржи (*Secale cereale* L.), *Theor Appl Genet* (2003) 106:1184-1190; Falke et al., 2009. Интрогрессивные линии ржи как источник аллелей для восстановления фертильности пыльцы Р-ЦМС. *Plant Breeding* 128: 528-531, Hackauf et al., 2012. Создание COS-маркеров гена-восстановителя Rfp1 у ржи. *Molecular Breeding* 30: 1507-1518). Исследования с использованием ассоциированных селективных маркеров показали, что несколько генов-восстановителей фертильности, по-видимому, могли образовывать кластер в соответствующем участке хромосомы 4RL, либо соответствующий ген-восстановитель мог представлять собой аллель одного и того же генного локуса (Hackauf et al., 2012. "Создание консервативных маркеров генов-ортологов, связанных с геном-восстановителем Rfp1 у ржи". *Molecular Breeding* 30.3: 1507-1518).

Хотя использование данных локусов-восстановителей фертильности, с одной стороны, является положительным с точки зрения восстановительных свойств и осыпания пыльцы, однако, с другой стороны, ассоциированные интрогрессивные сегменты, содержащие локусы-восстановители, снижают агрономическую способность существующих на сегодняшний день популяций. В частности, выход зерна так существенно снижается по вине геномного участка, фланкирующего гены-восстановители фертильности ("сопутствующий груз"), что эффект гетерозиса у гибридов уменьшается или совсем не проявляется. Более того, обсуждалось, что, возможно, наблюдаемый эффект "сопутствующего груза" или по меньшей мере часть его в действительности является результатом плейотропного действия гена-восстановителя фертильности. Несмотря на многократно повторяемое возвратное скрещивание, сопровождаемое экстенсивной разработкой маркеров, которая длится уже более десяти лет, к настоящему времени удалось только грубо определить генетическую позицию. Путем непрерывного отбора с помощью более или менее сцепленных предшествующих маркеров и целевого гена в основном был сохранен размер интрогрессивного фрагмента с локусом-восстановителем фертильности, при этом сохранялось и большое количество неподходящих генов донора, делая эффект "сопутствующего груза" вполне вероятным. Hackauf et al. (2012) ("Создание консервативных маркеров генов-ортологов, связанных с геном-восстановителем Rfp1 у ржи". *Molecular Breeding* 30.3: 1507-1518) показали в отношении Rfp1 существующую на сегодняшний день действительную ситуацию, касающуюся картирования геномного участка интереса вокруг локуса-восстановителя фертильности на 4R. При помощи сравнительного картирования гена на основе полностью декодированных геномов злаковых трав они смогли ограничить интрогрессивный сегмент, включая сам локус Rfp1, до интервала приблизительно 2,0 сМ, фланкируемого маркерами tc135788 и tc176835, либо до интервала 0,7 сМ, фланкируемого маркерами tc256739 и tc300731. Однако сам ген-восстановитель фертильности не был идентифицирован. Также до сих пор не приведены достаточные доказательства, касающиеся масштаба и локализации снижения агрономической способности. Отсутствуют сведения о получении рекомбинантов, в отношении которых можно было бы коррелировать изменение в интрогрессивном сегменте с агрономической способностью.

Целью настоящего изобретения является дальнейшее развитие интрогрессивных сегментов на основе вышеупомянутых локусов-восстановителей фертильности так, чтобы они действительно сохраняли желаемые восстановительные свойства, и при этом снижения в агрономической способности больше не проявлялись, либо были сокращены или сведены до минимума. В частности, целью изобретения является встройка и, таким образом, обеспечение генов-восстановителей фертильности, составляющих основу селекционных программ получения гибридов злаковых трав, предпочтительно зерновых, путем тонкого картирования с высоким разрешением ассоциированного участка. В контексте изобретения ожидается получение генотипов, которые с помощью тесно сцепленных маркеров вокруг локуса-восстановителя фертильности определяют гаплотипы в отношении целевого участка, который может точно, количественно и качественно, быть связанным с изменениями в агрономической способности. Помимо этого, целью изобретения является идентификация маркеров, которые встроены в сам ген-восстановитель фертильности, и с их помощью получение гена-восстановителя фертильности для целей селекции.

Описание изобретения

Вышеупомянутая цель достигается путем обеспечения растения, в частности, растения порядка Злаковые (Poales), которое пригодно, как носитель пыльцы мужского родителя, для восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа). Предпочтительно растение является растением семейства Мятликовые (Poaceae) или рода *Secale* или *Hordeum*, наиболее предпочтительно растением вида *Secale cereale* или *Hordeum vulgare*. Растение характеризуется тем, что у растения или у гибридного растения, получаемого путем скрещивания этого растения с жен-

ским ЦМС родителем того же вида, эффект "сопутствующего груза" (см. Nackauf et al., 2012), в принципе ассоциированный с признаком восстановления фертильности, предпочтительно эффектом снижения урожайности, уменьшен или полностью элиминирован. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает получение растения, у которого в локусе-восстановителе фертильности от генов-восстановителей Rfp1a и Rfp1b могут быть "отцеплены" нежелательные, негативные агрономические свойства. Такое "отцепление" означает, что получение высокого урожая может быть связано со способностью к восстановлению эффективной фертильности.

В одном особенном варианте осуществления изобретения клетки растений имеют цитоплазму, которая опосредует цитоплазматическую мужскую стерильность (ЦМС) типа Пампа. Настоящее изобретение также обеспечивает гибридное растение с высоким потенциалом урожайности, обладающее способностью к восстановлению эффективной фертильности, либо растение, которое в качестве пыльцевого родителя подходит для предпочтительно полного восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) типа Пампа. При этом "сопутствующий груз", способный существенно понижать агрономическую способность свойства, в частности снижать урожайность, уменьшается или полностью элиминируется.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения обеспечивается растение, содержащее хромосомный сегмент, который содержит по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты, способную опосредовать признак восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа. Предпочтительно хромосомный сегмент представляет собой интервал между маркерными локусами tc256739, ctg32 или ctg24met2a5 и tc300731 или 7_01_H_1441 на хромосоме 4R из донора, выбираемого из группы, состоящей из IRAN IX, Pico Gentario и Altevoigt 14160. Указанный хромосомный сегмент может также присутствовать у других близких доноров. Такие доноры, имеющие генетическую структуру хромосомного сегмента и содержащие по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты, как здесь показано, в частности, встречаются в Средиземноморских регионах, например, Турции или Испании. В этом отношении могут быть использованы молекулярные маркеры по данному изобретению, такие как описано ниже. Таким образом, настоящее изобретение не ограничивается донорами, выбираемыми из группы, состоящей из IRAN IX, Pico Gentario и Altevoigt 14160, и может также касаться, даже если это специально не оговорено, других наиболее близких доноров, которые могут служить источником хромосомного сегмента по данному изобретению и по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты по данному изобретению.

Указанный хромосомный сегмент может представлять собой один из следующих интервалов: между маркерными локусами tc256739 и tc300731, между маркерными локусами ctg32 и tc300731, между маркерными локусами ctg24met2a5 и tc300731, между маркерными локусами ctg2 и tc300731, между маркерными локусами ctg16b и tc300731, между маркерными локусами c40745_1 и tc300731, между маркерными локусами P20 и tc300731, между маркерными локусами tc256739 и 7_01_H_1441, между маркерными локусами ctg32 и 7_01_H_1441, между маркерными локусами ctg24met2a5 и 7_01_H_1441, между маркерными локусами ctg2 и 7_01_H_1441, между маркерными локусами c40745_1 и 7_01_H_1441, между маркерными локусами P20 и 7_01_H_1441, между маркерными локусами tc256739 и 72F13_c2_mTERF, между маркерными локусами tc256739 и P20, между маркерными локусами tc256739 и c40745_1, между маркерными локусами tc256739 и ctg16b, между маркерными локусами ctg32 и 72F13_c2_mTERF, между маркерными локусами ctg32 и P20, между маркерными локусами ctg32 и c40745_1, между маркерными локусами ctg32 и ctg16b, между маркерными локусами ctg24met2a5 и 72F13_c2_mTERF, между маркерными локусами ctg24met2a5 и P20, между маркерными локусами ctg24met2a5 и c40745_1, между маркерными локусами ctg24met2a5 и ctg16b, между маркерными локусами ctg2 и 72F13_c2_mTERF, между маркерными локусами ctg2 и P20, между маркерными локусами ctg2 и c40745_1 либо между маркерными локусами ctg2 и ctg16b. Кроме того, эффект "сопутствующего груза" предпочтительно представляет собой эффект "сопутствующего груза", который изначально был сцеплен с хромосомным сегментом, от которого происходит восстанавливающая молекула нуклеиновой кислоты. Молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая имеет нуклеотидную последовательность, кодирующую митохондриальный фактор терминации транскрипции (mTERF), либо ее гомолог, аналог, ортолог или функциональный фрагмент. "По меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты" может означать одну, две, три, четыре или пять молекул нуклеиновой кислоты; предпочтительно "по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты" означает одну или две молекулы нуклеиновой кислоты.

Источником хромосомного сегмента, который содержит по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты, способную опосредовать признак восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа, могут быть примитивные популяции ржи IRAN IX, Pico Gentario и Altevoigt 14160 из генного банка (Geiger et al., *Vortr plantszüchtg* 35 (1996), 27-38; Miedaner et al., *Theor Appl Genet* 101 (2000), 1226-1233; Falke et al., *Plant Breeding* 128 (2009), 528-531). IRAN IX - это самонесовместимая популяция ржи, собранная Kuckuck в регионе Альборз-Кередж (Отчет ФАО № 517 (1956), 1-22) и помещенная в генный банк Федерального центра сельскохозяйственных исследований (FAL). Pico Gentario, происходящая из Аргентины, и Altevoigt 14160, происходящая из Ирана, также яв-

ляются самонесовместимыми, и обе были предоставлены Ботаническим садом Польской академии наук в Варшаве, Польша.

В одном особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты имеет нуклеотидную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из (i) нуклеотидной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, либо ее функционального фрагмента, (ii) нуклеотидной последовательности, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29, либо ее функционального фрагмента, (iii) нуклеотидной последовательности, комплементарной к нуклеотидной последовательности по пп. (i) или (ii), (iv) нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностью по п. (iii), (v) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85 или 90%, предпочтительно по меньшей мере на 91, 92, 93, 94 или 95%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 99,5% идентична нуклеотидной последовательности по пп.(i) или (ii), (vi) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 65, 70, 75, 80, 85 или 90%, предпочтительно по меньшей мере на 91, 92, 93, 94 или 95%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 99,5% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29, либо ее функционального фрагмента, (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, которая по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29 проявляет изменения в аминокислотной последовательности в форме аминокислотных делеций, замещений, присоединений и/или инсерций в аминокислотной последовательности, предпочтительно составляющих не более 30, 25 или 20%, более предпочтительно не более 18, 16, 14, 12 или 10% или наиболее предпочтительно не более 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0,5% от всей аминокислотной последовательности. Предпочтительно по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты кодирует один или несколько митохондриальных факторов терминации транскрипции (mTERF) или его функциональный фрагмент. Белковое семейство mTERF разделяет несколько важных функций с семейством пентатрикопептид (PPR). Как и семейство mTERF, семейство пентатрикопептид представляет собой необычное семейство РНК-связывающих белков, характеризующихся выродженными спиралевидными повторами. В семействе PPR они состоят из приблизительно 35 аминокислот (Small et al., Trends Biochem. Sci. 25 (2000), 46047), в отличие от повторов mTERF, которые состоят из приблизительно 31 аминокислоты, образующих три витка вместо двух (Hammani et al., Nucleic Acids Res 42 (2014), 5033-5042). Нельзя исключать возможность того, что присутствие одного или нескольких генов PPR может оказывать вредное воздействие на позитивный эффект растений с улучшенными свойствами, как описано выше. Таким образом, согласно одному варианту осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты растения предпочтительно не содержит ген функционального белка пентатрикопептид (PPR), происходящий от донора.

Как показано выше в п.(vii), по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты может кодировать аминокислотную последовательность, которая по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29 содержит изменения в форме аминокислотных замещений, делеций, инсерций и/или присоединений. Предпочтительно такая молекула нуклеиновой кислоты способна связываться в жестких условиях с комплементарной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 либо SEQ ID NO: 28 или 29.

Как будет показано на примерах ниже, можно было идентифицировать близко фланкирующие маркеры гена Rfp1 и таким образом получать тесно сцепленные маркеры для картирования с высоким разрешением гена Rfp1 ржи; помимо прочего, это позволило фланкировать ген-восстановитель фертильности и исследовать целевой участок Rfp1 в геномах зерновых. Впервые стало возможным осуществлять перенос целевого гена на основе использования маркера в новый селекционный материал и проводить эффективный отбор, исключая нежелательный генетический фон донорного генома.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения хромосомный сегмент растения содержит один или несколько следующих маркерных локусов донора: ct2 (продукт амплификации праймера SEQ ID NO: 4 и 5), P20 (продукт амплификации праймера SEQ ID NO: 6 и 7), 72F13_c2_mTERF (продукт амплификации праймера SEQ ID NO: 8 и 9) или ctg16b (продукт амплификации праймера SEQ ID NO: 10 и 11). Признак восстановления фертильности пыльцы растения может также характеризоваться отсутствием одного или нескольких следующих маркерных локусов донора: 7_01_H_1441 (продукт амплификации праймера SEQ ID NO: 12 и 13), ctg24met2a5 (продукт амплификации праймера SEQ ID NO: 14 и 15) или ctg32 (продукт амплификации праймера SEQ ID NO: 16 и 17).

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения хромосомный сегмент растения содержит маркерные локусы донора ctg32, ctg24met2a5, ctg2, ctg16b и c40745_1 (продукт амплификации праймера SEQ ID NO: 18 и 19), и маркерные локусы донора tc256739 (продукт амплификации праймера SEQ ID NO: 21 и 22), 72F13_c2_mTERF, P20, 7_01_H_1441 и tc300731 (продукт амплификации праймера SEQ ID NO: 23 и 24) отсутствуют в хромосомном сегменте.

Согласно еще одному особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения хромосомный сегмент растения содержит маркерные локусы донора ctg32, Ctg24met2a5, ctg2 и ctg16b, и маркерные локусы донора tc256739, c40745_1, 72F13_c2_mTERF, P20, 7_01_H_1441 и tc300731 отсутствуют

в хромосомном сегменте.

Согласно еще одному особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения хромосомный сегмент растения содержит маркерные локусы донора ctg32, Ctg24met2a5 и ctg2 и маркерные локусы донора tc256739, ctg16b, c40745_1, 72F13_c2_mTERF, P20, 7_01_H_1441 и tc300731 отсутствуют в хромосомном сегменте.

Согласно еще одному особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения хромосомный сегмент растения содержит маркерные локусы донора 72F13_c2_mTERF, P20 и 7_01_H_1441 и маркерные локусы донора tc256739, ctg32, Ctg24met2a5, ctg2, ctg16b, c40745_1 и tc300731 отсутствуют в хромосомном сегменте.

Согласно еще одному особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения хромосомный сегмент растения содержит маркерные локусы донора 72F13_c2_mTERF и P20 и маркерные локусы донора tc256739, ctg32, ctg24met2a5, ctg2, ctg16b, c40745_1, 7_01_H_1441 и tc300731 отсутствуют в хромосомном сегменте.

Согласно еще одному особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения хромосомный сегмент растения содержит маркерные локусы донора c40745_1, 72F13_c2_mTERF, P20 и 7_01_H_1441 и маркерные локусы донора tc256739, ctg32, ctg24met2a5, ctg2, ctg16b и tc300731 отсутствуют в хромосомном сегменте.

Согласно еще одному особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения хромосомный сегмент растения содержит маркерные локусы донора c40745_1, 72F13_c2_mTERF, P20 и 7_01_H_1441 и маркерные локусы донора tc256739, ctg32, ctg24met2a5, ctg2, ctg16b и tc300731 отсутствуют в хромосомном сегменте.

Согласно еще одному особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения хромосомный сегмент растения содержит маркерные локусы донора c40745_1, 72F13_c2_mTERF и P20 и маркерные локусы донора tc256739, ctg32, Ctg24met2a5, ctg2, ctg16b, 7_01_H_1441 и tc300731 отсутствуют в хромосомном сегменте.

Согласно еще одному особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения хромосомный сегмент растения содержит маркерные локусы донора ctg16b, c40745_1, 72F13_c2_mTERF, P20 и 7_01_H_1441 и маркерные локусы донора tc256739, ctg32, ctg24met2a5, ctg2 и tc300731 отсутствуют в хромосомном сегменте.

Согласно еще одному особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения хромосомный сегмент растения содержит маркерные локусы донора ctg16b, c40745_1, 72F13_c2_mTERF и P20 и маркерные локусы донора tc256739, ctg32, Ctg24met2a5, ctg2, 7_01_H_1441 и tc300731 отсутствуют в хромосомном сегменте.

Согласно еще одному особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения хромосомный сегмент растения содержит маркерные локусы донора ctg2, ctg16b, c40745_1, 72F13_c2_mTERF, P20 и 7_01_H_1441 и маркерные локусы донора tc256739, ctg32, ctg24met2a5 и tc300731 отсутствуют в хромосомном сегменте.

Согласно еще одному особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения хромосомный сегмент растения содержит маркерные локусы донора ctg2, ctg16b, c40745_1, 72F13_c2_mTERF и P20 и маркерные локусы донора tc256739, ctg32, Ctg24met2a5, 7_01_H_1441 и tc300731 отсутствуют в хромосомном сегменте.

Согласно еще одному особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения хромосомный сегмент растения содержит маркерные локусы донора Ctg24met2a5, ctg2, ctg16b, c40745_1, 72F13_c2_mTERF, P20 и 7_01_H_1441 и маркерные локусы донора tc256739, ctg32 и tc300731 отсутствуют в хромосомном сегменте.

Согласно еще одному особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения хромосомный сегмент растения содержит маркерные локусы донора Ctg24met2a5, ctg2, ctg16b, c40745_1, 72F13_c2_mTERF и P20 и маркерные локусы донора tc256739, ctg32, 7_01_H_1441 и tc300731 отсутствуют в хромосомном сегменте.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения размер хромосомного сегмента составляет не более 190 kb, не более 150 kb или не более 100 kb, предпочтительно не более 75 kb или не более 50 kb, особенно предпочтительно не более 40 kb, не более 30 kb, не более 25 kb или не более 20 kb. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения хромосомный сегмент содержит фрагмент ДНК размером 18425 kb, предпочтительно имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 85 или 90%, предпочтительно по меньшей мере на 91, 92, 93, 94 или 95%, либо особенно предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 99,5% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты не содержит ген функционального белка пентатрикопептид (PPR), происходящий из донора.

Растение по данному изобретению предпочтительно является инбредным растением, диплоидным растением или гибридным растением и/или предпочтительно гомозиготным или гетерозиготным в отношении восстанавливающего признака, хромосомного сегмента или по меньшей мере одной молекулы

нуклеиновой кислоты. Гибридное растение может быть простым гибридом, двойным гибридом, топ-кроссным гибридом, трехлинейным гибридом, тройным гибридом, комплексным гибридом, сложным гибридом, полностью восстановленным гибридом, гибридом второго поколения или иным гибридом. Предпочтительно растение по данному изобретению действует в качестве донора пыльцы при скрещивании с целью получения гибрида и/или для опыления с целью получения семян гибридного растения.

Идентификацию генов-восстановителей в данном исследовании, а также факторов, отвечающих за "сопутствующий груз", проводили по злаковым травам. Предпочтительно показанные здесь результаты получены по зерновым культурам, при этом исследуемыми растениями были рожь (*Secale*), ячмень (*Hordeum*) или зерновая культура, полученная из ржи (первый партнер) и пшеницы (второй партнер), известная как *Triticale*. Негативное воздействие "сопутствующего груза", тесно сцепленного с локусом-восстановителем *Rfp1*, играет решающую роль при селекции гибридных зерновых культур, в частности, таких как рожь, у которой это приводит к снижению урожая. Аналогичные трудности отмечены при селекции гибридных сортов ячменя. Вследствие генетического сходства хромосомных участков локуса-восстановителя у ржи и ячменя, а также у *Triticale*, в одном варианте настоящего изобретения растение является растением рода *Secale*, *Hordeum* или *Triticale*, предпочтительно растением вида *Secale cereale* и *Hordeum vulgare*.

Кроме растений с отличными восстанавливающими свойствами и без "сопутствующего груза" или с уменьшенным "сопутствующим грузом", изобретение также охватывает семена или потомков этих растений, характеризующихся тем, что они содержат определенный хромосомный сегмент или по меньшей мере одну определенную молекулу нуклеиновой кислоты в отношении восстанавливающего признака. Потомки также демонстрируют улучшенный восстанавливающий признак без "сопутствующего груза" или с уменьшенным "сопутствующим грузом". Более того, изобретение обеспечивает органы, части, ткани или клетки растения, обладающие присущим им восстанавливающим признаком.

Изобретение также касается олигонуклеотида, предпочтительно имеющего максимальную длину 50 нуклеотидов и представленного одной из следующих нуклеотидных последовательностей: (i) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 либо их набором или (ii) SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 либо их набором. Такие олигонуклеотиды, используемые в качестве молекулярных маркеров либо молекулярные маркеры на основе таких олигонуклеотидов также охватываются настоящим изобретением. Такими молекулярными маркерами, используемыми для определения присутствия или отсутствия маркерного локуса донора, являются маркеры на основе SNP (примеры: маркеры *KASPar* и *TaqMan*).

Улучшения, указанные выше в отношении хромосомного сегмента по данному изобретению, который, например, происходит от донора *IRAN IX*, вызваны исключительно широким и сложным развитием и проникновением хромосомного сегмента с молекулярными маркерами, тесно сцепленными с восстанавливающим локусом при Р-ЦМС (см. маркеры, представленные выше, а также табл. 2) и фланкирующими участками, которые, по-видимому, несут агрономически неблагоприятные гены ("сопутствующий груз"). Более того, фундаментальной предпосылкой является то, что маркеры подходят для высокопроизводительного скрининга. В контексте настоящего изобретения получение, идентификация и оценка рекомбинантов проводились впервые, хотя, вследствие большого генетического расстояния между элитными популяциями Центральной Европы, как получателями хромосомного сегмента, и донорной популяцией Ирана или Аргентины, частота рекомбинаций является чрезвычайно низкой. Эти трудности известны специалисту в данной области техники из литературы (Ruge B., Linz A., Pickering R., Proeseler G., Greif P., Wehling P. (2003) Картирование *Ryv^{Hb}* - гена, интрогрессированного от *Hordeum bulbosum* и придающего устойчивость к *VaMMV* и *VaYMV* у ячменя. *Theor Appl Genet* 107: 965-971).

Помимо успехов в области генотипирования целевого участка *Rfp1*, настоящее изобретение также способствовало разработке новой высокодиагностической системы фенотипирования. Фенотипические тесты методом почти изогенных групп ("near isogenic bulk" (NIB)) (см. пример 1 и 2) впервые позволили надежно определить эффект "сопутствующего груза", так как только таким образом можно было отделить эффект "сопутствующего груза" от эффектов генетического фона. В этом отношении эффекты "сопутствующего груза" могут быть рассчитаны как отношение разницы (Δ_{E-D}) между средними значениями от тест-скрещивания партнеров NIB, несущих элитный аллель (E), и соответствующими партнерами NIB, несущими донорный аллель (D), в отношении всех маркеров в хромосомном интервале (см. фиг. 2).

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение касается способа получения растения, в частности, растения порядка Злаковые (*Poales*), предпочтительно растения семейства Мятликовые (*Poaceae*), которое пригодно, как носитель пыльцы мужского родителя, для восстановления фертильности пыльцы при Р-ЦМС, при этом у гибридного растения, получаемого путем скрещивания этого растения с женским ЦМС родителем, "сопутствующий груз", в принципе сцепленный с восстанавливающим признаком, предпочтительно эффектом снижения урожайности, уменьшен или полностью элиминирован. Данный способ включает следующую стадию: удаление одного или нескольких хромосомных интервалов, содержащих один или несколько маркерных локусов донора - *7_01_H_141*, *Ctg24met2a5* или *ctg32* - из генома растения, предпочтительно из хромосомы 4R, при этом хромосомный сегмент по данному изобретению, содержащий ген *Rfp1a* или ген *Rfp1b*, как раскрыто выше, остается (см. также фиг. 1). Например, удаление одного или нескольких хромосомных интервалов может осуществляться путем генетической

рекомбинации в ходе процесса скрещивания между двумя растениями, при этом одно растение гетерозиготно по локусу Rfp1. Эта традиционная технология получения генетической рекомбинации приводит к тому, что по меньшей мере один из интервалов донора с "сопутствующим грузом", идентифицированных выше, замещается геномными последовательностями рекуррентного родителя, который предпочтительно свободен от нежелательных генов. В этом отношении удаление может включать следующие стадии: (I) скрещивание первого растения, содержащего восстанавливающий локус донора, выбираемого из группы, состоящей из IRAN IX, Pico Gentario и Altevogt 14610, со вторым растением, в котором этот восстанавливающий локус отсутствует; (II) отбор потомков, содержащих хромосомный сегмент по данному изобретению, как раскрыто выше. Предпочтительно отбор осуществляется на основе маркеров; подходящие маркеры известны специалисту в данной области из настоящего раскрытия. Такой отбор генов-восстановителей на основе маркеров может способствовать значительному ускорению процесса селекции, поскольку желаемая информация о присутствии гена-восстановителя может быть получена раньше и без сложных тест-скрещиваний.

В этом отношении настоящее изобретение также касается способа детекции растения, в частности, растения порядка Злаковые (Poales), предпочтительно растения семейства Мятликовые (Poaceae), которое пригодно, как носитель пыльцы мужского родителя, для восстановления фертильности пыльцы при Р-ЦМС, при этом у гибридного растения, получаемого путем скрещивания этого растения с женским ЦМС родителем, "сопутствующий груз", в принципе сцепленный с восстанавливающим признаком, предпочтительно эффектом снижения урожайности, уменьшен или полностью элиминирован. Этот способ включает детекцию у растения аллелей по меньшей мере из двух маркеров, происходящих от донора, выбираемого из группы, состоящей из IRAN IX, Pico Gentario и Altevogt 14610, при этом по меньшей мере один маркер локализуется на или в хромосомном интервале между tc256739 и ctg2, и по меньшей мере один маркер локализуется на или в хромосомном интервале между ctg16b и tc300731, либо при этом по меньшей мере один маркер локализуется на или в хромосомном интервале между tc256739 и c40745_1, и по меньшей мере один маркер локализуется на или в хромосомном интервале между 7_01_H_1441 и tc300731. Аналогичным образом способ включает детекцию присутствия или отсутствия у растения по меньшей мере одного маркерного аллеля, происходящего от донора, выбираемого из группы, состоящей из IRAN IX, Pico Gentario и Altevogt 14610, на или в локусе Rfp1, и отбор растений, у которых присутствует по меньшей мере один маркерный аллель. Предпочтительно локус Rfp1 означает хромосомный отрезок между маркерными локусами tc256739, ctg32 или ctg24met2a5 и tc300731 или 7_01_H_1441 на хромосоме 4R донора, выбираемого из группы, состоящей из IRAN IX, Pico Gentario и Altevogt 14610. Локус Rfp1 может, например, представлять собой один из следующих отрезков: между маркерными локусами tc256739 и tc300731, между маркерными локусами ctg32 и tc300731, между маркерными локусами ctg24met2a5 и tc300731, между маркерными локусами ctg2 и tc300731, между маркерными локусами ctg16b и tc300731, между маркерными локусами c40745_1 и tc300731, между маркерными локусами P20 и tc300731, между маркерными локусами tc256739 и 7_01_H_1441, между маркерными локусами ctg24met2a5 и 7_01_H_1441, между маркерными локусами ctg32 и 7_01_H_1441, между маркерными локусами ctg24met2a5 и 7_01_H_1441, между маркерными локусами ctg2 и 7_01_H_1441, между маркерными локусами ctg16b и 7_01_H_1441, между маркерными локусами c40745_1 и 7_01_H_1441, между маркерными локусами P20 и 7_01_H_1441, между маркерными локусами tc256739 и 72F13_c2_mTERF, между маркерными локусами и P20, между маркерными локусами tc256739 и c40745_1, между маркерными локусами tc256739 и ctg16b, между маркерными локусами ctg32 и 72F13_c2_mTERF, между маркерными локусами ctg32 и P20, между маркерными локусами ctg32 и c40745_01, между маркерными локусами ctg32 и cgl6b, между маркерными локусами ctg24met2a5 и 72F13_c2_mTERF, между маркерными локусами ctg24met2a5 и P20, между маркерными локусами ctg24met2a5 и c40745_01, между маркерными локусами ctg24met2a5 и ctg16b, между маркерными локусами ctg2 и 72F13_c2_mTERF, между маркерными локусами ctg2 и P20, между маркерными локусами ctg2 и c40745+01 или между маркерными локусами ctg2 и ctg16b. Например, в качестве маркера для детекции может быть использован один или несколько следующих олигонуклеотидов, имеющих одну из следующих нуклеотидных последовательностей: (i) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 либо их комплемент, или (ii) SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 либо их комплемент. В контексте настоящего изобретения с помощью маркеров, указанных выше, были идентифицированы рекомбинантные генотипы и был описан соответствующий остающийся интрогрессивный сегмент: см., например, пример 3. Как видно из примера 3, маркер P20 играет наиболее важную роль в идентификации и описании, потому что его использование позволило идентифицировать другие маркерные последовательности и сконструировать множество маркерных комбинаций; см. табл. 2 и пример 6.

Как вариант, современная биотехнология предоставляет специалисту в данной области техники много других инструментов для осуществления точной геномной инженерии: подходы геномной инженерии, с помощью которых можно поддерживать или непосредственно осуществлять элиминацию из генома растения нуклеотидных последовательностей, несущих "сопутствующий груз", включают использование нуклеаз TALE (TALLEN) или нуклеаз цинковые пальцы (ZFN), а также систем CRISPR/Cas, которые раскрыты, например, в немецком патентном документе DE 102013014637, касающемся элиминации нуклеотидных последовательностей, несущих "сопутствующий груз", из (гибридной) кукурузы, устойчи-

вой к *Helminthosporium turcicum*; см. DE 102013014637, стр 13 и 14, пункты [0038]-[0042] и цитируемые там ссылки. Эти технологии, которые также раскрыты в международной патентной заявке WO 2014/104878, могут быть использованы при получении растений по данному изобретению.

Настоящее изобретение также касается комбинирования традиционной технологии селекции и современной биотехнологии. Например, с помощью новой технологии геномного редактирования можно получить растение с "горячими точками" рекомбинации в подходящих сайтах для содействия удалению "сопутствующего груза". Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает специалиста в данной области техники необходимой информацией, касающейся локализации "сопутствующего груза", а также позиции гена/генов-восстановителей фертильности.

Новая технология редактирования генома также обеспечивает прямое введение хромосомного сегмента согласно изобретению с уменьшенным или полностью элиминированным "сцепленным грузом". В связи с этим настоящее изобретение охватывает еще один способ получения растения по данному изобретению, в частности, растения порядка Злаковые (Poales), предпочтительно растения семейства Мятликовые (Poaceae), которое пригодно, как носитель пыльцы мужского родителя, для восстановления фертильности пыльцы при Р-ЦМС, при этом у гибридного растения, получаемого путем скрещивания этого растения с женским ЦМС родителем, "сопутствующий груз", в принципе сцепленный с восстанавливающим признаком, предпочтительно эффектом снижения урожайности, уменьшен или полностью элиминирован. Этот способ включает следующие стадии: (I) обеспечение части растения, которая предпочтительно не несет восстанавливающий локус по данному изобретению, в качестве целевой структуры, содержащей целевой участок нуклеиновой кислоты, предпочтительно геномной ДНК, соответствующий хромосомной позиции локуса Rfp1 целевой структуры; (II) обеспечение одной или нескольких рекомбинантных конструкций, которые вместе содержат или кодируют компоненты инструмента геномного редактирования; (III) обеспечение по меньшей мере одного вектора для введения рекомбинантной конструкции/конструкций; (IV) обеспечение по меньшей мере еще одной рекомбинантной конструкции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по данному изобретению, рекомбинантную ДНК, экспрессионную кассету или хромосомный сегмент, для целевой гомологично направленной репарации целевого участка нуклеиновой кислоты в целевой структуре растения либо для инсерции в целевой участок нуклеиновой кислоты целевой структуры растения; (V) введение рекомбинантных конструкций по пп. (II) и (IV) в целевую структуру растения; (VI) культивирование целевой структуры растения в условиях, активирующих компоненты инструмента геномного редактирования, и, таким образом, обеспечение осуществления целевой модификации в целевом участке нуклеиновой кислоты целевой структуры растения для получения целевой структуры растения, содержащей по меньшей мере одну клетку, включающую целевую модификацию целевого участка нуклеиновой кислоты; и (VII) регенерирование растения по меньшей мере из одной клетки.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение касается способа получения гибридного растения, предпочтительно растения порядка Злаковые (Poales), особенно предпочтительно растения семейства Мятликовые (Poaceae) или растения рода *Secale* или *Hordeum*, наиболее предпочтительно растения вида *Secale cereale* или *Hordeum vulgare*. Этот способ включает в качестве первой стадии (1) способ получения растения, способного, в качестве носителя пыльцы мужского родителя, восстанавливать фертильность пыльцы при Р-ЦМС, как описано выше. На следующей стадии (2) данного способа растение, полученное на стадии (1), либо его потомок, которое все еще содержит хромосомный сегмент по данному изобретению или молекулу нуклеиновой кислоты по данному изобретению, скрещивают, как носителя пыльцы мужского родителя, с женским ЦМС родителем предпочтительно того же вида. В этом случае растение-носитель пыльцы мужского родителя и/или растение женского ЦМС родителя предпочтительно является диплоидным растением, инбредным растением, простым гибридом с ЦМС либо растением, известным как синтетический гибрид. На стадии (3) собирают гибридные семена с женского ЦМС родителя. Альтернативная стадия (4) включает высевание гибридных семян для получения гибридного растения и дополнительные альтернативные стадии (5) выращивание семян гибридного растения и (6) высевание семян гибридного растения. Согласно варианту осуществления настоящего изобретения обеспечивается семя или семена и растения или гибридные растения, получаемые или которые могут быть получены с помощью данного способа.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение обеспечивает молекулу нуклеиновой кислоты, пригодную для опосредования восстанавливающего признака с уменьшенным или полностью элиминированным "сопутствующим грузом", причем молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из (i) нуклеотидной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, либо ее функционального фрагмента, (ii) нуклеотидной последовательности, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29, либо ее функционального фрагмента, (iii) нуклеотидной последовательности, комплементарной к нуклеотидной последовательности по пп. (i) или (ii), (iv) нуклеотидной последовательности, которая гибридируется в жестких условиях с последовательностью по пп. (iii), (v) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85 или 90%, предпочтительно по меньшей мере на 91, 92, 93, 94 или 95%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98, 99

или 99,5% идентична нуклеотидной последовательности по пп. (i) или (ii), (vi) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 65, 70, 75, 80, 85 или 90%, предпочтительно по меньшей мере на 91, 92, 93, 94 или 95%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 99,5% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29, либо ее функционального фрагмента, (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, которая по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29 проявляет изменения в аминокислотной последовательности в форме аминокислотных делеций, замещений, присоединений и/или инсерций в аминокислотной последовательности, предпочтительно составляющих не более 30, 25 или 20%, более предпочтительно не более 18, 16, 14, 12 или 10% или наиболее предпочтительно не более 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0,5% от всей аминокислотной последовательности. В результате точной идентификации и тонкого картирования восстанавливающего признака люкаса-восстановителя Rfp1, молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше, можно также использовать другими способами с целью улучшения свойств растения. Для этой цели настоящим изобретением обеспечивается экспрессионная кассета, рекомбинантная ДНК или векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, соответственно.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты представляет собой рекомбинантную ДНК. Как правило, в таком случае в нее включается или ассоциируется с ней промотор и/или другие элементы контроля транскрипции или трансляции. Используемые промоторы должны быть прежде всего промоторами, обеспечивающими транскрипцию ДНК только в определенных клетках. Помимо промоторов существует множество других элементов контроля транскрипции, которые включают, например, но не ограничиваются этим, энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, и которые функционально связаны с ДНК, для обеспечения таргетной транскрипции, специфичной для целевой клетки. Промоторы и другие регуляторные элементы транскрипции известны и доступны специалисту в данной области техники из предшествующего уровня техники; см., например, WO 00/75359, стр. 23, строка 5, и стр. 24, строка 17.

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 молекула нуклеиновой кислоты по данному изобретению оперативно связана с одной или несколькими регуляторными последовательностями, которые обеспечивают транскрипцию и, как вариант, экспрессию в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине; см., например, Sambrook et al., Молекулярное клонирование: практикум 3-е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001 и международную заявку WO 00/75359, стр. 21, строка 20, и стр. 22, строка 32. 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), являются тканеспецифическими, стресс-специфическими или специфическими в отношении стадии развития (например, экспрессия, специфическая для пыльников). Подходящими промоторами могут также быть синтетические или химерные промоторы, не существующие в природе, которые состоят из множества 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, SJ; Rushton, PJ. 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 *nos*-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, описанного выше, в клетку-хозяин. 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). Предшествующий уровень техники содержит информацию о способах получения трансгенных растений и введения восстанавливающего признака. Эти способы подразделяются на прямые и косвенные. Они включают бомбардировку частицами (Weeks et al. Plant Physiol. 102, (1993) 107701084; Vasil et al., Bio/Technology 10 (1992), 662-674), агробактериальную трансформацию (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506), электропорацию регенерирующей ткани (Shillito et al. 1985 "Высокоэффективный прямой перенос генов в растения". Nature Biotechnology 3.12^1099-1103), перенос ге-

нов, опосредованный карбидом кремния (Dalton et al., *Plant Sci.* 132 (1998), 31-43) и протопласт-опосредованный перенос генов (Shimamoto et al., *Nature*, 338 (1989), 274-276), биолистический или *agrobacterium*-опосредованный перенос генов (WO 01/73084). Введение восстанавливающего признака может быть осуществлено путем интрогрессии (Harper et al., *Annals of Botany* 107: (2011), 1313-1320) либо с помощью стратегии генной инженерии. Многие новые методы генной инженерии для введения ДНК и инактивации геномных последовательностей известны специалисту в данной области техники (например, метод геномного редактирования на основе нуклеаз цинковые пальцы, TALEN или системы CRISPR/Cas).

Как вариант или в дополнение к сказанному, настоящее изобретение касается клеток-хозяев, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты в качестве трансгена, экспрессионную кассету, рекомбинантную ДНК в качестве трансгена или вектор, как определено выше. "Клетка-хозяин" в контексте изобретения может быть прокариотической (например, бактериальной) или эукариотической клеткой (например, растительной клеткой или дрожжевой клеткой). Предпочтительно клетка-хозяин представляет собой агробактерию, такую как *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes*, или растительную клетку, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, экспрессионную кассету, рекомбинантную ДНК или вектор согласно настоящему изобретению. Специалисту в данной области техники известны многочисленные методы, например, такие как конъюгация или электропорация, с помощью которых молекула нуклеиновой кислоты, экспрессионная кассета, рекомбинантная ДНК или вектор согласно изобретению могут вводиться в агробактерию, а также различные методы трансформации (биолистическая трансформация, *agrobacterium*-опосредованная трансформация), с помощью которых молекула нуклеиновой кислоты, экспрессионная кассета, рекомбинантная ДНК или вектор согласно изобретению могут быть введены в растительную клетку (Sambrook et al., 2001).

Идентифицировав гены, опосредующие восстановление фертильности, их можно использовать в трансгенных растениях, причем "сопутствующий груз", ассоциированный с ними, может быть уменьшен до минимума. Таким образом, изобретением также обеспечивается трансгенное растение или семена трансгенного растения, содержащие растительную клетку, как определено выше. Примером такой трансгенной растительной клетки или растения является растительная клетка или растение, трансформированное, предпочтительно стабильно, с помощью молекулы нуклеиновой кислоты по данному изобретению, экспрессионной кассеты, рекомбинантной ДНК или вектора по данному изобретению. Трансгенное растение обладает вновь опосредованным признаком восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) либо улучшенным признаком восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) по сравнению с растением дикого типа, которое является изогенным, но не содержит молекулу нуклеиновой кислоты по данному изобретению, экспрессионную кассету, рекомбинантную ДНК или вектор по данному изобретению. Предпочтительно эти трансгенные растения дополнительно обладают вновь опосредованной устойчивостью к патогену, предпочтительно к грибу, в частности, к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.), либо повышенной устойчивостью к патогену, предпочтительно к грибу, в частности к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.), по сравнению с растением дикого типа, которое является изогенным, но не трансформировано, предпочтительно стабильно, молекулой нуклеиновой кислоты по данному изобретению, экспрессионной кассетой, рекомбинантной ДНК или вектором по данному изобретению.

Помимо молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей восстанавливающий признак с уменьшенным или полностью элиминированным "сопутствующим грузом", настоящее изобретение касается белка mTERF либо его гомолога, аналога, ортолога или функционального фрагмента, который может кодироваться молекулой нуклеиновой кислоты, а также антитела, которое специфически связывается с белком mTERF либо его гомологом, аналогом, ортологом или функциональным фрагментом. Белок mTERF содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29, либо аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 65, 70, 75, 80, 85 или 90%, предпочтительно по меньшей мере на 91, 92, 93, 94 или 95%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 99,5% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29. Настоящее изобретение также касается антитела, которое специфически связывается с белком mTERF. Рекомбинантное получение белков и их функциональных фрагментов известно специалисту в данной области техники из предшествующего уровня техники и описано, например, в Sambrook et al. (Молекулярное клонирование: практикум 3-е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, 2001; Wingfield, P.T. 2008. Получение рекомбинантных белков *Current Protocols in Protein Science*. 52:5.0:5.0.1-5.0.4). Поликлональные или моноклональные антитела к белку по данному изобретению могут быть выработаны специалистом в данной области техники с помощью известных методов, таких как описанные E. Harlow et al. (Антитела: практикум (1988)). Выработка моноклональных антител, а также Fab- и F(ab')₂ фрагментов, которые также полезны при детекции белка, может осуществляться при помощи различных традиционных методов, описанных Goding (Моноклональные антитела: принципы и практика, р. 98-118, New York: Academic Press (1983)).

Использование антител для получения и селекции гибридных растений или трансгенных растений с повышенной урожайностью показано, например, в международной патентной заявке WO 2011/061656 в

параграфах [00678] и [00847] и содержащихся там ссылках. Эти технологии могут быть использованы для получения растений согласно настоящему изобретению.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения растения, в частности, растения порядка Злаковые (Poales), которое пригодно, как носитель пыльцы мужского родителя, для восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа). Этот способ включает следующие стадии: А) мутагенизацию растительных клеток или частей растения и последующую регенерацию растений из мутированных растительных клеток либо мутагенизированных частей или мутагенизируемых растений, и В) идентификацию растения, полученного на стадии А), содержащего эндогенную последовательность ДНК, идентичную последовательности нуклеиновой кислоты, выбираемой из группы, состоящей из (i) нуклеотидной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, либо ее функционального фрагмента, (ii) нуклеотидной последовательности, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29, либо ее функционального фрагмента, (iii) нуклеотидной последовательности, комплементарной к нуклеотидной последовательности по пп. (i) или (ii), (iv) нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностью по пп. (iii), (v) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85 или 90%, предпочтительно по меньшей мере на 91, 92, 93, 94 или 95%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 99,5% идентична нуклеотидной последовательности по пп. (i) или (ii), (vi) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 65, 70, 75, 80, 85 или 90%, предпочтительно по меньшей мере на 91, 92, 93, 94 или 95%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 99,5% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29, либо ее функционального фрагмента, (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, которая по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29 проявляет изменения в аминокислотной последовательности в форме аминокислотных делеций, замещений, присоединений и/или инсерций, предпочтительно составляющих не более 30, 25 или 20%, более предпочтительно - не более 18, 16, 14, 12 или 10% или наиболее предпочтительно не более 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0,5% от всей аминокислотной последовательности, либо имеющую по меньшей мере одну мутацию в регуляторной последовательности эндогенной последовательности ДНК, которая действует так, что идентифицированное растение обладает вновь опосредованным признаком восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) либо улучшенным признаком восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) по сравнению с немутированным растением дикого типа, которое в принципе является изогенным и/или обладает вновь опосредованной устойчивостью к патогену, предпочтительно к грибу, в частности, к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.), либо повышенной устойчивостью к патогену, предпочтительно к грибу, в частности, к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.), по сравнению с немутированным растением дикого типа, которое в принципе является изогенным.

Предпочтительно эндогенная последовательность ДНК согласно стадии В) кодирует белок mTERF, особенно предпочтительно белок mTERF, представленный SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29, либо его гомолог, аналог или ортолог. Предпочтительно регуляторная последовательность эндогенной последовательности ДНК согласно стадии В) представляет собой промотор или его часть. Примером регуляторной последовательности эндогенной последовательности ДНК является промотор, представленный SEQ ID NO: 3.

"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 мутированному *cis*-регуляторному элементу по сравнению с промотором дикого типа, и активность промотора с мутированными *cis*-регуляторным элементом повышается или понижается, в зависимости от того, является фактор транскрипции репрессором или индуктором, и усиливается или ослабевает аффинность фактора транскрипции по отношению к мутированному *cis*-регуляторному элементу. 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 белком дикого типа. Возможные аминокислотные замены можно установить путем сравнения аминокислотных последовательностей. На фиг. 9 показано сравнение последовательности *gfr1a* дикого типа (SEQ ID NO: 33) с аминокислотной последовательностью, опосредующей восстанавливающий признак из IRAN9 (SEQ ID NO: 29). Например, могут быть получены следующие аминокислотные замены: в позиции 10 SEQ ID NO: 29, в которой белок mTERF, опосредующий восстанавливающий признак, содержит аланин (А) и соответствующий (не восстанавливающий) фертильности белок дикого типа (SEQ ID NO: 33) содержит треонин (Т), в позиции 18 SEQ ID NO: 29, в которой белок mTERF, опосредующий восстанавливающий признак, содержит пролин (Р) и соответствующий (не вос-

восстанавливающий фертильность белок) дикого типа (SEQ ID NO: 33) содержит треонин (T), в позиции 43 SEQ ID NO: 29, в которой белок mTERF, опосредующий восстанавливающий признак, содержит глутамин (Q) и соответствующий (не восстанавливающий фертильность белок) дикого типа (SEQ ID NO: 33) содержит аспарагиновую кислоту (D), в позиции 45 SEQ ID NO: 29, в которой белок mTERF, опосредующий восстанавливающий признак, содержит глутаминовую кислоту (E) и соответствующий (не восстанавливающий фертильность белок) дикого типа (SEQ ID NO: 33) содержит аспарагиновую кислоту (D), в позиции 62 SEQ ID NO: 29, в которой белок mTERF, опосредующий восстанавливающий признак, содержит треонин (T) и соответствующий (не восстанавливающий фертильность белок) дикого типа (SEQ ID NO: 33) содержит аланин (A), в позиции 63 SEQ ID NO: 29, в которой белок mTERF, опосредующий восстанавливающий признак, содержит аланин (A) и соответствующий (не восстанавливающий фертильность белок) дикого типа (SEQ ID NO: 33) содержит треонин (T), в позиции 108 SEQ ID NO: 29, в которой белок mTERF, опосредующий восстанавливающий признак, содержит глутаминовую кислоту (E) и соответствующий (не восстанавливающий фертильность белок) дикого типа (SEQ ID NO: 33) содержит аспарагиновую кислоту (D), в позиции 126 SEQ ID NO: 29, в которой белок mTERF, опосредующий восстанавливающий признак, содержит серин (S) и соответствующий (не восстанавливающий фертильность белок) дикого типа (SEQ ID NO: 33) содержит аланин (A), в позиции 193 SEQ ID NO: 29, в которой белок mTERF, опосредующий восстанавливающий признак, содержит аспарагиновую кислоту (D) и соответствующий (не восстанавливающий фертильность белок) дикого типа (SEQ ID NO: 33) содержит глицин (G), в позиции 213 SEQ ID NO: 29, в которой белок mTERF, опосредующий восстанавливающий признак, содержит глицин (G) и соответствующий (не восстанавливающий фертильность белок) дикого типа (SEQ ID NO: 33) содержит глутаминовую кислоту (E), в позиции 243 SEQ ID NO: 29, в которой белок mTERF, опосредующий восстанавливающий признак, содержит серин (S) и соответствующий (не восстанавливающий фертильность белок) дикого типа (SEQ ID NO: 33) содержит цистеин (C), в позиции 272 SEQ ID NO: 29, в которой белок mTERF, опосредующий восстанавливающий признак, содержит цистеин (C) и соответствующий (не восстанавливающий фертильность белок) дикого типа (SEQ ID NO: 33) содержит аргинин (R), в позиции 276 SEQ ID NO: 29, в которой белок mTERF, опосредующий восстанавливающий признак, содержит аланин (A) и соответствующий (не восстанавливающий фертильность белок) дикого типа (SEQ ID NO: 33) содержит треонин (T), в позиции 303 SEQ ID NO: 29, в которой белок mTERF, опосредующий восстанавливающий признак, содержит изолейцин (I) и соответствующий (не восстанавливающий фертильность белок) дикого типа (SEQ ID NO: 33) содержит валин (V), в позиции 363 SEQ ID NO: 29, в которой белок mTERF, опосредующий восстанавливающий признак, содержит аланин (A) и соответствующий (не восстанавливающий фертильность белок) дикого типа (SEQ ID NO: 33) содержит валин (V), или в позиции 365 SEQ ID NO: 29, в которой белок mTERF, опосредующий восстанавливающий признак, содержит гистидин (H) и соответствующий (не восстанавливающий фертильность белок) дикого типа (SEQ ID NO: 33) содержит аргинин (R). Аналогичным образом могут быть предсказаны потенциальные аминокислотные замены из фиг. 10, на котором показано сравнение аминокислотных последовательностей gfr1b дикого типа (SEQ ID NO: 31) с аминокислотной последовательностью, опосредующей восстанавливающий признак из IRAN9 (SEQ ID NO: 2). Другие потенциальные мутации на уровне ДНК (например, в форме нуклеотидных замен или инсерций/делеций) могут также быть предсказаны путем сравнения кодирующих нуклеотидных последовательностей gfr1a и gfr1b на фиг. 7 и 8.

Еще одним примером генетической модификации 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 путем инсерции нуклеотидов транспозонным мутагенезом у кукурузы показан Das & Martienssen (Das, Lekha, and Robert Martienssen. "Сайт-специфический транспозонный мутагенез в локусе hcf106 кукурузы". *The Plant Cell* 7.3 (1995): 287-294). Модификация на эпигенетическом уровне может, например, осуществляться с помощью измененного паттерна метилирования ДНК.

Специалисту в данной области техники известно, как получить "мутацию" в смысле данного изобретения посредством процесса мутагенизации на стадии А) способа получения растительной клетки/растения. Мутагенизация в этом случае включает как традиционный мутагенез, так и сайт-специфический мутагенез или "редактирование генома". При традиционном мутагенезе модификация на уровне ДНК осуществляется не целенаправленным образом. Растительная клетка или растение подвергается мутагенному воздействию, например, такому как методом TILLING с использованием УФ-излучения или с использованием химических материалов (Till, Bradley J., et al., "Обнаружение индуцированных точечных мутаций в генах кукурузы при помощи метода TILLING". *BMC Plant Biology* 4.1 (2004): 12). Еще одним методом осуществления случайного мутагенеза является мутагенез с использованием транспозона.

Сайт-специфический мутагенез на уровне ДНК позволяет вводить мутации в точно определенный участок ДНК. Примерами в этом отношении могут быть нуклеазы TALEN (WO 2010/079430, WO 2011/072246), мегануклеазы (Silva, George, et al., "Мегануклеазы и другие инструменты для таргетного геномного инжиниринга: перспективы и вызовы генной терапии". *Current gene therapy* 11.1 (2011): 11.), эндонуклеазы "домашнего хозяйства" (Stoddard, Barry L. "Эндонуклеазы "домашнего хозяйства": от мик-

робных генетических захватчиков до реагентов для таргетной модификации ДНК". Structure 19.1 (2011): 7-15.), нуклеазы цинковые пальцы (Lloyd, Alan, et al., "Таргетный мутагенез с использованием нуклеаз цинковые пальцы у *Arabidopsis*". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102.6 (2005): 2232-2237), или система CRISPR/Cas (Gaj, Thomas, Charles A. Gersbach, and Carlos F. Barbas. "Методы геномного инжиниринга, основывающиеся на ZFN, TALEN и CRISPR/Cas". Trends in biotechnology 31.7 (2013): 397-405). Например, мутагенез происходит во всех копиях или аллелях, либо, в соответствующих случаях, во всех гомологах соответствующих эндогенных последовательностей ДНК. Что касается диплоидного организма, такого как, например, *Secale cereale* или *Hordeum vulgare*, это может означать по меньшей мере две модификации.

Идентификацию растения, получаемого на стадии В), можно, например, осуществлять с помощью молекулярных маркеров или зондов. ДНК-зондами являются, например, праймеры или пары праймеров, которые можно использовать для проведения реакций ПЦР. Например, мутанты Tilling можно детектировать или идентифицировать путем секвенирования целевого гена в популяции TILLING либо с помощью других методов, которые распознают ошибочное спаривание в ДНК, таких как, например, анализы методом определения точек плавления или использование нуклеаз, специфичных в отношении ошибочного спаривания. Таким образом, настоящее изобретение касается праймера/пар праймеров, таких как праймеры для детекции mTERF или его мутированных форм. Мутанты, получаемые с помощью транспозонов, можно детектировать путем использования транспозон-специфических праймеров и праймеров, специфичных в отношении целевого гена, для ПЦР применительно ко всей популяции и последующего секвенирования продуктов ПЦР. Такие праймеры также охватываются настоящим изобретением. Модификация уровня или степени экспрессии, вызываемая мутацией, может определяться с помощью ОТ-ПЦР в тканях растения, модификация, вызываемая мутацией, относительно стабильности - путем тестирования с использованием сайтов связывания убиквитина, а также предсказания модификаций в третичной структуре. Подходят также тесты по определению экспрессии рекомбинантных белков дикого типа и соответствующих мутированных белков и биохимической активности. Специалисту в данной области техники известны из предшествующего уровня техники методы и средства для идентификации растения или растительной клетки, получаемой на стадии В).

Настоящее изобретение также касается молекулярных маркеров, которые распознают присутствие или отсутствие мутации в эндогенной последовательности ДНК либо в регуляторной последовательности эндогенной последовательности ДНК. Такие маркеры основаны, например, на SNP и являются специфичными в отношении мутации (примеры: маркер KASP или TaqMan). Примеры подходящих SNP для создания маркеров в отношении *Secale cereale* можно видеть при сравнении последовательностей на фиг. 7 и 8.

Настоящее изобретение также касается растения, которое может быть получено либо которое получено согласно данному способу, или части такого растения. Аналогичным образом, настоящее изобретение также охватывает потомка растения, который имеет по меньшей мере одну мутацию и обладает вновь опосредованным признаком восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) либо улучшенным признаком восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) по сравнению с немутированным растением дикого типа, которое в принципе является изогенным, и/или обладает вновь опосредованной устойчивостью к патогену, предпочтительно к грибу, в частности к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.), либо повышенной устойчивостью к патогену, предпочтительно к грибу, в частности к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.), по сравнению с немутированным растением дикого типа, которое в принципе является изогенным.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение обеспечивает способ получения трансгенного растения, которое обладает вновь опосредованным признаком восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) либо улучшенным признаком восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) по сравнению с немутированным растением дикого типа, которое в принципе является изогенным, и/или обладает вновь опосредованной устойчивостью к патогену, предпочтительно к грибу, в частности к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.), либо повышенной устойчивостью к патогену, предпочтительно к грибу, в частности к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.), по сравнению с немутированным растением дикого типа, которое в принципе является изогенным. Способ включает следующие стадии: А) обеспечение молекул нуклеиновой кислоты, экспрессионной кассеты или рекомбинантной ДНК, описанных выше, либо обеспечение вектора, описанного выше, В) трансформацию, предпочтительно стабильную трансформацию, по меньшей мере одной растительной клетки путем введения молекулы нуклеиновой кислоты, экспрессионной кассеты, рекомбинантной ДНК или вектора, получаемых на стадии А), С) регенерацию растения по меньшей мере из одной трансформированной растительной клетки на стадии В), и, как вариант, D) идентификацию растения, обладающего вновь опосредованным признаком восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) либо улучшенным признаком восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) по сравнению с немутированным растением дикого типа, которое в

принципе является изогенным, и/или обладает вновь опосредованной устойчивостью к патогену, предпочтительно к грибу, в частности, к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.), либо повышенной устойчивостью к патогену, предпочтительно к грибу, в частности, к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.), по сравнению с немутированным растением дикого типа, которое в принципе является изогенным. Способ получения трансгенного растения также охватывает обеспечение одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты, описанных выше, и, как вариант, различные воплощения молекулы нуклеиновой кислоты по данному изобретению, как вариант, в одной или нескольких экспрессионных кассетах или векторах, а также трансформацию растительных клеток двумя или более молекулами нуклеиновой кислоты.

Настоящее изобретение также касается трансгенного растения, которое может быть получено либо которое получено согласно данному способу, или части такого растения. Аналогичным образом настоящее изобретение также охватывает потомка трансгенного растения, который обладает вновь опосредованным признаком восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) либо улучшенным признаком восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) по сравнению с немутированным растением дикого типа, которое в принципе является изогенным, и/или обладает вновь опосредованной устойчивостью к патогену, предпочтительно к грибу, в частности, к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.), либо повышенной устойчивостью к патогену, предпочтительно к грибу, в частности к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.), по сравнению с немутированным растением дикого типа, которое в принципе является изогенным.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение касается способа опосредования или повышения восстановительной способности в отношении фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) в растительной клетке или растении и/или опосредования или повышения устойчивости к патогену, предпочтительно к грибу, в частности, к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.). Такой способ может включать следующие стадии: А) трансформацию, предпочтительно стабильную трансформацию, по меньшей мере одной растительной клетки путем введения молекул нуклеиновой кислоты по данному изобретению, экспрессионной кассеты по данному изобретению, как описано выше, вектора по данному изобретению, как описано выше, как вариант, В) регенерацию растения по меньшей мере из одной трансформированной растительной клетки, полученной на стадии А). Способ получения трансгенной растительной клетки/растения также охватывает трансформацию двух или более молекул нуклеиновой кислоты по данному изобретению, как описано выше, как вариант, другие воплощения молекулы нуклеиновой кислоты по данному изобретению и, как вариант, одной или нескольких экспрессионных кассет или векторов по данному изобретению.

Кроме того, настоящее изобретение касается использования растения, описанного выше, потомка, описанного выше, или указанного трансгенного растения для создания гибридного растения согласно изобретению или трансгенного растения согласно изобретению, предпочтительно растения рода *Secale* или *Triticale*, предпочтительно растения вида *Secale cereale*, в котором восстановлена фертильность пыльцы при ЦМС Р-типа, и/или которое обладает повышенной устойчивостью к грибному патогену, в частности, к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.).

Описанные здесь олигонуклеотиды, нуклеиновые кислоты, экспрессионные кассеты, рекомбинантная ДНК, векторы и антитела можно также использовать для получения растения или трансгенного растения. В этом отношении настоящее изобретение также охватывает использование олигонуклеотида, описанного выше, молекулы нуклеиновой кислоты, рекомбинантной ДНК, вектора или антитела при создании гибридного растения согласно изобретению или трансгенного растения согласно изобретению. В предпочтительном варианте осуществления изобретения гибридное растение выбирают из рода *Secale* или *Triticale*, предпочтительно растения вида *Secale cereale*, в котором восстановлена фертильность пыльцы при ЦМС Р-типа и/или которое обладает повышенной устойчивостью к грибному патогену, в частности к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.). Олигонуклеотиды и нуклеиновые кислоты, а также рекомбинантная ДНК, векторы и антитела можно особенно использовать для получения трансгенного растения.

В еще одном аспекте настоящее изобретение касается использования молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок mTERF, либо кодируется белками mTERF, в растении, в частности растении порядка Злаковые (Poales), предпочтительно растении семейства Мятликовые (Poaceae), для восстановления цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), в частности, ЦМС типа Пампа. Предпочтительно восстановление осуществляется путем скрещивания растения, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, в качестве отцовского родителя с другим растением, предпочтительно того же вида, содержащего цитоплазму ЦМС. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению, как описано выше, способную опосредовать восстанавливающий признак либо, в случае белка mTERF, она представляет собой белок mTERF согласно изобретению.

Другие варианты осуществления изобретения далее иллюстрируются подробным описанием, рисунками и примерами.

Некоторые термины, использованные в настоящей заявке, обсуждаются ниже более подробно.

Термин "аллель" означает две или более различные нуклеотидные последовательности, расположенные в специфическом геномном локусе на хромосоме. 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 (генные аллели) различаются по меньшей мере одним SNP (однонуклеотидные полиморфизмы). В зависимости от контекста описания изобретения "аллель" также означает один единственный SNP, который, например, обеспечивает различие между донорным RFP1 и рекуррентными родителями. Различные генные аллели можно детектировать при помощи маркеров. Такие генные аллели в специфическом локусе известны как "маркерные аллели". В зависимости от контекста описания изобретения "маркерный локус" следует понимать, как означающий маркерный аллель в специфическом локусе.

Выражения "хромосомный фрагмент", "хромосомный сегмент", а также их вариации, если не указано иное, означают и описывают специфический отрезок хромосомной ДНК специфической хромосомы, содержащий по меньшей мере один ген. "Интегрированный хромосомный фрагмент", таким образом, происходит от донорного источника. В контексте изобретения последовательное расположение генов внутри интегрированного хромосомного фрагмента соответствует последовательности, которая имеет место в исходном хромосомном фрагменте донорного источника. Хромосомный фрагмент или его часть может представлять собой специфический "гаплотип", причем в таком случае хромосомный фрагмент содержит специфические SNP, благодаря которым гаплотип является уникальным и может быть идентифицирован.

Термины "дистальный" и "проксимальный" означают позицию хромосомного интервала или генного фрагмента в отношении специфической референсной локализации (например, специфического полинуклеотида, другого хромосомного интервала или гена) на той же хромосоме, причем "дистальный" означает, что интервал или отрезок располагается на стороне референсной локализации на некотором расстоянии от центromеры и "проксимальный" означает, что интервал или отрезок располагается на стороне референсной локализации, обращенной к центromере.

Термины "сцепленный", "тесно сцепленный" или "плотно примыкающий" следует понимать, как означающие, что два локуса (например, два генетических отрезка или два маркера (маркерные локусы или маркерные аллели)) на генетической карте находятся на расстоянии менее 2 сМ, менее 1 сМ, менее 0,5 М, менее 0,2 сМ, менее 0,1 сМ, менее 0,05 сМ или менее 0,01 сМ друг от друга.

Термин "урожайность" в контексте настоящего изобретения означает продуктивность с единицы площади конкретного растительного продукта, обладающего коммерческой ценностью. Например "урожайность" ржи обычно измеряется в метрических тоннах собранного зерна на гектар (ha) площади и за один посевной сезон, либо в метрических тоннах сухой биомассы на гектар (ha) площади и за один посевной сезон. Если не установлено иное или не указано иное, "урожайность" может касаться абсолютно свежей или сухой массы, относительно свежей или сухой массы, выхода силосной массы (также общего выхода сухих веществ) или выхода массы зерна. Урожайность подвержена воздействию генетических факторов и факторов со стороны окружающей среды, и, в общем, представляет собой комбинацию многих агрономических свойств, основывающихся на признаках растения, формирующих те общие элементы, которые в течение посевного сезона способствуют получению конечного урожая. Примерами таких отдельных агрономических свойств являются вегетативная жизнеспособность, устойчивость к стрессам, сопротивление или устойчивость к заболеваниям, устойчивость к гербицидам, способность к кущению, фаза цветения, завязывание семян, подсчет зерен/колосков, масса 1000 зерен, устойчивость к полеганию, обмолачиваемость и т.п.

"Функциональный фрагмент" молекулы нуклеиновой кислоты означает отрезок нуклеиновой кислоты, обладающий идентичной или сравнимой функциональностью, что и тотальная молекула нуклеиновой кислоты, из которой функциональный фрагмент происходит. Как таковой, функциональный фрагмент может иметь нуклеотидную последовательность, идентичную или гомологичную с тотальной молекулой нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 97, 98 или 99%. "Функциональный фрагмент" белка означает отрезок аминокислотной последовательности, обладающий идентичной или сравнимой функциональностью, что и тотальная аминокислотная последовательность белка, из которого функциональный фрагмент происходит. Как таковой, функциональный фрагмент может иметь аминокислотную последовательность, идентичную или гомологичную с тотальной аминокислотной последовательностью белка по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 97, 98 или 99%.

В контексте изобретения термин "гомолог" следует понимать, как означающий белок одинакового филогенетического происхождения; термин "аналог" следует понимать, как означающий белок, выполняющий одинаковую функцию, но имеющий различное филогенетическое происхождение; и термин "ортолог" следует понимать, как означающий белок из другого вида, который выполняет одинаковую функцию.

Термин "гибридизировать" или "гибридизация" следует понимать, как означающий процесс, при котором одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты спаривается с цепочкой нуклеиновой кислоты, являющейся, насколько возможно, комплементарной, т.е. образует пары оснований. Стандартные процессы гибридизации описаны, например, у Sambrook et al., Молекулярное клонирование: практикум 3-е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, 2001. Предпочтительно это означа-

ет, что по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 65, 70, 75, 80 или 85%, наиболее предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% оснований молекулы нуклеиновой кислоты образуют пары оснований с цепочкой нуклеиновой кислоты, являющейся, насколько возможно, комплементарной. Возможность образования таких пар оснований зависит от жесткости условий гибридизации. Термин "жесткость" относится к условиям гибридизации. Условия высокой жесткости означают условия, при которых спаривание оснований затруднено; условия низкой жесткости означают, что процесс спаривания оснований проходит легче. Жесткость условий гибридизации зависит, например, от концентрации соли, ионной силы и температуры. Как правило, жесткость условий можно повысить путем повышения температуры и/или снижения содержания соли. Термин "жесткие условия гибридизации" следует понимать, как означающий такие условия, при которых гибридизация происходит только между гомологичными молекулами нуклеиновой кислоты. Термин "условия гибридизации", таким образом, относится не только к условиям непосредственного спаривания цепей нуклеиновых кислот, но также к условиям, преобладающим во время этапов отмывки. Примерами жестких условий гибридизации являются условия, при которых, прежде всего, гибридизируются только те молекулы нуклеиновой кислоты, которые обладают по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей. Примером условий жесткой гибридизации является гибридизация в 4×SSC при 65°C и последующая многократная отмывка в 0,1×SSC при 65°C приблизительно в течение 1 ч. Используемый здесь термин "условия жесткой гибридизации" может также означать гибридизацию при 68°C в 0,25 М фосфат натрия, pH 7,2, 7% SDS, 1 mM EDTA и 1% BSA в течение 16 ч и последующую двукратную отмывку в 2×SSC и 0,1% SDS при 68°C. Предпочтительно, чтобы гибридизация осуществлялась в жестких условиях.

Термин "интервал" или "хромосомный интервал" означает протяженный линейный отрезок геномной ДНК, который присутствует в отдельной хромосоме растения или на хромосомном фрагменте и который обычно определяется двумя маркерами по концам интервала с дистальной и проксимальной стороны. Маркеры, определяющие концы интервала, могут также быть частью интервала. Кроме того, два различных интервала могут взаимно перекрываться. В описании изобретения интервал определяется указанием "между маркером А и маркером В". Терминальный маркер интервала может также располагаться в определенном маркерном участке с одной стороны интервала. Маркерный участок тогда определяется с помощью двух фланкирующих маркеров и представляет собой хромосомный отрезок, на котором могут находиться другие маркеры помимо фланкирующих маркеров. Фланкирующие маркеры определяют концевые точки маркерного участка и сами являются частью маркерного участка. Если два концевых маркера интервала являются маркерами в различных маркерных участках с любой стороны интервала, тогда в описании интервала указывается "между маркером в маркерном участке X, который фланкируется маркерами С и D, и маркером в маркерном участке Y, который фланкируется маркерами Е и F".

В контексте настоящего изобретения термин "интрогрессия" означает передачу по меньшей мере одного желательного аллеля гена из генетического локуса одного генотипического фона в генетический локус другого генотипического фона. Например, интрогрессия желательного аллеля гена в определенный локус может быть передана потомку путем скрещивания половым путем между двумя родителями того же вида. Как вариант, передача аллеля гена может происходить путем рекомбинации между двумя донорными геномами в слитом протопласте, при этом по меньшей мере один донорный протопласт несет желаемый аллель гена в своем геноме. В любом случае потомки, содержащие желательный аллель гена, затем повторно бэккроссируют с линией, отобранной для желательного аллеля гена, которая характеризуется отличным генотипическим фоном. Результатом является закрепление желательного аллеля гена в отобранном генотипическом фоне.

Термин "сопутствующий груз" ("linkage drag") обычно используется для описания фенотипической экспрессии нежелательных генов из донора, которые находятся в том же участке, что и целевой QTL (локус количественных признаков), и поэтому тесно сцеплены с ним. Примером является наблюдение, что посредством интрогрессии хромосомного фрагмента, несущего ген(ы)-восстановитель, в интрогрессивную линию попадают гены донора, оказывающие негативное воздействие, в результате чего определенные агрономически важные свойства интрогрессивной линии оказываются хуже, чем у исходной линии-получателя.

В случае восстановления мужской фертильности пыльцы в интрогрессивных сегментах, несущих Rfp1, "сопутствующий груз" проявляется в форме отрицательного воздействия на урожайность, т.е. на выход зерна и другие свойства, такие как высота растения, количество зерен в колосе и масса тысячи семян; см., например, Naskauf et al., J. Kulturpfl. 61 (2009), 15-20; Naskauf et al., Молекулярная селекция 30 (2012), 1507-1518.

Эффект "сцепленного груза", в принципе сцепленный с восстанавливающим признаком, который при иных обстоятельствах имел бы место в гибридном растении (контрольном растении), в гибридном растении согласно изобретению уменьшен или (полностью) элиминирован. Контрольное растение содержит в своем геноме хромосомный сегмент на хромосоме 4R по меньшей мере с одним интервалом от маркерного локуса tc256379 до маркерного локуса tc176835 из донора, выбираемого из группы, состоя-

шей из IRAN IX, Pico Gebtario и Altevogt 14160. То же касается интервала Xp15/55-Xscxx04 сегмента из IRAN IX; см. Hackauf et al., Молекулярная селекция 30 (2012), 1507-1518. Если не установлено иное, выражение "эффект сцепленного груза", в принципе сцепленный с восстанавливающим признаком, в гибридном растении согласно изобретению уменьшен или (полностью) элиминирован" следует понимать, как означающее улучшение восстановительной способности пыльцы гибридного растения согласно изобретению по сравнению с контрольным растением. Это, например, может применяться для повышения осыпания пыльцы, что минимизирует заражение спорыньей.

"Локус" - это позиция на хромосоме, где располагается один или несколько генов либо один или несколько аллелей гена, которая вызывает или оказывает влияние на какое-либо агрономическое свойство. В частности, "локус" в данном контексте означает локус Rfp1, восстанавливающий фертильность пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа).

Термин "маркер" означает 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 полинуклеотидных последовательностях, например, 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 пар праймеров, и, как таковые, способные амплифицировать фрагмент последовательности с использованием ПЦР-метода. Маркеры, распознающие генетические полиморфизмы между членами популяции, могут детектироваться с помощью разработанных методов, известных из уровня техники (Введение в генетический анализ, 7-е издание, Griffiths, Miller, Suzuki et al., 2000). Примерами являются: методы секвенирования ДНК, амплификация специфических последовательностей на основе ПЦР, детекция RFLP, либо детекция полинуклеотидных полиморфизмов с помощью аллель-специфической гибридизации (ASH), детекция 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, Rfp1 или "сцепленного груза"). Например, маркерный локус может также использоваться для отслеживания сегрегации аллелей в локусе (QTL или отдельного гена), который генетически или физически тесно сцеплен с маркерной позицией.

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

"Органы" означают, например, листья, растительный побег, ствол, корни, вегетативные почки, меристемы, зародыши, пыльники, семязачатки, семена или плоды, в частности семена зерновых. Термин "часть растения" или "части растения" включает, но не ограничивается этим, стебель растения или соломину, листья, цветки, соцветия, корни, плоды и семена, а также пыльцу. Кроме того, "части" растения означают комбинацию нескольких органов, например, цветка и семени, либо часть органа, например, поперечный разрез стебля растения. Примерами растительной "ткани" являются каллусная ткань, мягкая ткань, меристемная ткань, ткань листьев, стеблей, корней, опухолевая ткань растения или образовательная ткань, основная ткань (известная как паренхимная ткань), сосудистая ткань, механическая ткань и покровная ткань (известная как эпидермис). Этот перечень, однако, не является исчерпывающим. Термин растительные "клетки" следует понимать как означающие, например, выделенные клетки с наличием клеточной стенки либо их агрегаты или протопласты.

В контексте настоящего изобретения, если не установлено иное, "растение" может быть растением любого вида, выбираемым из двудольных, однодольных и голосемянных растений. Предпочтительно растения являются однодольными растениями, представляющими интерес для сельского хозяйства и огородничества, либо для получения биоэнергии (биоэтанола, биогаза и т.п.). Примерами являются *Gossypium* sp., *Zea mays*, *Brachypodium distachyon*, *Triticum* sp., *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Sorghum* sp., *Musa* sp., *Saccharum officinarum*, *Secale cereale*, *Avena* sp., газонные и кормовые травы. Растение согласно изобретению предпочтительно является растением рода *Secale*, в частности, вида рожь (*Secale cereale*).

Выражение "устойчивость" или "устойчивый" к патогену следует понимать как означающий сопротивляемость или защитную силу растения или растительной клетки против разрушительного воздействия патогена. Она обеспечивается от проявления развития болезни до полного подавления развития болезни. Например, устойчивость гибридов, несущих Rfp1, к спорынье - это устойчивость, основанная на механизме "избегания": спорам гриба механически закрыт доступ в гинецей вследствие быстрого смыка-

ния обверток после опыления пыльцой. Опосредованная устойчивость может быть вновь приобретенной устойчивостью или частичным повышением уже существующей устойчивости. В контексте настоящего изобретения растение/растительная клетка является устойчивым или обладает устойчивостью к спорынье, т.е. гибридным растением, проявляющим повышенную устойчивость к патогену, предпочтительно к грибу, особенно предпочтительно к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.).

Термин "зерновые растения" следует понимать как означающий, в частности, растения порядка Злаковые (Poales), предпочтительно семейства Мятликовые (Poaceae). Примерами в данном случае являются растения, которые принадлежат к роду *Avena* (овес), *Triticum* (пшеница), *Secale* (рожь), *Oryza* (рис), *Panicum*, *Pennisetum*, *Setaria*, *Sorghum* (просо), *Zea* (кукуруза) и т.п., предпочтительно *Hordeum* (ячмень), *Secale* (рожь), т.е. *Secale cereale*, *p. africanum*, *p. ancestrale*, *p. dalmaticum*, *p. kuprijanovii*, *p. montanum*, *p. Silvestre*, особенно предпочтительна рожь Вавилова.

"Трансгенное растение" означает растение, в геном которого интегрирован по меньшей мере один полинуклеотид, предпочтительно гетерологичный полинуклеотид. Предпочтительно интеграция полинуклеотида является стабильной, что означает, что полинуклеотид остается стабильным в растении, экспрессируется и также стабильно наследуется потомками. Стабильное введение полинуклеотида в геном растения также включает интеграцию в геном растения предшествующего родительского поколения, на основании которого полинуклеотид может далее стабильно наследоваться. Термин "гетерологичный" означает, что интродуцированный полинуклеотид происходит, например, от клетки или организма различного генотипического фона того же вида или другого вида, либо является гомологичным по отношению к прокариотической или эукариотической клетке-хозяину, 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.

Термин "эффект снижения урожайности" следует понимать как означающий фенотипическую экспрессию последовательности ДНК, которая сцеплена или тесно сцеплена с целевым геном, в данном случае с геном-восстановителем фертильности пыльцы, и, таким образом, cosegregируется. Это частая проблема в программах обратного скрещивания с экзотическими донорами, в частности, совместное наследование желательных и нежелательных генов для целей селекции описано Brinkmann et al., Crop Sci. 17 (1977), 165-168 и Tanksley et al., Bio/Technology 7, (1989) 257-264. До сих пор этот комплекс из гена-восстановителя фертильности пыльцы и более нежелательных генов, который вызывает частичное снижение урожайности, всегда передавался частично или полностью в селекционный материал, вследствие чего интрогрессивные линии, кроме преимуществ, заключающихся в восстановительной способности пыльцы, содержали другие негативные признаки, вызывающие в зависимости, например, от локализации значительное снижение урожайности. Соответственно "сопутствующий груз" в данном случае - это негативный эффект снижения урожайности, связанный с эффективной восстановительной способностью пыльцы.

Уменьшение или элиминация проблемы "сопутствующего груза" происходит, когда его негативные фенотипические свойства в отношении контрольного растений составляют только 0-75%, что соответствует уменьшению на 25-100%. В предпочтительном варианте осуществления изобретения уменьшение составляет 50-100% или 75-100%. В особенно предпочтительном варианте негативные явления, связанные с "сопутствующим грузом", почти полностью или полностью элиминированы, и уменьшение явления "сопутствующего груза" составляет 90-100%. Уменьшение или элиминация явления "сопутствующего груза" в отношении гибридных растений может, в частности, также означать, что воздействие "сопутствующего груза" на урожайность составляет менее 7 dt/ha (центнеров с гектара), менее 6,5 dt/ha или менее 6 dt/ha, предпочтительно менее 5,5 dt/ha, менее 5 dt/ha, менее 4,5 dt/ha или менее 4 dt/ha, наиболее предпочтительно менее 3,5 dt/ha, менее 3 dt/ha, менее 2,5 dt/ha или менее 2 dt/ha по сравнению с почти изогенным растением или гибридным растением, которое не содержит хромосомный сегмент по данному изобретению или молекулу нуклеиновой кислоты по данному изобретению. Для количественного определения "сопутствующего груза" его воздействие может быть стандартизировано как процент действия NIB-E партнера, как будет показано в примерах 1 и 2.

Термин "вектор" или "векторная система", используемый здесь в связи с редактированием генома, означает транспортное средство для введения рекомбинантной конструкции, содержащей нуклеиновые кислоты или даже полипептиды, а также, как вариант, дополнительные последовательности, такие как регуляторные последовательности или последовательности локализационных показателей, прямо или косвенно в желательный клеточный компартмент желательной целевой клетки или целевой растительной структуры. Прямое введение осуществляется в целевую растительную клетку или целевую растительную структуру, содержащую нуклеиновые кислоты, которые согласно настоящему изобретению подлежат специфической модификации. Косвенное введение означает введение в структуру, например, клетки листьев или другие органы растения, либо ткань, которое фактически не представляет прямого интереса для целевой растительной клетки, но при этом обеспечивается систематическое размножение и дальнейший перенос вектора, содержащего рекомбинантную конструкцию согласно настоящему изобретению в целевую растительную структуру, например, меристемную ткань или клетки, либо клетки стебля. Тер-

мин "вектор" в контексте трансфекции аминокислотных последовательностей означает подходящие агенты для пептидной или белковой трансфекции, такие как ионные липидные смеси или агенты, подходящие для трансфекции нуклеиновой кислоты, например, такие как материалы-носители, с помощью которых последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности могут вводиться в клетку путем бомбардировки частицами, например частицами золота или вольфрама. Данный термин также охватывает вирусные векторы, т.е. модифицированные вирусы, например, происходящие от следующих вирусов: вирус штриховатой мозаики ячменя (BSMV), вирус мозаики костра (BMV), вирус желтой карликовости кукурузы (MYDV), и бактериальные векторы, такие как *Agrobacterium* spp., например, *Agrobacterium tumefaciens*. И, наконец, термин также охватывает подходящее транспортное средство для введения линейных нуклеиновых кислот (одно- или двухцепочечных) в целевую клетку. Специалисту в данной области техники известны другие последовательности, которые должен содержать вектор, чтобы быть функциональным в желательной целевой клетке. Традиционные методы получения, развития и использования векторов также известны специалисту в данной области техники.

Термин "рекомбинантная конструкция", употребляемый здесь в связи с описанием редактирования генома, означает конструкцию, содержащую, помимо прочего, плазмиды или плазмидные векторы, космиды, синтетические бактериальные хромосомы или синтетические хромосомы дрожжей (BAC и YAC), фагмиды, векторы на основе бактериофага, экспрессионную кассету, одноцепочечные или линейные последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотные последовательности, а также вирусные векторы, т.е. модифицированные вирусы, которые могут вводиться в целевую клетку согласно настоящему изобретению. Рекомбинантная конструкция по данному изобретению может содержать инструменты редактирования генома или их части. Например, инструменты CRISPR/Cas или их части содержат по меньшей мере одну gРНК, либо по меньшей мере один вариант нуклеазы Cas и/или по меньшей мере другой эффекторный домен либо в форме последовательности нуклеиновой кислоты, либо аминокислотной последовательности. Инструменты TALEN или их части содержат, например, по меньшей мере один эффекторный домен TAL и/или, по меньшей мере, варианты нуклеазы, предпочтительно эндонуклеазу типа II, такую как, например, FokI. Кроме этого рекомбинантная конструкция может содержать регуляторные последовательности и/или последовательности локализационных показателей. Рекомбинантная конструкция может быть интегрирована в плазмидный вектор и/или выделена из плазмидного вектора, например, в форме полипептидной последовательности либо одно- или двухцепочечной нуклеиновой кислоты, не связанной с плазмидным вектором. После введения конструкция становится интрахромосомной или, предпочтительно, экстрахромосомной и не интегрируется в геном и обычно имеет форму одно- или двухцепочечной ДНК, одно- или двухцепочечной РНК или полипептида.

Настоящее изобретение далее иллюстрируется примерами вариантов его осуществления со ссылками на фигуры чертежей и последовательности:

Фиг. 1: Генетическая и физическая карта локуса Rfp1. А) Генетическая карта высокого разрешения локуса Rfp1 на длинном плече хромосомы 4R ржи. Цифры под самой верхней линией означают число рекомбинационных событий, наблюдаемых между ассоциированными маркерами у 4563 отдельных тестовых растений. Информация, касающаяся маркерных кодирований, приведена в табл. 2. В) Rfp1-перекрывающий контиг BAC клонов из библиотеки Scе-B-R05104. С) Предсказанные гены в локусе Rfp1. Экзоны функциональных генов или фрагментов генов, псевдогенов или мутированных генов выделены жирными квадратиками. Ориентация генов указана горизонтальными стрелками. Вертикальная линия в mTERF гене 17019_c7 показывает ранний стоп-кодон в последовательности гена. Сокращения F и С указывают на то, что в отношении соответствующего маркера наблюдался доминантный генотип-восстановитель, специфичный для фертильности (F) или кодоминантного наследования (С).

Фиг. 2: Картирование функциональных генов-восстановителей фертильности в локусе Rfp1. С помощью молекулярных селективных маркеров, в двух примерных сериях тестов, были идентифицированы отдельные рекомбинантные растения с различными длинами хромосомных сегментов донора (D) в генотипическом фоне пыльцы родительской линии (E). Экспрессию функциональных генов-восстановителей фертильности Rfp1a и Rfp1b определяли в тест-скрещиваниях потомков в отношении каждого рекомбинантного растения с использованием высокодиагностического мужски-стерильного тестера генотипа Lo6-P(SR). В табл. 2 перечисляется маркерный гаплотип партнера D NTB, несущего интрогрессивный сегмент донора. Δ_{E-D} : минимальная разность между средними значениями тест-скрещиваний партнеров NIB, каждый из которых несет элитный аллель (E) или аллель донора (D) в гомозиготном состоянии. Это различие средних значений по 7 локациям определяет эффект "сопутствующего груза" в отношении урожайности зерна в абсолютном значении в dt/ha и как процент партнера E NIB. НСР: риск сделать ошибку составляет 5% по сравнению с 5%-ным уровнем значимости.

Фиг. 3: Картирование ген-восстановителя Rfp1b. Из 13 рекомбинантных растений аллель донорного генотипа IR9 можно было достоверно определить между маркерами P20 и 701H1441 в маркерном локусе 72F13_c2_mTERF у 4 растений. Фенотип Rfp1b детектировался в тест-скрещиваниях потомков рекомбинантных генотипов с ЦМС тестером Lo6-P(SR) и идеально коррелировался с маркерными генотипами митохондриального фактора терминации транскрипции (mTERF), картированного с помощью 72F13_c2_mTERF [A=гомозиготный носитель элитного аллеля; H=гетерозиготный носитель элитного

или донорного аллеля; Rfp1b*=Rfp1 или элитные фенотипы детектировались, используя осыпание пыльцы 15 потомков тест-скрещиваний рекомбинантного генотипа и высокодиагностический тестер из LoB-P(SR).]

Фиг. 4: Показан эффект "сопутствующего груза" в отношении урожайности зерна (Δ_{E-D}) для интрогрессивного сегмента 455 и 765 (у-ось), графически изображен на основе среднего значения эффекта "сопутствующего груза" для каждой из семи локаций (х-ось). Рекомбинанты с коротким интрогрессивным сегментом 455 демонстрировали низкий уровень эффекта "сопутствующего груза", а рекомбинанты 765 с длинным интрогрессивным сегментом демонстрировали высокий уровень эффекта "сопутствующего груза". Из экспериментальных данных видно, что значения эффектов "сопутствующего груза" в семи локациях сильно различаются. Очевидно, что стрессовые условия были вызваны неблагоприятными погодными условиями во время стеблевания.

Фиг. 5: Получение семян в результате тест-скрещиваний партнеров почти изогенной группы (NIB) в качестве родительских растений пыльцы с материнским ЦМС тестером "простого скрещивания" T911. Использование партнеров NIB (пар NIB) показано на выделенных парцеллах для получения семян при тест-скрещиваниях. В этом отношении партнеры NIB опыляли ЦМС тестер "простого скрещивания", представляющий собой противоположный гетерозисный пул. Семена, собранные с ЦМС тестеров, затем высевались в полевых опытах в разных местностях с целью определения фенотипического эффекта сцепленного груза.

Фиг. 6: Экспрессионная кассета в векторе pYFrfp1, содержащая ген-восстановитель rfp1b (SEQ ID NO: 1) под контролем промотора убиквитина кукурузы с первым интроном и pos-терминаторами.

Фиг. 7: Сравнение нуклеотидной последовательности гена rfp1a дикого типа ("Wildtyp-rfp1a") (SEQ ID NO: 32) с нуклеотидной последовательностью гена rfp1a IRAN9 ("Iran9_rfp1a") (SEQ ID NO: 28).

Фиг. 8: Сравнение нуклеотидной последовательности гена rfp1b дикого типа ("Wildtyp-rfp1b") (SEQ ID NO: 30) с нуклеотидной последовательностью гена rfp1b IRAN9 ("Iran9_rfp1b") (SEQ ID NO: 1).

Фиг. 9: Сравнение аминокислотной последовательности белка rfp1a дикого типа ("Wildtyp-rfp1a") (SEQ ID NO: 33) с аминокислотной последовательностью белка rfp1a IRAN9 ("Iran9_rfp1a") (SEQ ID NO: 29).

Фиг. 10: Сравнение аминокислотной последовательности белка rfp1b дикого типа ("Wildtyp-rfp1b") (SEQ ID NO: 31) с аминокислотной последовательностью белка rfp1b IRAN9 ("Iran9_rfp1b") (SEQ ID NO: 2).

Следующие примеры вариантов осуществления настоящего изобретения приводятся только с целью его иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие его объем. Если не установлено иное, то применялись стандартные методы.

Примеры

Пример 1: "Почти изогенная группа" - создание линии 455 ржи в генетическом фоне Lo310

Как показано на фиг. 5, в отношении всех рекомбинантных генотипов получали партнеры D и E NIB, каждую группу которых из более 100 BC₆S₁ растений, являющуюся гомозиготным носителем и не являющуюся носителем Rfp1, подвергали ауткроссингу - простому скрещиванию с ЦМС тестером T911. Пограничные изолирующие стенки предотвращали попадание пыльцы с других растений. Полученные в результате тест-скрещивания семена использовали в полевых опытах во многих местностях. Растения, являющиеся результатом тест-скрещивания, проверяли на правильность родословной при помощи (i) последующего маркерного анализа и (ii) оценки осыпания пыльцы в полевых условиях. Все оцененные растения, которые были получены в результате тест-скрещивания от партнеров D NIB, демонстрировали полное осыпание пыльцы, в то время как растения, полученные от партнеров E, демонстрировали значительно пониженную и только частично восстановленную мужскую фертильность.

Пример 2: Полевые испытания

Опыты по оценке урожайности проводили в местностях с различными условиями окружающей среды. Например, в 2012 г. это было семь районов в Германии (D) и Польше (PL). Как видно из табл. 1, районы выбирали так, чтобы они представляли сельскохозяйственные условия Центральной Европы и, кроме того, различные стрессовые условия (стресс, вызванный засухой, и недостаток азота). В условиях режима низкого содержания азота азот вносили в количестве значительно ниже обычной дозы. В опыте с нехваткой воды атмосферные осадки были единственным источником воды, в опытах с достатком воды дополнительно вносили около 25 мм воды в неделю. Таким образом, было возможно измерять эффекты интрогрессивных сегментов Rfp1 в различных условиях. Результаты использовали для (1) определения эффекта "сопутствующего груза", специфичного для интрогрессивного сегмента, (2) идентификации интрогрессивных сегментов с высокой степенью стабильности среды, и (3) идентификации диагностических сред, позволяющих лучше распознавать эффект "сопутствующего груза".

Таблица 1: Описание опытных районов и применяемые варианты опытов в 2012 г. (ВЕК=Беккедорф (Нижняя Саксония); KON=Кондратовице (Нижняя Силезия); BBG= Бернбург (Саксония-Анхальт); КО2 и КО3=Берген (Нижняя Саксония); РЕТ1 и РЕТ_N=Петкус с вариантами орошения (I) и внесения азота (N) (Бранденбург); Точки земледелия; измерение индекса качества почв сельскохозяйственных угодий. Масштаб возможных оценок составляет от 1 (очень плохое) до 100 (очень хорошее)

Район	Страна	Точки земледелия	Средние осадки, [мм]	Агрономический режим
ВЕК	D	51	769	
KON	PL	55	581	местная сельскохозяйственная практика
BBG	D	93	469	
КО2	D	43	769	недостаток азота
КО3	D	43	769	без орошения
РЕТ I	D	28	636	с орошением
РЕТ N	D	28	636	без орошения

В отношении всех сред проводили опыт, поставленный методом расщепленных делянок. Главные делянки использовали для тест-скрещиваний рекомбинантных BC_6S_1 линий. Субделянки - соответствующие почти изогенные пары D и E NIB. "Партнер D NIB" представлял собой гомозиготный носитель интрогрессивного сегмента донора, а "партнер E NIB" - гомозиготный носитель соответствующего сегмента элитной линии. Соответствующих партнеров D и E высевали в непосредственной близости друг от друга, чтобы минимизировать разность сред и иметь возможность с большей аккуратностью измерить различия, вызываемые интрогрессивным сегментом. Экспериментальными единицами опытов в отношении урожайности были единицы, полученные в результате тест-скрещиваний 7 BC_6S_1 линий, которые сами были представлены четырьмя различными гаплотипами. Как пример, подробно показаны результаты в отношении рекомбинанта с самым коротким интрогрессивным сегментом (455) в сравнении с рекомбинантом с самым длинным интрогрессивным сегментом (765). Последний уже значительно короче сегментов, которые в настоящее время одобрены и доступны для гибридных сортов.

Подготовку и проведение полевых испытаний осуществляли в соответствии с общими правилами, известными специалисту в данной области техники. Статистический анализ данных выполняли в два этапа: во-первых, в каждом отдельном районе, рассчитывали данные в дисперсионном анализе в отношении всех повторов с целью определения степени точности полученных результатов испытания и определения средней урожайности, специфичной для соответствующего района, в отношении рекомбинантных линий и их интрогрессивных сегментов. Во-вторых, указанные средние показатели затем использовали для анализа влияния факторов среды.

Детектировали серьезные и статистически значительные различия (t-тест) в отношении эффекта "сопутствующего груза", например, между рекомбинантными генотипами 455 и 765. Как видно на фиг. 2, эффект "сопутствующего груза" (Δ_{E-D}) в среднем по районам составлял 3,7 dt/ha в отношении гаплотипа 455 и почти в два раза больше (7,0 dt/ha) в отношении гаплотипа 765. Различия между двумя рекомбинантами проявлялись особенно четко в районе РЕТN в условиях сильного стресса, вызванного весенней засухой. В этом районе эффект "сопутствующего груза" вырос до 18 dt/ha в отношении рекомбинанта 765 и оставался на уровне только 3 dt/ha в отношении гаплотипа 455. В другом районе (BBG) в условиях умеренного стресса эффект "сопутствующего груза" (Δ_{E-D}) упал до 11 dt/ha в отношении гаплотипа 765, хотя все равно превышал этот эффект в отношении гаплотипа 455 (около 3 dt/ha). Практически те же взаимосвязи показали результаты экспериментов, проведенных в 2014 г. Здесь также уменьшение размера интрогрессивного сегмента соответствовало уменьшению эффекта "сопутствующего груза" в отношении урожайности. Чтобы сравнить результаты экспериментов 2012 и 2014 гг., было рекомендовано стандартизировать эффект "сопутствующего груза" в виде процента производительности партнера NIB. На фиг. 2 показано, что эффект "сопутствующего груза" с самыми короткими интрогрессивными сегментами (1120 и 455) находился в пределах между 3,9 и 4,7%, в то время как рекомбинанты с самыми длинными интрогрессивными сегментами (1110 и 765) с 6,2 и 7,1% демонстрировали значительное снижение производительности. Тем не менее, взятое в контексте, уменьшение урожайности, отмеченное в недавнее время, является все еще незначительным, т.е. известные в настоящее время интрогрессивные сегменты, содержащие два маркера *tc256739* и *tc300731*, вызывают эффекты "сопутствующего груза", не превышающие 10%.

Районы испытаний различаются своими диагностическими значениями в отношении детекции эффекта "сопутствующего груза" (см. фиг. 4). Средние значения (Δ_{E-D}) по всем протестированным сегментам в 2012 г. (Серия 018/2012) составляли от 3,2 (РЕТ_1), 3,3 (KON), 4,1 (КО2), 4,6 (КО3), 6,7 (ВЕК) до 10,0 (РЕТ_N) dt/ha. Самый незначительный эффект "сопутствующего груза" наблюдался в испытаниях с орошением в Петкус (РЕТ1), в котором не ощущался недостаток воды. Наоборот, на результаты испытаний без орошения в той же макросреде (РЕТN) сильно повлияла засуха на стадии предцветения. Можно видеть (фиг. 4), что сегмент из 765 сильно реагировал на стресс, вызванный условиями окружающей сре-

ды (коэффициент регрессии от среднего значения эффекта сцепленного груза: 1,6 dt/ha). Наоборот, сегмент 455 демонстрировал высокую степень стабильности среды, которая подтверждалась в РЕТ-N стрессовой среде.

Пример 3. Идентификация рекомбинантных генотипов

Для идентификации рекомбинантных генотипов и описания остающихся интрогрессивных сегментов использовали следующие маркеры: ctg24, ctg32, ctg16b, P20, c40745, из которых в последующих исследованиях существенную роль сыграл маркер P20. Из общедоступной ВАС-библиотеки ржи, полученной из сорта Blanco, которая не является носителем гена Rfp1 (Shi BJ, et al. (2009): Физический анализ сложного локуса алюмотолерантности Alt4 ржи (*Secale cereale* L.) с использованием полногеномной ВАС-библиотеки ржи сорта Blanco. *Theor Appl Genet.* 119(4):695-704), и с помощью маркера P20, можно было идентифицировать ВАС, как источник других маркерных последовательностей. Было возможно выделить и секвенировать высокообещающий ВАС. Это позволило обеспечить ВАС-библиотеку генотипов, несущих ген-восстановитель (обозначаемую как "IR9" или "ROS104"), которая использовалась для анализа со специфическими ДНК-зондами с помощью ПЦР. Хотя ВАС-контиг, перекрывающий Rfp1 locus, не удалось получить, ВАС-клоны, фланкирующие locus, были идентифицированы с помощью этой библиотеки. Используя последовательности, можно было сконструировать множество маркерных комбинаций (см. табл. 2). Они использовались для отбора новых рекомбинантов и частично преобразовывались в новую маркерную систему (на основе SNP).

Кроме того, исследования с помощью mTERF позволили идентифицировать новый ген Rf, который до сих пор не был охарактеризован, как имеющий значение для восстановления фертильности какого-либо вида растения. Впервые было показано, что на интрогрессивном сегменте 4R имеются два отдельных и одинаково ценных гена Rf, эффективных с точки зрения восстановления фертильности.

С помощью тесно фланкирующих маркеров и фенотипического теста было показано, в отношении обоих генов Rf, что размер соответствующих интрогрессивных сегментов донора можно было еще больше уменьшить, полностью сохранив при этом восстановительную способность.

Пример 4. Разработка тесно сцепленных маркеров

Чтобы разработать тесно сцепленные маркеры для локуса Rfp1 ржи, а также чтобы выделить функциональный ген-восстановитель, использовали аллель Rfp1 из экзотического сорта IRAN IX, как самого эффективного источника восстановления фертильности. Однако с этой весьма эффективной восстановительной способностью связан "сопутствующий груз", который может вызывать значительное уменьшение урожайности в зависимости от соответствующего района произрастания.

Кроме тесно сцепленного маркера P20, для тонкого картирования участка Rfp1 были обеспечены другие проксимальные тесно сцепленные маркеры. В основном это осуществлялось путем использования двух стратегий, которые позволили выделять один рекомбинантно укороченный интервал на молекулярный маркер и, таким образом, в конечном итоге идентифицировать и уменьшить нежелательный "сопутствующий груз".

1) Первая стратегия основывалась на использовании консервативной синтении между рожью и *Brachypodium*, а также между рожью и ячменем. Таким образом были получены новые тесно сцепленные маркеры с использованием генной информации из указанных модельных сортов злаковых трав/зерновых.

2) Начало второй стратегии дает предположение, что тесное сцепление маркера P20 также указывает на тесное физическое сцепление; она основывается на методе "прогулки" по хромосоме. Это означает, что при помощи тесно сцепленных маркеров в свободно доступной ВАС-библиотеке проводили поиск (популяция сорта "Blanco" (Shi et al., *Theor Appl Genet* 119 (2009), 695-704) с целью получения исходного ВАС-контига, как начальной точки для проведения анализа контига локуса Rfp1. Для этого можно использовать вновь созданную ВАС-библиотеку генотипов, несущих ген-восстановитель (описанную здесь как "IR9" или "ROS104"), со специфическими ДНК-зондами с помощью ПНР.

С помощью этих библиотек можно было идентифицировать ВАС-клоны, из которых получали новые маркеры, которые в конечном итоге обеспечили отбор меньшего интервала около Rfp1.

Пример 5: Картирование новых маркеров в популяции ROS13024-BC1 и идентификация двух независимых, но одинаково действующих локусов в отношении восстанавливающего признака (Rfp1a и Rfp1b)

В дополнение к маркеру P20 в контексте настоящего изобретения были разработаны новые маркеры, пригодные для селекции, на основе выделенных ВАС-клонов из ВАС-библиотеки ROS104. Маркеры, полученные с помощью выделенных ВАС-клонов, использовали для картирования с высоким разрешением современного селекционного материала, в результате чего в конечном итоге получали целевой интервал. Картирование этих маркеров в целевом интервале, а также относительно целевого интервала, осуществляли в многочисленных экспериментах с расщепляющимися популяциями, полученными внутри компании. Маркеры и ассоциированные последовательности праймеров, с помощью которых у растений можно было идентифицировать локусы признака восстановления фертильности, приведены в табл. 2 ниже.

С помощью новых селективных маркеров неожиданно впервые удалось показать в исследованиях, проведенных методом картирования, что восстанавливающий признак может ассоциироваться с двумя

независимыми, но тесно сцепленными и почти одинаково действующими генами (Rfp1a и Rfp1b) в локусе Rfp1 (фиг. 1). Кроме того, было показано, что один из генов Rf, в частности, ген Rfp1b является геном, который кодирует белок mTERF. Помимо этого ген Rfp1a имеет последовательность с высокой степенью сходства с последовательностью гена mTERF и вполне вероятно может быть обозначен как ген mTERF. Поскольку до сих пор не было известно, что такой ген существует в зерновых культурах в отношении восстановления фертильности и/или осыпания пыльцы, этот результат был совершенно неожиданным.

Как следствие, с помощью настоящего изобретения и связанных экспериментов было впервые показано, что два независимых и почти одинаково действующих гена Rf, имеющих отношение к восстановлению фертильности, локализованы в интрогрессивном сегменте 4R. Более того, теперь два этих гена с помощью маркеров, описанных в данном изобретении, можно отдельно оценивать для целей селекции и отдельно или в комбинации друг с другом использовать. Таким образом, один аспект настоящего изобретения касается использования Rf гена Rfp1a самостоятельно или в комбинации с Rfp1b. В еще одном варианте осуществления изобретения Rf ген Rfp1b может использоваться независимо от Rfp1a. Предпочтительно оба эквивалентно действующих локуса, указанных выше, приводят к восстановлению фертильности.

Таблица 2. Обзор маркеров (Tm=температура плавления; * описан Hackauf et al., 2012)

Маркер	Получен из ВАС	Прямой праймер (5'-3') [SEQ ID NO]	Обратный праймер (5'-3') [SEQ ID NO]	Tm [°C]	Размер продукта [bp]	Тип	Категория
tc256739*	Ячмень EST	21	22	60	200/300	кодоминантный	COS
#1: ctg32	541014 контиг32	16	17	60	371	специфичный для фертильного пула	STS на основе гена
#2: ctg24met2a5	541014 контиг24	14	15	60	1148	кодоминантный	STS на основе гена
#3: ctg2	541014 контиг2	4	5	60	221	кодоминантный	ISBP
#4: ctg16b	541014 контиг16	10	11	60	516	кодоминантный	STS на основе гена
#5: c40745_1	SceAssembly02	18	19	60	675	кодоминантный	STS на основе гена
#6: P20	72F13 контиг2	6	7	65	424	специфичный для фертильного пула	STS на основе гена
#7: 72F13_c2_mTERF	72F13 контиг2	8	9	68	475	специфичный для фертильного пула	STS на основе гена
#8: 7_01_H_1441	72F13 контиг1	12	13	60	480	специфичный для фертильного пула	STS
tc300731*	Пшеница EST	23	24	55	340/300	кодоминантный	COS

В одном из проведенных экспериментов (Ro14037) были генотипированы почти 5000 отдельных растений популяции BC×S1. В этом отношении можно было детектировать генетический полиморфизм между Rfp1 хромосомного сегмента донора и линией Lo727 пыльцы родителя. Метод генетических "отпечатков пальцев" на основе этого маркера обеспечил надежную идентификацию только 20 растений, характеризующихся рекомбинацией на участке ценного варианта гена Rfp1. Генетический интервал вокруг Rfp1 в генотипическом фоне линии Lo727 был определен фланкирующими маркерами ctg2 и

7_01_H_1441, в отношении которых было рассчитано генетическое расхождение приблизительно в 0,2 сМ при 120 kb (фиг. 1). Полученная генетическая карта обеспечила желательный анализ целевого интервала вокруг Rfp1 с помощью вновь разработанного маркера. Первые гены-маркеры, а также маркер с40745_1, использовали для селекции в генетическом фоне элитного генотипа пыльцы родителя. Маркер P20 использовали для детекции сегмента с геном-восстановителем Rfp1. В серии тестов (018/2012) можно было наблюдать экспрессию Rfp1 и связанное с ним полное восстановление мужской фертильности в отношении интрогрессивных сегментов Rfp1 различной длины (нижняя часть фиг. 2) с помощью тест-скрещиваний с ЦМС тестером мужской формы Lo6-P(SR).

Это открытие подтверждает (1) сцепление между Rfp1 и P20, а также (2) ценность разработанного селективного маркера для рекомбинантного уменьшения хромосомного сегмента донора.

Основываясь на этом результате, в других экспериментах (например, Ro12011) последующие расщепления BCx семейств вначале генотипировались с помощью P20. В эксперименте, обозначенном как тест серия 12-1-23, было идентифицировано около 3200 отдельных растений, унаследовавших чистый аллель элитной линии Lo310. С помощью маркеров на основе гена, указанных выше, в этой материальной группе были идентифицированы 4 рекомбинантных растения с различной длиной интрогрессивных сегментов Rfp1 (верхняя часть фиг. 2). В тест-скрещиваниях этих 4 линий, а также контрольного генотипа #1058 без донорного сегмента Rfp1, с ЦМС тестером мужской стерильности Lo6-P(SR) можно было наблюдать экспрессию Rfp1 в 3 полностью мужскифертильных потомках линий 1110, 1039 и 1120. Генетическое строение рекомбинантов привело к заключению, что в участке целевого интервала был локализован еще один независимый и эквивалентно действующий ген-восстановитель фертильности. Этот ген-восстановитель, сцепленный с маркером stg2, был обозначен как Rfp1a, а ген-восстановитель, сцепленный с P20, был обозначен как Rfp1b (см. также фиг. 1).

Для точной локализации гена-восстановителя Rfp1b были проведены дополнительные эксперименты по картированию (например, Ro13030). Аналогично экспериментам, указанным выше, растения с интервалом BCx, у которых хромосомный сегмент донора уже рекомбинантно укорочен с помощью маркер на основе гена из ВАС-клона 541014, вначале генотипировали, используя маркер P20. Таким образом было идентифицировано почти 4300 генотипов, унаследовавших чистый элитный аллель линии Lo310 пыльцы родителя в сайте этого маркерного гена. Например, с помощью маркера 7_01_H_1441 в этой материальной группе можно было детектировать всего 13 рекомбинантов по маркеру P20 (фиг. 3). У 4 из этих 13 рекомбинантов в маркерном локусе 72F13_c2_mTERF можно было наблюдать донорный аллель из генетического источника. В отношении 3 из этих 4 рекомбинантов были установлены потомки тест-скрещивания, у которых была полностью восстановлена мужская фертильность. Наоборот, потомки тест-скрещивания 9 носителей маркерного аллеля mTERF, не обладающего восстановительной способностью, демонстрировали полностью мужскистерильный генотип.

Путем сличения наблюдаемых фенотипов с маркерными генотипами митохондриального фактора терминации транскрипции (mTERF) было возможно рассчитать генетическое расхождение между P20 и Rfp1b как $r=0,094$ сМ. Эта оценка рекомбинации хорошо согласовалась с оценкой рекомбинации $r=0,011$ сМ между P20 и геном mTERF, рассчитанной для более ранних экспериментов.

Пример 6. Получение контига Rfp1 с помощью ВАС-библиотеки ROS104

ВАС-клоны, отобранные из ВАС-библиотеки ROS104, послужили основой для создания зондов и праймеров, чтобы продолжить эксперименты методом "прогулки по хромосоме". Таким образом получали контиг длиной около 350 kbp. Посредством маркеров и их картирования в производном селекционном материале было показано, что этот контиг нес маркеры, которые фланкировали два локуса-восстановителя (фиг. 1 и табл. 2). Эксперименты показали, что в этом интервале отсутствовал ген, кодирующий PPR-белок, но в нем находились 3 так называемых гена mTERF (митохондриального фактора терминации транскрипции) или фрагменты генов, которые четко рассматривались как гены-кандидаты для Rfp1.

На основании ранее проведенной работы был сконструирован ВАС-контиг локуса Rfp1 на фоне генотипа-восстановителя фертильности (элитная инбредная линия Lo310 из пула пыльцы родителя) и показано присутствие двух генов Rf путем анализа рекомбинантных потомков.

Пример 7. Валидация результатов

Помимо детекции идентифицированного гена Rfp1b путем генетической рекомбинации, показанной в примере 5, функциональность гена также тестировали, используя трансгенный подход. Для этого следовали протоколу *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной трансформации ржи Herzfeld (2002). Создание протокола генетической трансформации ржи (*Secale cereale* L.) и характеристика экспрессии трансгена после биолистического или *Agrobacterium*-опосредованного переноса гена. Диссертация, ИРК, Германия). Донорные растения инбредной линии L22 культивировали в парнике при температуре около 20°C и световом периоде 16 h до точки цветения, затем незрелые зерновки поверхностно стерилизовали и приготавливали незрелые зародыши. Затем зародыши помещали на каллус индуцирующую среду так, чтобы щитки зародышей были максимально погружены в каллус индуцирующую среду (содержащую соли MS (Мурасиге и Скуг, 1962. "Пересмотренная среда для быстрого роста и биоопытов с культурами тканей табака". *Physiologia plantarum* 15.3: 473-497), 100 мг/л гидролизата казеина, 500 мг/л глутамина, 30

г/л сахарозы, 2,5 мг/л 2,4-Д, рН 5,8, 3,0 г/л фитогеля) и прекультивировали 5 дней в темноте при 25°C до трансформации. После прекультивации для трансформации незрелые зародыши переносили на 6× микропластины и суспендировали в 10 мл жидкой каллус индуцирующей среды. Для осмотической обработки жидкую среду заменяли 10 мл осмотической среды (содержащей соли MS (Мурасиге и Скуг, 1962) 100 мг/л гидролизата казеина, 500 мг/л глутамина, 30 г/л сахарозы, 6,0 мг/л 2,4-D, 72,9 мг/л маннитола, рН 5,8) и экспланты плазмоллизировали в течение 4–6 ч. Затем осмотическую среду удаляли и каллусы инокулировали приблизительно 300 µl. суспензии агробактерий. Затем проводили вакуумную обработку при 500 мбар в течение одной минуты с последующей инкубацией в течение 10 Мmin. Экспланты дважды промывали 10 мл инфекционной среды (содержащей соли MS (Мурасиге и Скуг, 1962), 100 мг/л гидролизата казеина, 500 мг/л глутамина, 15 г/л сахарозы, 15 г/л глюкозы, 6,0 мг/л 2,4-D, рН 5,2, 200 µM ацетосирингона) и сокультивировали в течение ночи при 22°C. Спустя 14–16 ч экспланты снова промывали несколько раз инфекционной средой и наконец помещали на твердую среду для сокультивации (инфекционная среда с добавлением 3,0 г/л фитогеля) так, чтобы щитки зародышей были направлены прямо вверх. Экспланты культивировали в течение двух дней и затем помещали на твердую каллус индуцирующую среду, обогащенную 150 мг/л тиментина для подавления роста агробактерий.

Через 14 дней каллусы переносили на селективную регенерационную среду (содержащую соли MS (Мурасиге и Скуг, 1962), 100 мг/л гидролизата казеина, 500 мг/л глутамина, 30 г/л сахарозы, рН 5,8, 5 г/л агарозы типа I, 150 мг/л тиментина, 30 мг/л паромоцицина). Спустя еще три недели каллусы переносили в подходящие для культивации сосуды, содержащие селективную регенерационную среду с 50 мг/л сульфата паромоцицина, способствующего удлинению стеблей.

Вектор pYFrfp1 (фиг. 6), содержащий восстанавливающий ген *gfp1b* (SEQ ID NO: 1) под контролем промотора убиквитина кукурузы с первым интроном и 35-S терминатором, инсертированным в вектор pPZP111, вводили путем электропорации (Mersereau et al., 1990. "Эффективная трансформация *Agrobacterium tumefaciens* с помощью электропорации". *Gene* 90.1: 149-151) в штамм агробактерии AGLO (Lazo et al., 1991. "Геномная ДНК-библиотека *Arabidopsis*, компетентная к агробактериальной трансформации". *Nature Biotechnology* 9.10 (1991): 963-967). Культуру AGLO (pYFrfp1) культивировали в течение ночи в 50 mg/l LB среды до насыщения (OD660 2-2.5). 2 мл центрифугировали 5 min при 5000 rpm и осадок растворяли в 1 мл В среды и 1 мл инфекционной среды. До заражения имплантатов бактерии инкубировали около 2 ч (OD660 1.5-2.0).

Для анализа тДНК связующий участок границы тДНК и геном ржи амплифицировали с помощью обратной ПЦР (Ochman et al., 1990. "Амплификация фланкирующих последовательностей при помощи обратной ПЦР". *Протоколы ПЦР: руководство по методикам и применениям*: 219-227). Для этого ДНК трансгенных растений ржи расщепляли BamHI или BglIII, циклизировали с помощью T4 ДНК-лигазы и затем использовали в качестве матрицы при постановке ПЦР. Амплификацию проводили в контексте гнездовой ПЦР с помощью амплификатора GeneAmp-PCR System 9700 (Perkin Elmer). Условия реакции соответствовали условиям, рекомендуемым производителем, при этом 200 ng матрицы ДНК использовали для первой реакции и 0,5 µl из первой реакции использовали в качестве матрицы для второй реакции так, чтобы конечный объем реакционной смеси составлял 25 µl.

В отношении правой границы (RB) для первой реакции (28 циклов при 94°C в течение 30 с, 48°C в течение 60 с и 72°C в течение 2 мин) использовали следующие праймеры: RB1R 5'-CTGAATGGCGAATGCTAGAGCAG-3' (LacZ участок) и UB1F 5'-CTGCAGTGCAGCGTGACCCG-3' (3' участок промотора убиквитина кукурузы). Для второй реакции (32 цикла при 94°C в течение 30 с, 52°C в течение 60 с и 72°C в течение 2 мин) использовали следующие праймеры: RB2R 5'-CGTTTCCCGCCTTCAGTTTAAAC-3' и UB1F праймер. Получали ПНР-продукты амплификации с тупыми концами, при этом во вторую реакционную смесь добавляли ДНК-полимеразу rwo. Эти продукты амплификации клонировали в ПЦР-вектор (Introgen, San Diego, CA) и затем проводили в нем анализ последовательностей.

Успешно трансформированные растения ржи размножали и скрещивали с инбредными линиями с мужской стерильностью Р-типа. Потомки, которые несли и экспрессировали восстанавливающий ген *gfp1b* в качестве трансгена, демонстрировали восстановление мужской стерильности пыльцы.

В качестве альтернативы трансгенному подходу, описанному выше, функция гена может также определяться нокаутом восстанавливающего гена линии-восстановителя. Для этого специалист в данной области техники может также использовать метод TILLING или метод геномного редактирования (например, TALEN или CRISPR/Cas) для, например, введения преждевременного стоп-кодона в кодирующую последовательность или сдвига рамки считывания путем инсерции/делеции. Результатом будет нефункциональный белок mTERF и утрата восстанавливающей способности.

Пример 8. Характеристика растительного материала относительно осыпания пыльцы

Полученные выше результаты теперь позволяют селекционеру использовать желательное восстановление фертильности при ЦМС Р-типа вместе с отличным осыпанием пыльцы для создания новых зерновых растений, в частности ржи и ячменя. При этом были значительно понижены негативные агрономические признаки и одновременно сведен до минимума риск поражения спорыньей. Уровень осыпа-

ния пыльцы, достигаемый с пыльцой мужского родителя согласно изобретению, может быть определен по шкале от 1 до 9 (Geiger HH, Morgenstern K (1975) "Прикладные генетические исследования цитоплазматической мужской стерильности у озимой ржи". Theor Appl Genet 46: 269-276). В этом отношении значения от 1 до 3 означают невоскрывающиеся пустые пыльники с небольшими дегенеративными изменениями; значения от 4 до 6 указывают на частично удаленную мужскую стерильность с <10 ->50% фертильных пыльников; значения от 7 до 8 обозначают осыпающие пыльцу пыльники с увеличенным размером; и значение 9 соответствует полностью мужскифертильному растению, соответствующему растению с нормальной цитоплазмой. В результате тест-скрещиваний получали растения согласно изобретению, имеющие значение от 7 и выше, предпочтительно даже от 8 и выше, либо, почти регулярно, со значением 9.

В Германии чувствительность к спорынье новых сортов ржи тестировали в полевых условиях при искусственной инокуляции в течение нескольких лет в разных районах произрастания. Оценка чувствительности в этом отношении основывалась на системе показателей от 1 (очень низкая чувствительность) до 9 (очень высокая чувствительность). Как видно из табл. 3, гибридные сорта, несущие восстанавливающий ген доноров IRAN IX, Pico Gentario и Altevogt 14160 (#1 - #4), вследствие отличного осыпания пыльцы, демонстрируют значительно более низкое поражение патогенами (*Claviceps purpurea*).

Таблица 3. Стадии экспрессии чувствительности к спорынье у четырех гибридных растений, несущих восстанавливающие гены доноров IRAN IX, Pico Gentario и Altevogt 14160 (левая половина; #1 - #4), и у четырех гибридных растений с другими системами восстановления фертильности (правая половина)

Гибридные сорта, несущие восстанавливающие гены доноров IRAN IX, Pico Gentario и Altevogt 14160	Значение	Гибридные растения с другими восстанавливающими генами или системами	Значение
Visello	3	SU Drive	6
Minello	4	SU Forsetti	5
Palazzo	4	SU Performer	6
KWS Bono	4	SU Mephisto	

В контексте конкретных результатов урожая MRI (Институт им. Макса Рубнера [Федеральный научно-исследовательский институт питания и пищевых продуктов]) ведет регулярный сбор данных, касающихся поражения спорыньей ржи, выращиваемой в Германии. Оценка этих данных показывает, что поражение спорыньей может быть сокращено наполовину, если вместо гибридных растений со стадией экспрессии 5-6 использовать сорта со стадией экспрессии 3-4, которые менее чувствительны к спорынье.

Пример 9. Сравнение структуры *gfp1a* и *gfp1b* на уровне ДНК и на уровне аминокислоты

Сравнение структур *gfp1a* и *gfp1b* на уровне ДНК (табл. 4) и на уровне аминокислоты (табл. 5) показывает сравнительно высокое соответствие между невосстанавливающим растением дикого типа и восстанавливающим IRAN9. Удивительно, однако, что *gfp1a* и *gfp1b* из IRAN9 демонстрируют соответствие только 76% на уровне ДНК и только 66% или 68% на уровне белка, хотя оба оказывают действие, опосредующее восстановление фертильности. Это свидетельствует о том, что тенденция белков mTERF восстанавливать мужскую фертильность возможна в широком диапазоне структур.

Таблица 4. Сравнение схожести с ДНК *gfp1a* и *gfp1b*

		<i>rfp1a</i>		<i>rfp1b</i>	
		Дикий тип	Iran9	Дикий тип	Iran9
<i>rfp1a</i>	Дикий тип		97%	76%	76%
	Iran9			76%	76%
<i>rfp1b</i>	Дикий тип				95%
	Iran9				

Таблица 5. Сравнение схожести с ДНК *gfp1a* и *gfp1b*

		<i>rfp1a</i>		<i>rfp1b</i>	
		Дикий тип	Iran9	Дикий тип	Iran9
<i>rfp1a</i>	Дикий тип		96%	67%	68%
	Iran9			66%	67%
<i>rfp1b</i>	Дикий тип				90%
	Iran9				

Пример 10. Детекция восстанавливающей способности генов *gfp1a* и *gfp1b* по отдельности и в комбинации, а также из разных источников

На фиг. 6 четко видно, что растения, полученные в результате тест-скрещиваний, которые содержат только одну копию, *gfp1a* или *gfp1b*, демонстрируют несколько меньшее, но в целом вполне достаточное осыпание пыльцы и размер пыльника по сравнению с растениями, которые содержат обе копии.

Таблица 6. Показатель пыльника согласно Geiger & Morgenstern (1975) у растений тест-скрещиваний (Тх...) с различными конфигурациями копии *gfp1*

Тест-скрещивания	Конфигурация копии <i>gfp1</i>	Средний показатель растений тест-скрещиваний с восстановленной фертильностью	
		Показатель пыльника	Длина пыльника (мм)
ТхBC7(Lo310) 1120	<i>rfp1a</i>	8	7
ТхBC7S1(Lo310) 3308	<i>rfp1a</i>	8	7
ТхBC6S1(Lo310) 455	<i>rfp1b</i>	8	7
ТхBC6S1(Lo310) 217	<i>rfp1a</i> и <i>rfp1b</i>	9	8
ТхBC6S1(Lo310) 765	<i>rfp1a</i> и <i>rfp1b</i>	9	8
ТхBC4(Lo316xIRAN IX)	<i>rfp1a</i> и <i>rfp1b</i>	9	8
ТхBC2(Lo316xAltevogt)	<i>rfp1a</i> и <i>rfp1b</i>	9	8
ТхLo310 (исходная линия)		3	

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение вида *Secale cereale* пригодное, как растение пыльцы мужского родителя, для восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа), отличающееся тем, что растение содержит хромосомный сегмент, имеющий по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты, способную опосредовать восстанавливающий признак фертильности пыльцы, и по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты имеет нуклеотидную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из (i) нуклеотидной последовательности, с кодирующей последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, (ii) нуклеотидной последовательности, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29, (iii) нуклеотидной последовательности, комплементарной к нуклеотидной последовательности по пп. (i) или (ii), (iv) нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностью по пп. (iii), (v) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 80% идентична нуклеотидной последовательности по пп. (i) или (ii), (vi) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29,

где хромосомный сегмент представляет собой интервал между маркерными локусами *tc256739* и *tc300731* на хромосоме 4R донора, выбираемого из группы, состоящей из IRAN IX, Pico Gentario и Altevogt 14610, и

где хромосомный сегмент характеризуется отсутствием одного или нескольких следующих маркерных локусов донора: *7_01_H_1441*, *ctg24met2a5* или *ctg32*, причем маркерный locus *tc256739* характеризуется продуктом амплификации с праймерами SEQ ID NO: 21 и 22, маркерный locus *ctg32* характеризуется продуктом амплификации с праймерами SEQ ID NO: 16 и 17, маркерный locus *Ctg24met2a5* характеризуется продуктом амплификации с праймерами SEQ ID NO: 14 и 15, маркерный locus *tc300731* характеризуется продуктом амплификации с праймерами SEQ ID NO: 23 и 24 и маркерный locus *7_01_H_1441* характеризуется продуктом амплификации с праймерами SEQ ID NO: 12 и 13.

2. Растение по п.1, отличающееся тем, что хромосомный сегмент представляет собой интервал между маркерными локусами *ctg32* или *ctg24met2a5* и *7_01_H_1441* на хромосоме 4R донора, выбираемого из группы, состоящей из IRAN IX, Pico Gentario и Altevogt 14610, отличающееся тем, что маркерный locus *ctg32* характеризуется продуктом амплификации с праймерами SEQ ID NO: 16 и 17, маркерный locus *Ctg24met2a5* характеризуется продуктом амплификации с праймерами SEQ ID NO: 14 и 15 и маркерный locus *7_01_H_1441* характеризуется продуктом амплификации с праймерами SEQ ID NO: 12 и 13.

3. Растение по п.1 или 2, отличающееся тем, что хромосомный сегмент содержит один или несколько следующих маркерных локусов донора: *ctg2*, P20, *72F13_c2_mTERF* или *ctg16b*, отличающееся тем, что маркерный locus *ctg2* характеризуется продуктом амплификации с праймерами SEQ ID NO: 4 и 5, маркерный locus P20 характеризуется продуктом амплификации с праймерами SEQ ID NO: 6 и 7, маркерный locus *72F13_c2_mTERF* характеризуется продуктом амплификации с праймерами SEQ ID NO: 8 и 9 и маркерный locus *ctg16b* характеризуется продуктом амплификации с праймерами SEQ ID NO: 10 и 11.

4. Растение по одному из пп.1-3, отличающееся тем, что размер хромосомного сегмента не превышает 190 kb.

5. Растение по одному из пп.1-4, отличающееся тем, что растение является инбредным растением, диплоидным растением или гибридным растением.

6. Растение по одному из пп.1-5, отличающееся тем, что растение обладает повышенной устойчивостью к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.).

7. Семя растения по одному из пп.1-6, причем семя содержит хромосомный сегмент, как определено в предыдущих пунктах.

8. Потомок растения по одному из пп.1-6, причем потомок содержит хромосомный сегмент, как оп-

ределено в предыдущих пунктах.

9. Части растения, включая органы, ткань или клетки растения по одному из пп.1-8.

10. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует митохондриальный фактор терминации транскрипции (mTERF), способный опосредовать восстанавливающий признак фертильности пыльцы для цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа, и содержащая нуклеотидную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из (i) нуклеотидной последовательности с кодирующей последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 28, (ii) нуклеотидной последовательности, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29, (iii) нуклеотидной последовательности, комплементарной к нуклеотидной последовательности по пп. (i) или (ii), (iv) нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностью по пп. (iii), (v) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности по пп. (i) или (ii), (vi) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29.

11. Экспрессионная кассета, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.10.

12. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.10.

13. Растительная клетка, содержащая экспрессионную кассету по п.11 или вектор по п.12.

14. Трансгенное растение или его семена, содержащие растительную клетку по п.13, где трансгенное растение обладает вновь опосредованным признаком восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) либо улучшенным признаком восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) по сравнению с растением дикого типа, которое является изогенным, но не содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п.10.

15. Белок митохондриального фактора терминации транскрипции (mTERF), опосредующий восстанавливающий признак фертильности пыльцы для цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по п.10, аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29 либо аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 29.

16. Способ получения растения по одному из пп.1-6, содержащего удаление одного или нескольких хромосомных интервалов, содержащих один или несколько маркерных локусов донора, выбираемых из 7_01_H_1441, ctg24met2a5 или ctg32, из генома растения, либо введение хромосомного сегмента, как определено в предыдущих пунктах, который включает следующие стадии: (I) обеспечение части растения в качестве целевой структуры, содержащей целевой участок нуклеиновой кислоты; (II) обеспечение рекомбинантной конструкции, которая кодирует инструменты CRISPR/Cas, содержащие по меньшей мере одну gPHK и по меньшей мере один вариант нуклеазы Cas, или инструменты TALEN, содержащие по меньшей мере один эффекторный домен TAL и по меньшей мере один вариант эндонуклеазы типа II; (III) обеспечение по меньшей мере одного вектора для введения рекомбинантной конструкции; (IV) обеспечение по меньшей мере еще одной рекомбинантной конструкции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по п.10, экспрессионную кассету по п.11 или хромосомный сегмент, как определено в предыдущих пунктах, для таргетной гомологично направленной репарации целевого участка нуклеиновой кислоты в целевой структуре растения либо для инсерции в целевой участок нуклеиновой кислоты целевой структуры растения; (V) введение рекомбинантных конструкций по пп.(II) и (IV) в целевую структуру растения; (VI) культивирование целевой структуры растения в условиях, активирующих компоненты инструмента геномного редактирования, и, таким образом, обеспечивающих осуществление таргетной модификации целевого участка нуклеиновой кислоты в целевой структуре растения для получения целевой структуры растения, содержащей по меньшей мере одну клетку, включающую таргетную модификацию целевого участка нуклеиновой кислоты; и (VII) регенерирование растения по меньшей мере из одной клетки, отличающийся тем, что маркерный локус 7_01_H_1441 характеризуется продуктом амплификации с праймерами SEQ ID NO: 12 и 13, маркерный локус Ctg24met2a5 характеризуется продуктом амплификации с праймерами SEQ ID NO: 14 и 15 и маркерный локус ctg32 характеризуется продуктом амплификации с праймерами SEQ ID NO: 16 и 17.

17. Способ получения трансгенного растения, которое обладает вновь опосредованным признаком восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) либо улучшенным признаком восстановления фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности типа Пампа (ЦМС Р-типа) по сравнению с немутированным растением дикого типа, которое в принципе является изогенным, и обладает вновь опосредованной устойчивостью к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.), либо повышенной устойчивостью к грибу *Claviceps purpurea* (Fr.), по сравнению с немутированным растением дикого типа, которое в принципе является изогенным, указанный способ включает следующие стадии: А) обеспечение молекул нуклеиновой кислоты по п.10, экспрессионной кассеты по п.11, либо обеспечение вектора по п.12, В) трансформацию по меньшей мере одной растительной клетки путем введения молекулы нуклеиновой кислоты, экспрессионной кассеты или вектора, получаемых на стадии А), и С) регенерацию трансгенных растений по меньшей мере из одной рас-

ительной клетки, трансформированной на стадии В).

18. Применение растения по одному из пп.1-6, потомка по п.8 или трансгенного растения по п.14 для получения гибридного растения, в котором восстановлена фертильность пыльцы при ЦМС Р-типа.

19. Применение по п.18, отличающееся тем, что гибридное растение представляет собой растение рода *Secale* или *Triticale*.

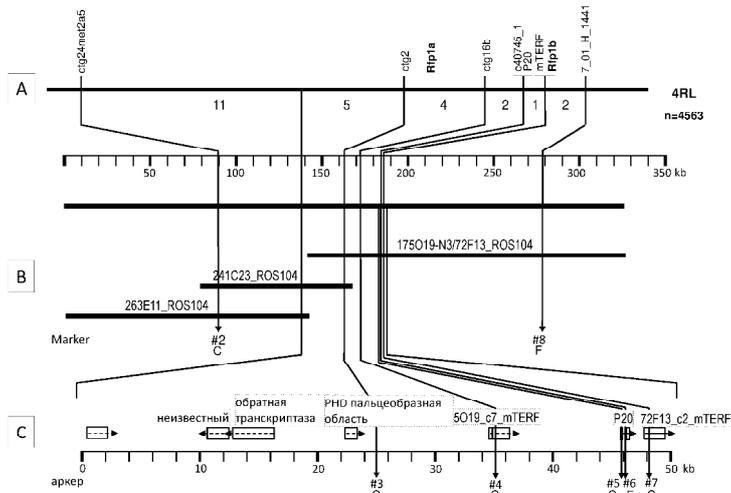
20. Применение по п.19, отличающееся тем, что гибридное растение представляет собой растение вида *Secale cereale*.

21. Применение растения по одному из пп.1-6, потомка по п.8 или трансгенного растения по п.14 для получения гибридного растения, которое обладает повышенной устойчивостью к грибному патогену.

22. Применение по п.21, отличающееся тем, что грибной патоген представляет собой гриб *Claviceps purpurea* (Fr.).

23. Применение по п.21, отличающееся тем, что гибридное растение представляет собой растение рода *Secale* или *Triticale*.

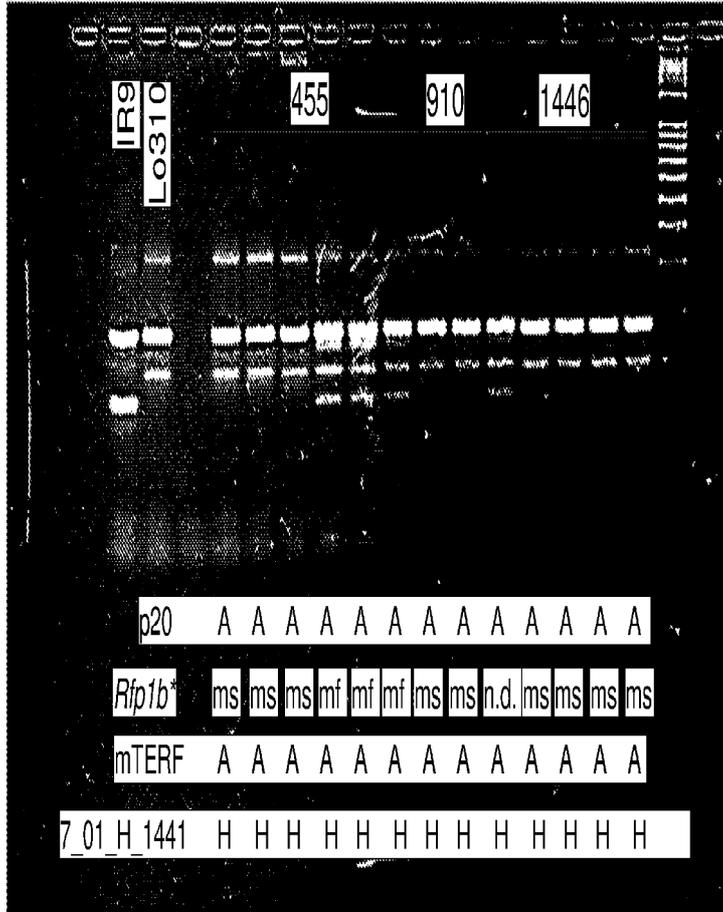
24. Применение по п.23, отличающееся тем, что гибридное растение представляет собой растение вида *Secale cereale*.



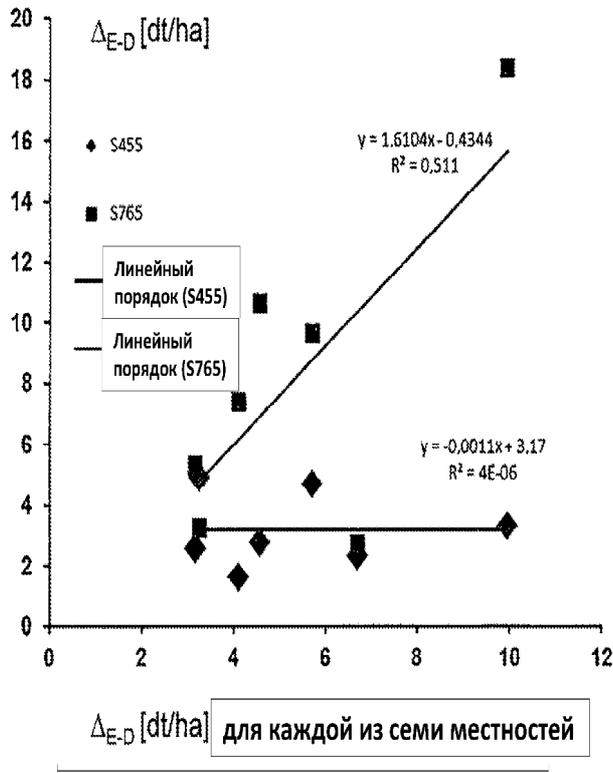
Фиг. 1

Источник данных	Линия	Маркерный гаплотип партнера N1B, несущий интрогрессивный сегмент донора								Δ (E-D)		НСР5%
		ctg32	ctg24	ctg2	RFP1a	ctg16b	ctg32	RFP1b	P20	в dt/ha	в % от E	в dt/ha
094-2014*)	IRAN IX	D	D	D	D	D	D	D	D			
	1110	D	D	D	D	D	D	E	E	4,86	6,24	
	1039	D	D	D	D	D	E	E	E	4,42	5,55	2,47
	1120	D	D	D	D	E	E	E	E	3,72	4,66	
018-2012*)	1058	D	D	E	E	E	E	E	E	0,85	1,05	
	455	E	E	E	E	E	E	D	D	3,73	3,90	
	910	E	E	E	E	E	E	D	D	3,05	3,12	
	1446	E	E	E	E	E	E	D	D	3,66	3,76	
	1199	E	E	E	E	E	D	D	D	6,40	6,64	2,98
	134	E	E	D	D	D	D	D	D	6,71	6,85	
	301	E	E	D	D	D	D	D	D	6,91	7,13	
	765	D	D	D	D	D	D	D	D	7,00	7,14	

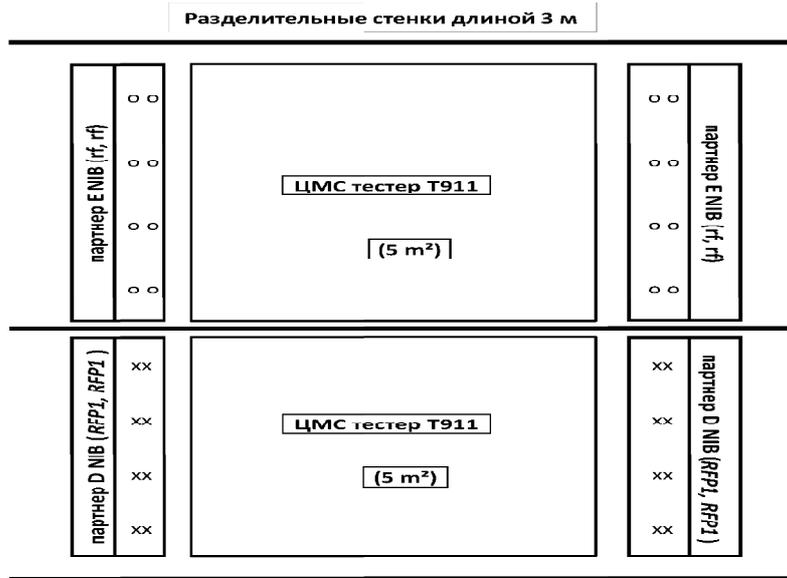
Фиг. 2



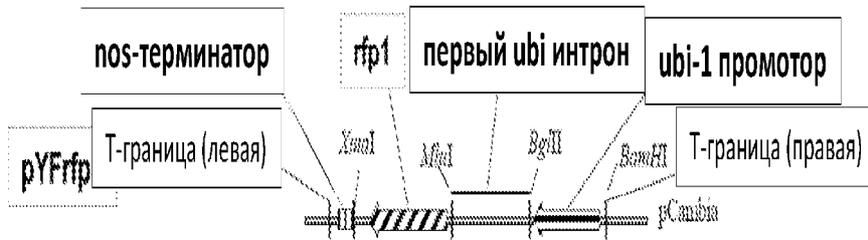
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

Дикий тип-rfp1a	1	ATGCTCCGCTCCGGAGTTGCCTCGTCACCCACSTTCTATCCTCTCCCAC	50
Iran9_rfp1a	1	ATGCTCCGCTCCGGAGTTGCCTCGTCGCCACCTCTATCCTCTCCCAC	50
Дикий тип-rfp1a	51	CACSTCCCACTCCCTCTCTCCACCGCCTCCTCTCCGCGCGCGCGCGC	100
Iran9_rfp1a	51	CCCSTCCCACTCCCTCTCTCCACCGCCTCCTCTCCGCGCGCGCGCGC	100
Дикий тип-rfp1a	101	CCGCGGTCTCCCCAGTCCGGCTTCGACGTCGACGACTATCTCGTCTCC	150
Iran9_rfp1a	101	CCGCGGTCTCCCCAGTCCGGCTTCCAAGTGGAGGACTACCTCGTCTCC	150
Дикий тип-rfp1a	151	ACCTGCGGGCTGACCCGAGCGCAGGCCCTCAAGGCCACCCCCAAGCTCTC	200
Iran9_rfp1a	151	ACCTGCGGCTCACCCGAGCGCAGGCCCTCAAGACCGCCCCAAGCTCTC	200
Дикий тип-rfp1a	201	CCACSTCAAGTCCCCGCAACCCCGACGCGTCCGCTCCTTCTCTCGCCG	250
Iran9_rfp1a	201	CCACSTCAAGTCCCCGCAACCCCGACGCGTCCGCTCCTTCTCTCGCCG	250
Дикий тип-rfp1a	251	GCCTCGGCCTCTCCGGCGCCGACGTCGCGGCCCTCGTCGCCAGGGACCCG	300
Iran9_rfp1a	251	GCCTCGGCCTCTCCGGCGCCGACGTCGCGGCCCTCGTCGCCAGGGACCCG	300
Дикий тип-rfp1a	301	CTCTTCTCTGCGCCGGCGTGGACGGAAACCTGGGCCCCGCGCTCGCCGG	350
Iran9_rfp1a	301	CTCTTCTCTGCGCCGGCGTGGAGGGAAACCTGGGCCCCGCGCTCGCCGG	350

Дикий тип-rfp1a	351	GCTCACCACCTCGGCCTCTCGCGGGCCGAGGTCGCGCGCCTCGTCTCGC	400
		..	
Iran9_rfp1a	351	GCTCACCACCTCGGCCTCTCGCGCTCCGAGGTCGCGCGCCTCGTCTCGC	400
Дикий тип-rfp1a	401	TCTCCCCGGACCGATTCCGCCGCAAGAGCGTCGTCCCAAGGTGCGGTAC	450
Iran9_rfp1a	401	TCTCCCCGGACCGATTCCGCCGCAAGAGCGTCGTCCCAAGGTGCGGTAC	450
Дикий тип-rfp1a	451	TACCTGCCTCTCTTCGGCTCCCCGCGGACCTCCTCTCGGGGGTCAAGAC	500
Iran9_rfp1a	451	TACCTGCCTCTCTTCGGCTCCCCGCGGACCTCCTCTCGGGGGTCAAGAC	500
Дикий тип-rfp1a	501	CGGCCTATTCTCTCTCCGTCGACCTCGACCGGGTCGTCAAGCCCAATG	550
		.	
Iran9_rfp1a	501	CGGCCTGTTCTCTCTCCGTCGACCTCGACCGGGTCGTCAAGCCCAACG	550
Дикий тип-rfp1a	551	TCGCCGTCCTGCGCAAGTGCGGGCTAGGTGTTTGTGATATTGCCAAGCTG	600
		.	
Iran9_rfp1a	551	TCGCCGTCCTGCGCAAGTGCGGGCTAGATGTTTGTGATATTGCCAAGCTG	600
Дикий тип-rfp1a	601	CTCATCCAAATGCCGAGGATCGTCACCGCCAGCCCCGAGCGCACCCCTCGC	650
		.	
Iran9_rfp1a	601	CTCATCCAAATGCCGAGGATCGTCACCGCCAGCCCCGAGCGCACCCCTCGC	650
Дикий тип-rfp1a	651	GATGGTCGCGTCGCCGAGCGCTTGGGTGTGCCCCGTGGCTCCGGGATGT	700
Iran9_rfp1a	651	GATGGTCGCGTCGCCGAGCGCTTGGGTGTGCCCCGTGGCTCCGGGATGT	700
Дикий тип-rfp1a	701	TTAGGCAGGCGCTGCAGGCCGTCGCATGCCTCAGCGAGGACAAGATTGCC	750
		.	
Iran9_rfp1a	701	TTAGGCAGGCGCTGCAGGCCGTCGCATCCCTCAGCGAGGACAAGATTGCC	750
Дикий тип-rfp1a	751	GCCAAAGTGGAGCAGTTGAAGAAGACTGAGGTGGTCGGATGCCGATGT	800
Iran9_rfp1a	751	GCCAAAGTGGAGCAGTTGAAGAAGACTGAGGTGGTCGGATGCCGATGT	800
Дикий тип-rfp1a	801	CGGCATTGCTGTCCGCAAGTGGCCGACTGTGCTGAGGTGGTCAAGGGACA	850
		.	
Iran9_rfp1a	801	CGGCATTGCTGTCTGCAAGTGGCCGCTGTGCTGAGGTGGTCAAGGGACA	850
Дикий тип-rfp1a	851	TGCTGCAGCGCAAGTCCGAGTTCCTCTCTGAGGTGGGCTTGAACCG	900
Iran9_rfp1a	851	TGCTGCAGCGCAAGTCCGAGTTCCTCTCTGAGGTGGGCTTGAACCG	900
Дикий тип-rfp1a	901	GCGTACGTTGCTCACCCTCCGGCAATGCTCGGTCTTAGCTTGGAGCGCCG	950
		.	
Iran9_rfp1a	901	GCGTACATGCTCACCCTCCGGCAATGCTCGGTCTTAGCTTGGAGCGCCG	950
Дикий тип-rfp1a	951	GCTCAAGCCCAGGTACTATGTTATGAGTTTCTTAAGGAAAATGGATTGC	1000
		. .	
Iran9_rfp1a	951	CCTCAAGCCCAGGTACTATGTTATGAGTTTCTTAAGGAAAATGGATTGC	1000
Дикий тип-rfp1a	1001	TCAGTCATGCCAGAGACTACTATTGATGGTCTTGGTCAGCGAGAAGGTA	1050
Iran9_rfp1a	1001	TCAGTCATGCCAGAGACTACTATTGATGGTCTTGGTCAGCGAGAAGGTA	1050
Дикий тип-rfp1a	1051	TTTGTGGAGCGGTTCAATACCCCCACAAGCAAGCTGTGCCACGCATTGC	1100
		..	
Iran9_rfp1a	1051	TTTGTGGAGCGGTTCAATACCCCCACAAGCAAGCTGCACCACACATTGC	1100
Дикий тип-rfp1a	1101	TGAAGACTATGCAGCCGCTTGCATAGGGGAGGTGCCTGCTAGATTGAGAT	1150
Iran9_rfp1a	1101	TGAAGACTATGCAGCCGCTTGCATAGGGGAGGTGCCTGCTAGATTGAGAT	1150
Дикий тип-rfp1a	1151	TTACATGA	1158
Iran9_rfp1a	1151	TTACATGA	1158

Фиг. 7

Дикий тип-rfp1a	1	ATGCTCCTCCTCCTCCGGCAGCGCTCCTCTCCGCCGGCCATCTCCATC	50
Iran9-rfp1b	1	ATGCTCCTCCTCCTCCGGCAGCGCTCCTCTCCGGCTGGCCATCTCCTTC	50
Дикий тип-rfp1a	51	CACCTCCC-----CTCTCCACCGCTCCTCTCCGCCGGCCGGCCCG	91
Iran9-rfp1b	51	CACCTCCCCACTCCTCTCTCTCCACCGCTCCTCTGGCCGGCCGGCCCG	100
Дикий тип-rfp1a	92	CCGTTTCCCGGAACCCCTAGCTTCCGCGTGGAGGAGTACCTCGTCTCCACC	141
Iran9-rfp1b	101	TC-----AACCTAGCTTCGCGTGCAGACTACCTCGTGGCCACC	141
Дикий тип-rfp1a	142	TGCGGCTCACCCGTGCCAGGCACTCAAGGCTCCGCCAAGCTCTCCCA	191
Iran9-rfp1b	142	TGCGGCTCAGCCGTGCCAGGCACTCAAGGCTCCGCCAAGCTGTCCCA	191
Дикий тип-rfp1a	192	CCTCAAGTCCCGCCGCAAGCCGACGCGCTCCTCGCTTCTCCGCCGAC	241
Iran9-rfp1b	192	CCTCAAGTCCCGCCGCAAGCCGACGCGCTCCTCGCTTCTCCGCCGAC	241
Дикий тип-rfp1a	242	TCGGCTCTCCGGCCGACATCGCTGCCCTCGTCCGCAAGGACGCGCG	291
Iran9-rfp1b	242	TCGGCTCTCCGGCCGATGTGGCGGCTCGTCCGCAAGGATCCCAAG	291
Дикий тип-rfp1a	292	TTCCTCTGGCCGGCGTGGAGAGAACCCTGTCCCCATCGTGGTGGCT	341
Iran9-rfp1b	292	TTCCTCTGGCCGGCGTGGAGAGAACCCTGGCCCGCTCGTGGTGGCT	341
Дикий тип-rfp1a	342	CACCGGCTTGGCTGTCAAATGCTGAGACTGCGCGCTCGTCTCGCTTG	391
Iran9-rfp1b	342	CACCGGCTTGGCTGTCAAATGCTGAGACTGCGCGCTCGTCTCGCTTG	391
Дикий тип-rfp1a	392	CCCCGACAAATTCGGCCAGAGATCCATCGTCTCCAAGTAGAGTACTAC	441
Iran9-rfp1b	392	CCCCGACAAATTCGGCCAGAGATCCATCGTCTCCAAGTAGAGTACTAC	441
Дикий тип-rfp1a	442	CTGCCGCTCGTGGCTCCATCGACAACCTGGTCCGGTGGCTCAAACACGG	491
Iran9-rfp1b	442	CTGCCGCTCTCGGCTCCATCGACAACCTGGTCCGGTGGCTCAAACACGG	491
Дикий тип-rfp1a	492	CGCCGGCATCCTCGGCTCCGACCTCGAGGGTGGTCAAGCCCAATGTTA	541
Iran9-rfp1b	492	CGCCGGCATCCTCGGCTCCGACCTCGAGGGTGGTCAAGCCCAATGTTA	541
Дикий тип-rfp1a	542	GTCTCCTAGCAGAGTGGGGTAGGTGCTTGTGATATTGCCAAGCTGTTT	591
Iran9-rfp1b	542	GTCTCCTAGCAGAGTGGGGTAGGTGCTTGTGATATTGCCAAGCTGTTT	591
Дикий тип-rfp1a	592	GTCCAAATACCGAGGATGCTGTGTGCTAAACAGAGCGTGTCTGGAGAT	641
Iran9-rfp1b	592	GTCCAAATACCGAGGATGCTGTGTGCTAAACAGAGCGTGTCTGGAGAT	641
Дикий тип-rfp1a	642	GGTTGCGTGTGCCGAAAGTATAGGTGTGCCCGTGGCTCTGGAATGTTCT	691
Iran9-rfp1b	642	GGTTGCGTGTGCCGAAAGTATAGGTGTGCCCGTGGCTCTGGAATGTTCA	691
Дикий тип-rfp1a	692	GGCAAGCGCTGCACACCGTTCGCATACGTGAGCGTGGACAATATCGTGGC	741
Iran9-rfp1b	692	GGCAGCGCTGCACGCTGTCTCATACTTCAGCGACGACAAGCTCACCGCT	741
Дикий тип-rfp1a	742	AGAGTGGACTACTTGAAGAAGACGTTTAGGTGGTGCAGATATTGAGGTTGG	791
Iran9-rfp1b	742	AAAGTGGACTACTTGAAGAAGACATTTAGGTGGTGGATGCCGAGGTTGC	791
Дикий тип-rfp1a	792	CATTGCTGTGCCAAGGTCATTCTGCTTAGGAGGTCAAAGGATATGC	841
Iran9-rfp1b	792	CATTGCTGTGCCAAGGTCATTCTGCTTAGGAGGTCAAAGGATATTC	841
Дикий тип-rfp1a	842	TGAAACACAGGTCGGAGTTCCTTATCACTGAGCTAGGTTGCAGCCGGCC	891
Iran9-rfp1b	842	TGAAGCACAGCTCCGAGTTCCTTATCACTGAGGTAGGTTGCAGCCGGCC	891
Дикий тип-rfp1a	892	TACATTGCTCATCGCCGGCTATGCTCACTTACAGCCTGGAGGGCCGGCT	941
Iran9-rfp1b	892	TACATTGCTCATCGCCGGCTATGCTCACTTACAGCCTGGAGGGCCGGCT	941
Дикий тип-rfp1a	942	CAGGCCCGCTACTATGTTGTGAGATTTCTCAAGGAAAATGGATTGCTAG	991
Iran9-rfp1b	942	CAGGCCCGCTACTATGTTGTGAGATTTCTCAAGGAAAATGGATTGCTAG	991
Дикий тип-rfp1a	992	AGCACGGGGCGGAGCIACIATAACAACACTGATTAGTACTGAGAAGGTTTT	1041
Iran9-rfp1b	992	AGCACGGGGCGGAGCTACTATAACAACACTGATTAGTACTGAGAAGGTTTT	1041

Дикий тип-rfp1a	1042	ATGGAAAAGTTCATACGCCCTCACAAGGAAGCCGACCACACACCTCGCTGA	1091
Iran9-rfp1b	1042	ATGGAAAAGTTCATACGCCCTCACAAGGAAGCCGACCACACACCTCGCTGA	1091
Дикий тип-rfp1a	1092	AGACTACGGCGGTGCTTGCAAAGGACAAGTGCCGGCTAGATTTCAGATTTA	1141
Iran9-rfp1b	1092	AGACTACGGCGGTGCTTGCAAAGGACAAGTGCCGGCTAGATTTCAGATTTA	1141
Дикий тип-rfp1a	1142	CATGA	1146
Iran9-rfp1b	1142	CATGA	1146

Фиг. 8

Дикий тип-rfp1a	1	MLRLRSCLVTHLLSSPTTSPPLPSLHRLLSAAAAPAVSPSSGFVDDYLVLS	50
Iran9-rfp1a	1	MLRLRSCLVAHLLSSPTTSPPLPSLHRLLSAAAAPAVSPSSGFQVEDYLVLS	50
Дикий тип-rfp1a	51	TCGLTRAQALKATPKLSHLKSPANPDVRSFLAGLGLSGADVAALVARDP	100
Iran9-rfp1a	51	TCGLTRAQALKATPKLSHLKSPANPDVRSFLAGLGLSGADVAALVARDP	100
Дикий тип-rfp1a	101	LFLCAGVDGNLGPVAGLTDLGLSRAEVARLVLSLSPDRFRKSVVPKVRY	150
Iran9-rfp1a	101	LFLCAGVEGNLGPVAGLTDLGLSRSEVARLVLSLSPDRFRKSVVPKVRY	150
Дикий тип-rfp1a	151	YLPLFGSPADLLSGVKTGLFLLSVDLDRVVKPNVAVLRKCGLDVCDIAKL	200
Iran9-rfp1a	151	YLPLFGSPADLLSGVKTGLFLLSVDLDRVVKPNVAVLRKCGLDVCDIAKL	200
Дикий тип-rfp1a	201	LIQMPRIVTASPERTLAMVACAERLCVPRGSCMFRQALQAVACLSEDKIA	250
Iran9-rfp1a	201	LIQMPRIVTASPGRTLAMVACAERLGVPRGSGMFRQALQAVASLSEDKIA	250
Дикий тип-rfp1a	251	AKVEQLKKTLRWSDADVGI AVRKWPVTLRWSRDLQRKSEFLFSEVGLPE	300
Iran9-rfp1a	251	AKVEOLKKTLRWSDADVGI AVCKWPAVLRWSRDLQRKSEFLFSEVGLPE	300
Дикий тип-rfp1a	301	AYVAHRPAMLGSLERRLKPRYYVMRFLKENGLSHARDYYCMVLVSEKV	350
Iran9-rfp1a	301	AYIAHRPAMLGSLERRLKPRYYVMRFLKENGLSHARDYYCMVLVSEKV	350
Дикий тип-rfp1a	351	FVERFIRPHKQAVPRIAEDYAAACIGVPAARFRFT	385
Iran9-rfp1a	351	FVERFIRPHKQAAPHIAEDYAAACIGVPAARFRFT	385

Фиг. 9

Дикий тип-rfp1a	1	MLLLLRQRVLSAAPSSTSP---LHRLLSAAAAPAVSRNPSFAVEEYLVST	47
Iran9-rfp1b	1	MLLLLRQRVLSAAPSSTSPLLSLHRLLCAAAPV---NPSFAVDDYLVGT	47
Дикий тип-rfp1a	48	CGLTRAQALKASAKLSHLKSPAKPDVLAFLAGLGLSGADIAALVAKDAR	97
Iran9-rfp1b	48	CGLSRAQALKASAKLSHLKSPANPDVLAFLAGLGLSGADVAAVVAKDPK	97
Дикий тип-rfp1a	98	FLCAGVERTLSPIVAGLTGLGLSNAETARLVSLAPDKFRQRSIVSKLEY	147
Iran9-rfp1b	98	FLCAGVETTLAPVVAGLTGLGLSNAETARLVSLAPDKFRQRSIVSKLDYY	147
Дикий тип-rfp1a	148	LPLVGSIDNLVRSCLKHGAGILGSDLERVVKPNVSLLAECGLGACDIAKLF	197
Iran9-rfp1b	148	LPLFGSIDNLVRSCLKHGAGILGSDLERVVKPNVSLLAECGLGACDIAKLF	197
Дикий тип-rfp1a	198	VQIPRMLCAKPERVLEMVACAESIGVSRGSGMFWQALHTVAVSVVDNIAA	247
Iran9-rfp1b	198	VQIPRMLCAKPERVLEMVACAESIGVSRGSGMFRHALHAVSYFSDDKLTA	247
Дикий тип-rfp1a	248	RVDYLKKTFRWSDIEVGI AVSKGPFLLRRSKDMLKHSSEFLITELGLQPA	297
Iran9-rfp1b	248	KVDYLKKTFRWSDAEVAIAVSKGPFLLRRSKDILKHSSEFLITEVGLQPA	297
Дикий тип-rfp1a	298	YIAHRPAMLTYSLEGRRLRPRYYVVRFLKENGLLEHGRSYTTLISTEKVF	347
Iran9-rfp1b	298	YIAHRPAMLTYSLEGRRLRPRYYVVRFLKENGLLEHGRSYTTLISTEKVF	347
Дикий тип-rfp1a	348	MEKFIRPHKEAAPHIAEDYAAACKGVPAARFRFT	381
Iran9-rfp1b	348	MEKFIRPHKEAAPHIAEDYAAAYKGVPAARFRFT	381

Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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