

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192617** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.02.11

(22) Дата подачи заявки
2020.03.24

(51) Int. Cl. *A01H 1/04* (2006.01)
A01H 5/00 (2018.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(54) **УВЕЛИЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ РАСТЕНИЙ К ТРАНСФОРМАЦИИ ПОСРЕДСТВОМ ПЕРЕНОСА ЦИТОТИПА**

(31) **62/827,450**

(32) **2019.04.01**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/024440**

(87) **WO 2020/205334 2020.10.08**

(71) Заявитель:
**СИНГЕНТА КРОП ПРОТЕКШН АГ
(CH)**

(72) Изобретатель:

**Скиббе Дэвид Стюарт, Элумалай
Сивамани (US)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) Представлен способ изменения или переноса цитотипа линии растений. В частности, это относится к переносу цитотипа линии растений, неподатливой к трансформации, например, линии маиса, неподатливой к трансформации, из цитотипа, неподатливого к трансформации, в цитотип, способный к трансформации, чтобы линия стала способной к трансформации при сохранении своего ядерного генома. Линия с новой способностью к трансформации может быть получена с использованием способов, включающих возвратное скрещивание и/или индукцию гаплоидии.

202192617
A1

202192617
A1

УВЕЛИЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ РАСТЕНИЙ К ТРАНСФОРМАЦИИ ПОСРЕДСТВОМ ПЕРЕНОСА ЦИТОТИПА

5

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно §119 раздела 35 U.S.C. по предварительной заявке на патент США № 62/827450, поданной 1 апреля 2019 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

10

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] К настоящей заявке прилагается перечень последовательностей под названием CYTOTYPETRANSFER_ST25.txt, созданный 16 марта 2020 г., размер которого составляет примерно 2 килобайта. Этот перечень последовательностей включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Данный перечень последовательностей подается вместе с настоящей заявкой посредством EFS-Web и соответствует §1.824(a)(2)–(6) и (b) раздела 37 C.F.R.

15

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0003] Настоящее изобретение относится к области биотехнологии растений. В частности, оно относится к трансформации растений, включая трансформацию маиса, и к способам увеличения способности неподатливой линии принимать чужеродные трансгены.

20

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Трансформация растений, то есть стабильная интеграция чужеродной ДНК ("трансгенов") в геном растения, использовалась в течение многих десятилетий для добавления новых и полезных признаков сельскохозяйственным культурам. См., например, патент США № 6051409, поданный 23 сентября 1996 г., включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте (в котором раскрыта трансформация маиса); публикацию заявки на патент США № 2008/0229447, поданную 12 марта 2007 г., включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте (в котором раскрыта трансформация сои). Один из недавних примеров

25

30

включает трансформант кукурузы MIR604, который содержит инсектицидный белок, полученный из бактерий (патент США № 7361813, включенный посредством ссылки во всей своей полноте). Тогда как некоторые линии маиса относительно легко трансформируются (т. е. принимают трансгенную ДНК), большинство линий таковыми не являются. Например, большинство элитных инбредных линий (линии, которые подвергались самовоспроизводству в течение нескольких поколений для получения чистого или почти чистого гомозиготного генома и которые используются в качестве родительских линий для создания коммерчески ценных гибридов) не могут быть трансформированы чужеродной ДНК. Таким образом, чтобы "переместить" трансгенный признак в инбредную линию, трансгенный признак должен сначала быть введен путем трансформации в способную к трансформации линию маиса. Эта трансформированная линия маиса редко подходит для использования в качестве родительской линии в селекционных платформах. Следовательно, трансформированную линию маиса скрещивают с инбредной линией для создания растения-потомка, которое будет содержать в гетерозиготном состоянии геномы как инбредного родительского растения, так и трансформированного родительского растения. Затем это растение-потомок, содержащее трансген, должно быть подвергнуто возвратному скрещиванию с инбредной линией в течение примерно шести или семи поколений, чтобы элиминировать, насколько это возможно, геном, внесенный трансформированным родителем, при сохранении трансгенного признака. Этот процесс обычно занимает от двух до трех лет. В конце этого процесса, наконец, получают инбредную линию, содержащую трансгенный признак.

[0005] Маис не является однородным видом. Он демонстрирует необычайное разнообразие, будь то зубовидная кукуруза (также известная как "полевая кукуруза", имеющая высокое содержание крахмала и используемая в качестве корма для животных, для производства этанола или производства кукурузной муки), кремнистая кукуруза (также известная как "индийская кукуруза" и известная своим множеством цветов), сахарная кукуруза (потребляется главным образом людьми, часто как кукуруза в початках) или лопающаяся кукуруза. Хотя большая часть этого разнообразия обусловлена различиями, обнаруживаемыми между геномами разных линий маиса, некоторая часть этого разнообразия также обусловлена геномами митохондрий — субклеточных органелл, которые обеспечивают химической энергией все клетки — которые дополняют линии. Митохондрии имеют собственную ДНК, и этот

митохондриальный геном указывает на цитотип маиса. Например, маис, как известно, имеет по меньшей мере пять различных цитотипов: нормальный А ("NA"), нормальный В ("NB"), С с цитоплазматической мужской стерильностью ("CMS-C" или "C"), S с цитоплазматической мужской стерильностью ("CMS-S" или "S") и Т с цитоплазматической мужской стерильностью ("CMS-T" или "T"). Другие цитотипы еще могут быть обнаружены. Таким образом, митохондрии посредством своего генома могут оказывать, сравнительно говоря, чрезмерно сильный эффект на фенотип клетки-хозяина. Однако авторы настоящего изобретения все еще только изучают, какими могут быть эти эффекты.

10 **[0006]** В данном документе авторы настоящего изобретения впервые обнаружили взаимосвязь между способностью к трансформации и цитотипом. Линии маиса, известные как способные к трансформации, имеют цитотип NA, тогда как известные неподатливые линии маиса имеют цитотип NB. Поэтому авторы настоящего изобретения задались вопросом: можно ли изменить цитотип неподатливой инбредной

15 линии и сделать ее способной к трансформации? Если это так, то авторы настоящего изобретения могли бы произвести революцию в трансформации маиса и значительно ускорить доступ фермеров к новым признакам коммерчески значимой зародышевой плазмы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

20 **[0007]** В данном документе предусмотрен способ изменения цитотипа неподатливого растения, чтобы сделать неподатливое растение способным к трансформации. Это достигается путем сбора пыльцы с неподатливого растения и ее использования для опыления реципиентного растения со способным к трансформации цитотипом. В результате этого события опыления получается зародыш-потомок, имеющий

25 способный к трансформации цитотип (унаследованный от материнского родительского растения), а также имеющий в своем ядерном геноме набор хромосом, унаследованный от неподатливого отцовского родительского растения. Этот зародыш-потомок, трансформированный напрямую, или в котором индуцировано образование каллюсной ткани, или из которого выращивают растение, характеризуется более высокой

30 эффективностью трансформации, чем его неподатливое родительское растение. В некоторых случаях неподатливое родительское растение имеет цитотип NB или цитотипы с цитоплазматической мужской стерильностью CMS-C, CMS-S или CMS-T.

[0008] Реципиентное растение выступает в качестве материнского родительского растения в случае, когда оно получает пыльцу от неподатливого растения (которое выступает в качестве отцовского родительского растения). Реципиентное растение может представлять собой растение, являющееся индуктором гаплоидии, то есть любой 5 потомок реципиентного растения может иметь только половину нормального числа хромосом. Например, реципиентное растение может представлять собой растение, являющееся индуктором отцовской гаплоидии, которое обуславливает потерю у некоторых потомков материнских хромосом (и, таким образом, сохранение только отцовских хромосом). Растение, являющееся индуктором отцовской гаплоидии, может 10 содержать мутацию в гене *igl* или гене *CENH3*. См. патент США № 7439416, заявка на который подана 7 января 2005 г. (в котором раскрыт ген *IG1*), и патент США № 8618354, заявка на который подана 5 октября 2010 г. (в котором раскрыты мутации *CENH3*), оба из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В случае, когда реципиентное растение является индуктором отцовской 15 гаплоидии, потомство, полученное в результате заявленного способа, будет содержать ядерный геном неподатливого растения (т. е. как гаплоид), но иметь цитотип реципиентного растения.

[0009] В случае, когда реципиентное растение не представляет собой растение, являющееся индуктором гаплоидии, потомство, полученное в результате заявленного 20 способа, будет содержать ядерный геном неподатливого растения и ядерный геном реципиентного растения (т. е. как нормальный диплоид) и иметь цитотип реципиентного растения. В этом случае может быть желательным возвратное скрещивание с неподатливым растением для увеличения процентной доли и эпигенетического статуса ядерного генома неподатливого растения относительно 25 присутствующего ядерного генома реципиентного растения у потомка при сохранении в то же время желаемого способного к трансформации цитотипа. Первое потомство (поколение F1), полученное в результате заявленного способа, будет содержать цитоплазму NA и ядерный геном, содержащий половину генома реципиентного родительского растения и половину генома неподатливого родительского растения. 30 После одного возвратного скрещивания ("BC") с пыльцой неподатливого родительского растения второе поколение (т. е. потомство из поколения BC2) будет содержать цитоплазму NA и ядерный геном, содержащий 75% материала от неподатливого родительского растения и 25% материала от реципиентного

родительского растения. Последующие поколения потомства, например, BC3, BC4 и т. д., будут иметь все меньшее и меньшее соотношение ядерного генома реципиента и ядерного генома неподатливого растения. Отбор желаемого ядерного генотипа можно ускорить благодаря использованию молекулярных маркеров для отбора желаемого
 5 родительского растения. Процесс отбора без маркеров показан в таблице ниже:

Таблица 1. Уменьшение присутствия материнского генома в поколениях потомства, полученных в результате возвратного скрещивания, с использованием неподатливого растения в качестве источника пыльцы без отбора

| Поколение потомства | Цитотип | Процент генома реципиента | Процент генома неподатливого растения |
|---------------------|---------|---------------------------|---------------------------------------|
| F1 | NA | 50% | 50% |
| BC2 | NA | 25% | 75% |
| BC3 | NA | 12,5% | 87,5% |
| BC4 | NA | 6,25% | 93,75% |
| BC5 | NA | 3,13% | 96,88% |
| BC6 | NA | 1,56% | 98,44% |
| BC7 | NA | 0,78% | 99,22% |

- 10 **[0010]** Осуществляя на практике заявленный способ, можно увеличить показатель эффективности трансформации у неподатливой линии растений, так что при трансформации ткани, полученной из растения-потомка или зародыша-потомка, она будет характеризоваться более высоким показателем успешности, чем ее родительское растение из неподатливой линии.
- 15 **[0011]** Соответственно, один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ увеличения успешности встраивания желаемой ДНК в хромосомы клетки растения маиса, т. е. увеличения показателя эффективности трансформации у неподатливой линии маиса, посредством переноса цитотипа. Это осуществляется путем (а) сбора пыльцы с неподатливого растения маиса; (b) опыления
 20 рылец другого растения маиса, которое имеет нормальную цитоплазму А ("NA"), пыльцой от неподатливого растения маиса; и (с) обеспечения формирования зародышей-потомков. При успешных переносах цитотипа зародыш-потомок имеет цитоплазму NA и по меньшей мере ядерный геном неподатливого растения маиса (если потомство является гаплоидным, то оно будет иметь только хромосомы неподатливого

растения маиса; если это потомство является диплоидным, то оно будет иметь хромосомы от обоих родительских растений). Этот зародыш-потомок характеризуется более высоким показателем эффективности трансформации, чем неподатливое растение маиса.

- 5 **[0012]** Другой вариант осуществления представляет собой способ придания способности к трансформации неподатливой линии маиса. Это осуществляется путем (а) сбора пыльцы с неподатливого растения маиса; (b) опыления рылец другого растения маиса, которое имеет нормальную цитоплазму А ("NA"), пыльцой от неподатливого растения маиса; и (с) обеспечения формирования зародышей-потомков.
- 10 При успешных скрещиваниях растение-потомок является способным к трансформации. Неподатливое растение маиса может иметь цитоплазму, отличную от NA, например, цитоплазма, отличная от NA, представляет собой нормальную цитоплазму В ("NB"), цитоплазму С с цитоплазматической мужской стерильностью ("С" или "CMS-C"), цитоплазму S с цитоплазматической мужской стерильностью ("S" или "CMS-S") или
- 15 цитоплазму Т с цитоплазматической мужской стерильностью ("Т" или "CMS-T"). Реципиентное растение маиса может представлять собой растение, являющееся индуктором гаплоидии (или, более конкретно, растение, являющееся индуктором отцовской гаплоидии), или растение, являющееся индуктором отцовской гаплоидии, содержит мутантный ген *ig1* или мутацию *CENH3*.
- 20 **[0013]** После получения из зародыша-потомка выращивают растение-потомка. Растение-потомок может быть подвергнуто возвратному скрещиванию с неподатливым растением маиса в течение по меньшей мере одного поколения. В качестве альтернативы растение-потомок является женским родительским растением при возвратном скрещивании. Растение-потомок может сохранять цитоплазму NA и/или
- 25 сохраняет ядерный геном неподатливого растения маиса.

- [0014]** Специалист, осуществляющий на практике настоящее изобретение, может провести возвратное скрещивание растения-потомка с использованием пыльцы от неподатливого растения в ходе по меньшей мере одного скрещивания перед трансформацией ткани, полученной из зародыша-потомка. Это приведет к увеличению
- 30 доли ядерной ДНК неподатливого растения (см. таблицу 1), но при этом и сохранению нового цитотипа, так что любая растительная ткань, полученная из поколения BC1 или

более позднего, будет характеризоваться более высоким показателем эффективности трансформации, чем исходное неподатливое растение.

[0015] Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ трансформации растения путем тестирования линий растений маиса в отношении маркеров, указывающих на цитоплазму NA, и отбора по меньшей мере одной из этих 5 линий для трансформации. В одном аспекте в тесте выявляется нуклеотид G в положении, которое соответствует положению 11 в последовательности митохондриальной ДНК под SEQ ID NO: 7; или в тесте выявляется присутствие последовательности, соответствующей SEQ ID NO: 7. Тест в отношении маркеров, 10 указывающих на цитоплазму NA, необязательно дополнительно предусматривает прямой праймер под SEQ ID NO: 5 и обратный праймер под SEQ ID NO: 6. В качестве альтернативы тест в отношении маркеров, указывающих на цитоплазму NA, предусматривает зонд под SEQ ID NO: 7 и/или зонд под SEQ ID NO: 8, где зонды дифференциально мечены флуорофорами.

15 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ПЕРЕЧНЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0016] SEQ ID NO: 1–4 представляют собой наборы маркеров для проведения различий между CMS и нормальной цитоплазмой. Прямой и обратный праймеры (SEQ ID NO: 1 и 2 соответственно) амплифицируют исходную мишень, а также зонды для CMS и 20 нормальной цитоплазмы (SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно), меченные разными флуорофорами, которые указывают на то, какой аллель выявляется.

[0017] SEQ ID NO: 5–8 представляют собой наборы маркеров для проведения различий между цитотипами нормальным А и нормальным В. Прямой и обратный праймеры (SEQ ID NO: 5 и 6 соответственно) амплифицируют исходную мишень, а также зонды 25 для нормального А и нормального В (SEQ ID NO: 7 и 8 соответственно), меченные разными флуорофорами, которые указывают на то, какой аллель выявляется.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0018] Предполагается, что все технические и научные термины, используемые в данном документе, если ниже не определено иное, имеют такое же значение, которое 30 обычно понятно среднему специалисту в данной области. Предполагается, что ссылки на используемые в данном документе методики относятся к методикам, общепринятым

в данной области техники, в том числе к видоизменениям этих методик и/или заменам на эквивалентные методики, которые будут очевидны специалисту в данной области. Хотя предполагается, что следующие термины хорошо понятны среднему специалисту в данной области, следующие определения приведены для облегчения пояснения раскрытого в данном документе объекта изобретения.

[0019] Термин "цитотип" относится к классификации цитоплазмы, относящейся к линии растений. Известные в настоящее время цитотипы включают нормальную цитоплазму А ("NA") и нормальную цитоплазму В ("NB"), но также включают цитотипы с цитоплазматической мужской стерильностью: цитоплазму С с цитоплазматической мужской стерильностью ("С" или "CMS-C"), цитоплазму S с цитоплазматической мужской стерильностью ("S" или "CMS-S") и цитоплазму Т с цитоплазматической мужской стерильностью ("Т" или "CMS-T"). Термины "цитотип" и "цитоплазма" используются взаимозаменяемо.

[0020] Как используется в данном документе, "неподатливый" относится к линии растений, которая не способна к трансформации или по сути не способна к трансформации. Другими словами, ее эффективность трансформации составляет 0% или по сути 0%. Термин "неподатливый" является синонимом термина "неспособный к трансформации", и эти термины используются взаимозаменяемо.

[0021] "Способный к трансформации", "способность к трансформации" и т. п. относится к растению, линии растений или растительной клетке (такой как каллюсная ткань или протопласт), которые легче принимают чужеродную ДНК и могут стабильно интегрировать чужеродную ДНК в свой геном.

[0022] "Эффективность трансформации" или "показатель трансформации" означает меру числа успешно трансформированных растений относительно общего числа попыток. Эта мера может быть выражена количественно, например, в виде процентного значения или абсолютного числа, или качественно, например, "низкая" или "высокая".

[0023] Термин "аллель(аллели)" означает любую из одной или нескольких альтернативных форм гена, при этом все из этих аллелей относятся к по меньшей мере одному признаку или характеристике. В диплоидной клетке два аллеля данного гена занимают соответствующие локусы на паре гомологичных хромосом. В некоторых случаях (например, для QTL) более точной является ссылка на "гаплотип" (т. е. аллель

хромосомного сегмента), а не на "аллель", однако в этих случаях термин "аллель" следует понимать как включающий термин "гаплотип". Если два индивидуума имеют один и тот же аллель в определенном локусе, эти аллели называются "идентичными по происхождению", если аллели были унаследованы от одного общего предка (т. е. аллели являются копиями одного и того же родительского аллеля). Альтернативой является то, что аллели "идентичны по состоянию" (т. е. аллели кажутся одинаковыми, но происходят от двух разных копий аллеля). Информация об идентичности по происхождению является полезной для исследований групп сцепления; в исследованиях ассоциаций можно использовать информацию как об идентичности по происхождению, так и об идентичности по состоянию, хотя информация об идентичности по происхождению может быть особенно полезной.

[0024] Термин "возвратное скрещивание" в пределах объема настоящего изобретения понимают как относящийся к процессу, в котором гибридное потомство подвергается многократному возвратному скрещиванию с одним из родительских организмов.

[0025] Термин "условная мужская стерильность" означает фенотип мужской стерильности (т. е. неспособность производить фертильную пыльцу), индукция и/или репрессия которого может происходить под действием определенных условий. Как следствие, растение можно "переключить" с фенотипа мужской стерильности на фенотип мужской фертильности, применяя указанные определенные условия. Мужская стерильность может быть вызвана различными факторами и может выражаться, например, как полное отсутствие мужских органов (пыльников), дегенерированная пыльца, бесплодная пыльца и т. д. В зависимости от интенсивности состояния "переключение" с мужской стерильности на мужскую фертильность может быть полным или неполным. Наиболее предпочтительно в контексте настоящего изобретения термин "условная мужская стерильность" означает мужскую стерильность, зависящую от температуры, и, таким образом, означает фенотип ядерной мужской стерильности, при котором стерильность зависит от температуры и может быть возвращена к фертильности при температуре более 35°C (предпочтительно от 35°C до 43°C, более предпочтительно от 37°C до 40°C, наиболее предпочтительно при около 39°C; предпочтительно с воздействием в течение предпочтительного времени тепловой обработки и последующим выращиванием при окружающей температуре).

[0026] Термин "соответствующий" применительно к последовательностям нуклеиновых кислот означает, что при выравнивании последовательностей нуклеиновых кислот с определенными последовательностями друг с другом нуклеиновые кислоты, которые "соответствуют" определенным перечисленным положениям согласно настоящему изобретению, являются такими, которые 5 выравниваются с этими положениями в эталонной последовательности, но не обязательно находятся именно в этих числовых положениях относительно конкретной последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Например, в приведенном ниже выравнивании Т в положении 13 SEQ ID NO: 8 соответствует G в 10 положении 11 SEQ ID NO: 7.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|-----------|----|----|----|----|----|----|----|
| SEQ ID NO: 7 | | C | G | T | A | A | A | T | T | T | T | <u>G</u> | T | T | T | G | A | T | G |
| С | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Положение | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | <u>11</u> | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 19 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|-----------|----|----|----|----|----|----|----|
| SEQ ID NO: 8 | A | T | C | G | T | A | A | A | T | T | T | T | <u>T</u> | T | T | T | G | A | T | G |
| С | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Положение | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | <u>13</u> | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 21 |

[0027] Термин "дифференциально меченный" указывает на то, что каждый из двух или 20 более зондов имеет флуорофор, отличный от другого, так что присутствие или отсутствие каждого зонда может быть выявлено индивидуально и независимо от того, включены ли два или более зонда в одну и ту же реакцию.

[0028] Термин "зародышевая плазма" относится ко всей совокупности генотипов в 25 популяции или другой группе индивидуумов (например, у вида). Термин "зародышевая плазма" может также относиться к растительному материалу; например, к группе растений, которые выступают в качестве вместилища для различных аллелей. Фраза "адаптированная зародышевая плазма" относится к растительным материалам с доказанным генетическим превосходством; например, для данной среды обитания или географической области, тогда как фразы "неадаптированная зародышевая плазма", 30 "необработанная зародышевая плазма" и "экзотическая зародышевая плазма" относятся к растительным материалам с неизвестной или недоказанной генетической ценностью; например, для данной среды обитания или географической области; таким образом, фраза "неадаптированная зародышевая плазма" относится в некоторых вариантах осуществления к растительным материалам, которые не являются частью устойчивой

популяции для разведения и для которых неизвестно родство с представителями устойчивой популяции для разведения.

[0029] Термин "гаплотип" может относиться к набору аллелей, унаследованных индивидуумом от одного из родительских организмов. Таким образом, диплоидный индивидуум имеет два гаплотипа. Термин "гаплотип" можно использовать в более ограниченном смысле для обозначения физически сцепленных и/или несцепленных генетических маркеров (например, полиморфизмов последовательностей), ассоциированных с фенотипическим признаком. Фраза "гаплотипический блок" (иногда также называемая в литературе просто гаплотипом) относится к группе из двух или более генетических маркеров, которые являются физически сцепленными на одной хромосоме (или ее части). Как правило, каждый блок имеет несколько общих гаплотипов, и можно выбрать подмножество генетических маркеров (т. е. "метку гаплотипа"), которое однозначно идентифицирует каждый из этих гаплотипов.

[0030] Термины "гетерозисная группа" и "гетерозисный пул" используются взаимозаменяемо и относятся к взаимосвязи между селекционными пулами популяций маиса. В общих чертах основными обозначениями гетерозисного пула являются: Stiff Stalk ("SS", также называемый Iowa Stiff Stalk Synthetic или "BSSS"), Non Stiff Stalk ("NSS") и Iodent ("IDT"). См. J. v. Hweerwaarden, et al., *Historical genomics of North American maize*, PROC. NAT'L ACAD. SCI. U.S.A. 109(31):12420–25 (2012). Однако они не являются исключительными, и известны другие обозначения, например, Lancaster Sure Crop ("LSC"). См., например, C. Livini, et al., *Genetic diversity of maize inbred lines with and among heterotic groups revealed by RFLPs*, THEOR. APPL. GENET. 84:17–25 (1992).

[0031] Термины "гибрид", "гибридное растение" и "гибридный потомок" применительно к селекции растений относятся к растению, которое является потомком генетически разнородных родительских растений, полученным путем скрещивания растений из различных линий, или селекционных сортов, или видов, в том числе без ограничения путем скрещивания между двумя инбредными линиями (например, генетически гетерозиготным или главным образом гетерозиготным индивидуумом). Фраза "простой гибрид F1" относится к гибриду F1, полученному в результате скрещивания двух инбредных линий.

[0032] Фраза "инбредная линия" относится к генетически гомозиготной или почти гомозиготной популяции. Инбредная линия, например, может быть получена

посредством нескольких циклов братско-сестринских скрещиваний или самовоспроизводства. В некоторых вариантах осуществления инбредные линии имеют способность передавать потомству один или несколько фенотипических признаков, представляющих интерес. "Инбредный", "инбредный индивидуум" или "инбредный
5 потомок" означает индивидуум, отобранный из инбредной линии. Термин "инбредный" означает практически гомозиготный индивидуум или линию.

[0033] Термины "интрогрессия", "интрогрессированный" и "интрогрессирующий" относятся как к естественному, так и к искусственному процессу, посредством которого области генома из одного вида, сорта или культивара перемещаются в геном
10 другого вида, сорта или культивара путем скрещивания этих видов. Процесс необязательно можно выполнить путем возвратного скрещивания с рекуррентным родительским растением.

[0034] Термин "отбор на основе маркеров" в пределах объема настоящего изобретения понимают как относящийся к применению генетических маркеров для выявления
15 одной или нескольких нуклеиновых кислот у растения, где нуклеиновая кислота ассоциирована с желаемым признаком, для идентификации растений, несущих гены желательных (или нежелательных) признаков, так чтобы эти растения можно было применять (или избегать их применения) для любых целей, например, в программе трансформации или в программе селекционного разведения. Как используется в
20 данном документе, по маркеру, указывающему на нормальную цитоплазму А, можно проводить различия между растениями без CMS, имеющими нормальную цитоплазму В, и растениями, не имеющими нормальную цитоплазму В, т. е. имеющими нормальную цитоплазму А. Маркер может представлять собой мутацию в локусе генома (например, однонуклеотидный полиморфизм ("SNP")) или мутацию в пределах
25 одного аллеля.

[0035] Фраза "фенотипический признак" относится к внешнему виду или другой выявляемой характеристике индивидуума, являющейся результатом взаимодействия его генома с окружающей средой.

[0036] Термин "множество" относится к более чем одному объекту. Таким образом, "множество индивидуумов" относится к по меньшей мере двум индивидуумам. В
30 некоторых вариантах осуществления термин "множество" относится к более чем половине от всего количества. Например, в некоторых вариантах осуществления

"множество из популяций" относится к более чем половине представителей данной популяции.

5 [0037] Термин "потомство" относится к потомку(потомкам), полученным в результате конкретного скрещивания. Как правило, потомство является результатом скрещивания двух индивидуумов, хотя некоторые виды (особенно некоторые растения и гермафродитные животные) могут подвергаться самовоспроизводству (т. е. одно растение выступает в качестве донора как мужских, так и женских гамет). Потомок(потомки) могут быть, например, из F1, F2 или любого последующего поколения.

10 [0038] Фраза "качественный признак" относится к фенотипическому признаку, который контролируется одним или несколькими генами, демонстрирующими основные фенотипические эффекты. Ввиду этого наследование качественных признаков, как правило, является простым. Примеры у растений включают без ограничения цвет цветков, цвет початков и устойчивость к болезням, такую как, например, устойчивость
15 к гельминтоспориозной пятнистости листьев кукурузы.

[0039] "Фенотип" в пределах объема настоящего изобретения понимают как относящийся к различимой(различимым) характеристике(характеристикам) генетически контролируемого признака.

20 [0040] "Растение" представляет собой любое растение на любой стадии развития, в частности семенное растение.

[0041] "Растительная клетка" представляет собой структурную и физиологическую единицу растения, содержащую протопласт и клеточную стенку. Растительная клетка может быть представлена в виде выделенной одиночной клетки или культивируемой клетки или в виде части более высокоорганизованной единицы, такой как, например,
25 растительная ткань, орган растения или целое растение.

[0042] "Культура растительных клеток" означает культуры растительных единиц, таких как, например, протопласты, клетки в клеточной культуре, клетки в растительных тканях, пыльца, пыльцевые трубки, семязачатки, зародышевые мешки, зиготы и зародыши на различных стадиях развития.

[0043] "Растительный материал" относится к листьям, стеблям, корням, цветкам или частям цветков, плодам, пыльце, яйцеклеткам, зиготам, семенам, черенкам, клеточным или тканевым культурам или к любой другой части или продукту растения.

5 [0044] "Орган растения" представляет собой отдельную и визуально структурированную и дифференцированную часть растения, такую как корень, стебель, лист, цветочная почка или зародыш.

[0045] "Растительная ткань", как используется в данном документе, означает группу растительных клеток, организованных в структурную и функциональную единицу. Включена любая ткань растения *in planta* или в культуре. Данный термин включает без
10 ограничения целые растения, органы растений, семена растений, тканевую культуру и любую группу растительных клеток, организованных в структурные и/или функциональные единицы. Использование данного термина в сочетании с любым конкретным типом растительной ткани, перечисленным выше или иным образом охватываемым данным определением, или при его отсутствии не предполагается как
15 исключаящее любой другой тип растительной ткани.

[0046] Термин "часть растения" означает часть растения, в том числе отдельные клетки и клеточные ткани, такие как растительные клетки, которые являются интактными в растениях, скопления клеток и тканевые культуры, из которых можно регенерировать растения. Примеры частей растения включают без ограничения отдельные клетки и
20 ткани из пыльцы, семязачатков, листьев, зародышей, корней, кончиков корней, пыльников, цветков, плодов, стеблей, побегов и семян; а также пыльцу, семязачатки, листья, зародыши, корни, кончики корней, пыльники, цветки, плоды, стебли, побеги, привои, подвои, семена, протопласты, каллюсы и т. п.

[0047] Термин "популяция" означает генетически неоднородную совокупность
25 растений, имеющих общее генетическое происхождение.

[0048] Термин "преимущественно характеризующийся мужской стерильностью" означает, что в популяции из по меньшей мере 100 растений не более 10%, предпочтительно не более 5%, более предпочтительно не более 1% цветков на всех
30 этих растениях имеют функциональные мужские органы, производящие фертильную пыльцу. Следует понимать, что отдельное растение может иметь как фертильные, так и стерильные цветки. В предпочтительных вариантах осуществления не более 10%,

предпочтительно не более 5%, более предпочтительно не более 1% цветков отдельного растения имеют функциональные мужские органы, производящие фертильную пыльцу.

[0049] Термин "растение-потомок" относится к любому растению, полученному в качестве потомства в результате вегетативного или полового размножения от одного или нескольких родительских растений или их потомков. Например, растение-потомок может быть получено путем клонирования или самовоспроизводства одного родительского растения или путем скрещивания двух родительских растений, и оно включает продукты самовоспроизводства, а также F1 или F2 или более далекие поколения. F1 представляет собой потомство из первого поколения, полученное от родительских растений, по меньшей мере одно из которых используется в первый раз в качестве донора признака, тогда как потомство из второго поколения (F2) или последующих поколений (F3, F4 и т. д.) является особями, полученными в результате самовоспроизводства F1, F2 и т. д. Таким образом, F1 может быть гибридом, полученным в результате скрещивания двух чистосортных родительских растений (чистосортное растение является гомозиготным по признаку), тогда как F2 может быть потомком, полученным в результате самоопыления указанных гибридов F1.

[0050] "Рекомбинация" представляет собой обмен информацией между двумя гомологичными хромосомами в ходе мейоза. Частота двойной рекомбинации является произведением частот одиночных рекомбинаций. Например, рекомбинант в области размером 10 сМ может быть обнаружен с частотой 10%, а двойные рекомбинанты обнаруживаются с частотой $10\% \times 10\% = 1\%$ (1 сантиморганида определяется как 1% рекомбинантного потомства в анализирующем скрещивании).

[0051] Термин "RHS" или "система восстановленных гибридов" означает систему гибридов на основе ядерной мужской стерильности.

[0052] Фразы "подвергнутый половому скрещиванию" и "половое размножение" в контексте настоящего изобретения относятся к слиянию гамет с получением потомства (например, путем оплодотворения, как, например, для получения семян путем опыления растений). В некоторых вариантах осуществления "половое скрещивание" или "перекрестное оплодотворение" представляет собой оплодотворение одного индивидуума другим (например, при перекрестном опылении у растений). В некоторых вариантах осуществления термин "самовоспроизводство" относится к получению семян

путем самооплодотворения или самоопыления; т. е. пыльца и семязачаток происходят из одного и того же растения.

5 **[0053]** Термин "селекционное разведение" в пределах объема настоящего изобретения понимают как относящийся к программе разведения, в которой в качестве родительских организмов используют растения, которые обладают желательными признаками или проявляют их.

10 **[0054]** Термин "тестерное растение" в пределах объема настоящего изобретения понимают как относящийся к растению, используемому для определения генетических характеристик признака растения, подлежащего тестированию. Как правило, растение, подлежащее тестированию, скрещивают с "тестерным" растением, и подсчитывают соотношение сегрегации признака у потомства, полученного в результате скрещивания.

15 **[0055]** Термин "тестер" относится к линии или индивидууму со стандартным генотипом, известными характеристиками и установленной производительностью. "Тестерное родительское растение" представляет собой индивидуум из тестерной линии, который используется в качестве родительского растения при половом скрещивании. Как правило, тестерное растение не родственно индивидууму, с которым оно скрещивается, и генетически отличается от него. Тестер обычно используется для получения потомства F1 при скрещивании с индивидуумами или инбредными линиями для фенотипической оценки.

20 **[0056]** Фраза "комбинация топкросс" относится к процессу скрещивания одной тестерной линии с несколькими линиями. Целью постановки таких скрещиваний является определение фенотипических показателей гибридного потомства; то есть для оценки способности каждой из нескольких линий давать желаемые фенотипы в гибридном потомстве, полученном от линии путем скрещивания с тестером.

25 **[0057]** Термины "сорт" или "культивар" означают группу схожих растений, которые можно отличить от других сортов в рамках одного и того же вида по структурным или генетическим признакам и/или показателям.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

30 **[0058]** Один вариант осуществления изобретения представляет собой способ увеличения показателя эффективности трансформации у неподатливой линии маиса,

включающий: (а) получение неподатливого растения маиса и сбор пыльцы с него; (b) опыление реципиентного растения маиса, содержащего нормальную цитоплазму А ("NA"), пыльцой от неподатливого растения маиса; и (с) получение из него зародыша-потомка; где зародыш-потомок содержит цитоплазму NA и по меньшей мере ядерный геном неподатливого растения маиса, и где зародыш-потомок характеризуется более высоким показателем эффективности трансформации, чем неподатливое растение маиса. Другой вариант осуществления представляет собой способ придания способности к трансформации неподатливой линии маиса, включающий: (а) получение неподатливого растения маиса и сбор пыльцы с него; (b) опыление реципиентного растения маиса, содержащего нормальную цитоплазму А ("NA"), пыльцой от неподатливого растения маиса; и (с) выращивание из него растения-потомка; где растение-потомок содержит цитоплазму NA и ядерный геном неподатливого растения маиса, и где растение-потомок является способным к трансформации. В одном аспекте неподатливое растение маиса содержит цитоплазму, отличную от NA. В другом аспекте цитоплазма, отличная от NA, выбрана из группы, состоящей из нормальной цитоплазмы В ("NB"), цитоплазмы С с цитоплазматической мужской стерильностью ("С" или "CMS-C"), цитоплазмы S с цитоплазматической мужской стерильностью ("S" или "CMS-S") или цитоплазмы Т с цитоплазматической мужской стерильностью ("Т" или "CMS-T"). В одном аспекте реципиентное растение маиса представляет собой растение, являющееся индуктором гаплоидии, или, более конкретно, растение, являющееся индуктором отцовской гаплоидии. В другом аспекте растение, являющееся индуктором отцовской гаплоидии, содержит мутантный ген *ig1* или мутацию CENH3.

[0059] В другом варианте осуществления из зародыша-потомка выращивают растение-потомка. В одном аспекте растение-потомка подвергают возвратному скрещиванию с неподатливым растением маиса в течение по меньшей мере одного поколения. В другом аспекте растение-потомок является женским родительским растением при возвратном скрещивании. В еще одном аспекте растение-потомок сохраняет цитоплазму NA и/или сохраняет ядерный геном неподатливого растения маиса.

[0060] Еще один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ увеличения показателя эффективности трансформации у неподатливой линии растений, включающий: (а) получение неподатливого растения и сбор пыльцы с него; (b) опыление реципиентного растения, содержащего цитоплазму, способную к трансформации, пыльцой от неподатливого растения; (с) получение из него зародыша-

потомка; и (d) необязательно (i) выращивание из ткани-потомка растения-потомка; (ii) возвратное скрещивание растения-потомка с использованием пыльцы от неподатливого растения в ходе по меньшей мере одного скрещивания; и (e) трансформацию ткани, полученной из зародыша-потомка; где ткань-потомок содержит цитоплазму NA и по
 5 меньшей мере ядерный геном неподатливого растения, и где ткань-потомок характеризуется более высоким показателем эффективности трансформации, чем неподатливое растение.

[0061] Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ трансформации растения, включающий: (a) получение множества линий растений; (b)
 10 тестирование в отношении маркеров, указывающих на цитоплазму NA; (c) отбор по меньшей мере одной линии из множества линий растений, где отобранные линии содержат маркеры цитоплазмы NA; и (d) трансформацию клеток, полученных из по меньшей мере одной отобранной линии из стадии (c). В одном аспекте в тесте выявляется нуклеотид G в положении, которое соответствует положению 11 в
 15 последовательности митохондриальной ДНК под SEQ ID NO: 7. В другом аспекте в тесте в отношении маркеров, указывающих на цитоплазму NA, выявляется присутствие последовательности, соответствующей SEQ ID NO: 7. Тест в отношении маркеров, указывающих на цитоплазму NA, необязательно дополнительно предусматривает
 20 прямой праймер под SEQ ID NO: 5 и обратный праймер под SEQ ID NO: 6. В качестве альтернативы тест в отношении маркеров, указывающих на цитоплазму NA, предусматривает зонд под SEQ ID NO: 7 и/или зонд под SEQ ID NO: 8, где зонды дифференциально мечены флуорофорами.

[0062] Эти и другие варианты осуществления изобретения будут более полно поняты в свете следующих неограничивающих примеров.

25

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Способность цитотипа к трансформации и перенос цитотипа.

[0063] Маркеры для проведения различий между цитоплазмами NA, NB и CMS разрабатывали на основе митохондриальных геномов NA и NB, раскрытых в James O. Allen, et al., *Comparisons Among Two Fertile and Three Male-Sterile Mitochondrial*
 30 *Genomes of Maize*, GENETICS 177:1173–1192 (October 2007), включенной в данный документ посредством ссылки. У ста линий было проведено генотипирование

цитоплазмы с использованием молекулярных маркеров, которые позволяют проводить различие между нормальной цитоплазмой и цитоплазмой CMS (набор маркеров 1; SEQ ID NO: 1–4), а затем только с использованием маркера NB (набор маркеров 2; SEQ ID NO: 5–8). В этой ситуации предполагается генотип NA, если набор маркеров 1 является подтверждающим (что означает, что цитотип не представляет собой CMS), а набор маркеров 2 является положительным в отношении альтернативного аллеля (что означает, что цитотип отличается от NB). Одиннадцать предполагаемых линий NA тестировали в отношении частоты трансформации с использованием стандартной процедуры трансформации, например, процедуры, раскрытой в публикации заявки на патент США № 2015/0113681, поданной 23 октября 2013 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Линия NP2222 характеризуется высокой способностью к трансформации и используется в качестве контроля для сравнительного определения частоты трансформации.

Таблица 2. Частота трансформации для отобранных линий маиса с цитоплазмой NA.

| Сорт | Сумма всех событий, N | Среднее значение частоты трансформации | Регион | Гетерозисный пул |
|-----------|-----------------------|--|----------------|------------------|
| Линия 1 | 0 | 0 (n = 1) | Умеренный | Stiff Stalk |
| Линия 2 | 0 | 0 (n = 1) | Умеренный | Stiff Stalk |
| Линия 3 | 2 | 0,32 (n = 2) | Умеренный | Stiff Stalk |
| Линия 4 | 4 | 0,7 (n = 2) | Умеренный | Stiff Stalk |
| Линия 5 | 2 | 0,8 (n = 1) | Умеренный | Stiff Stalk |
| Линия 6 | 13 | 1,3 (n = 4) | Умеренный | Stiff Stalk |
| Линия 7 | 25 | 4,3 (n = 2) | Умеренный | Stiff Stalk |
| Линия 8 | 25 | 6,25 (n = 1) | Умеренный | Iodent |
| Линия 9 | 62 | 6,8 (n = 3) | Умеренный | Stiff Stalk |
| Линия 10 | 610 | 50,1 (n = 3) | Умеренный | Stiff Stalk |
| Линия 11 | 455 | 51,7 (n = 3) | Умеренный | Stiff Stalk |
| NP2222 | 315 | 31,8 (n = 5) | Умеренный | Stiff Stalk |
| Линия 17* | 0 | 0 (n = 1) | Умеренный | Смешанный |
| Линия 18* | 34 | 6,8 (n = 2) | Субтропический | Suwan |

*Линии 17 и 18 тестировали во втором анализе, проведенном отдельно.

Таблица 3. Линии NB и реципрочные скрещивания с NP2222.

| | Сорт | Цитотип | Всего событий | Среднее значение частоты трансформации |
|----------------------|--|---------|---------------|--|
| Группа скрещивания 1 | Линия 12 | NB | 0 | 0,0 |
| | Потомство от скрещивания линия 12 x NP2222 | NB | 7 | 4,4 |
| | Потомство от скрещивания NP2222 x линия 12 | NA | 9 | 4,1 |
| Группа скрещивания 2 | Линия 13 | NB | 0 | 0,0 |
| | Потомство от скрещивания линия 13 x NP2222 | NB | 1 | 0,4 |
| | Потомство от скрещивания NP2222 x линия 13 | NA | 3 | 0,8 |
| Группа скрещивания 3 | Линия 14 | NB | 9 | 4,5 |
| | Потомство от скрещивания линия 14 x NP2222 | NB | 89 | 40,5 |
| | Потомство от скрещивания NP2222 x линия 14 | NA | 92 | 46,0 |
| Группа скрещивания 4 | Линия 15 | NB | 0 | 0,0 |
| | Потомство от скрещивания линия 15 x NP2222 | NB | 18 | 9,0 |
| | Потомство от скрещивания NP2222 x линия 15 | NA | 23 | 10,3 |
| Группа скрещивания 5 | Линия 16 | NB | 0 | 0,0 |
| | Потомство от скрещивания линия 16 x NP2222 | NB | 103 | 28,6 |
| | Потомство от скрещивания NP2222 x линия 16 | NA | 71 | 22,5 |

[0064] При скрещивании реципиентная линия (т. е. женское родительское растение) указывается первой, а донор пыльцы (т. е. мужское родительское растение) указывается вторым. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что родительское растение NP2222 также передает некоторый другой ядерный генетический фактор, который улучшает способность потомства к трансформации. Считается, что существующие протоколы трансформации отдадут предпочтение NP2222 и

происходящим от него линиям. Даже в этом случае улучшение на 6% (например, в группе скрещивания 3) является значительным улучшением способности к трансформации и при этом удивительно хорошим улучшением.

5 **[0065]** При введении цитоплазмы NA в потомство показатель трансформации значительно повышается у большинства линий по сравнению с неподатливым родительским растением, имеющим цитотип NB. Даже небольшое увеличение показателя трансформации, т. е. от 0,0% до 0,8%, является значительным улучшением по сравнению с неспособностью цитотипа NB к трансформации.

Пример 2. *ig1*-опосредованный перенос цитотипа.

10 **[0066]** Маис с мутантным геном *indeterminate gametophyte1 (ig1)* производит потомство с материнской и отцовской гаплоидией с частотой 1-10% (Kindinger 1994). Способную к трансформации линию NA скрещивали с индивидуумом, гетерозиготным по *ig1*, генотипировали с помощью ПЦР для идентификации гетерозиготных носителей и подвергали самоопылению для создания NA-варианта запаса *ig1*. Потомство F2
15 генотипировали с помощью ПЦР, а индивидуумов, гомозиготных по мутантному *ig1*, опыляли линией 13. Одно растение с отцовской гаплоидией идентифицировали и опыляли рекуррентным родительским растением из линии 13. Тесты трансформации нормального цитотипа В в нормальный цитотип А были неудачными.

Пример 3. Отсутствие пагубного влияния на урожайность.

20 **[0067]** Эффект цитотипа в отношении урожайности гибридов оценивали путем реципрокного скрещивания линий 7, 9, 10, 11 и NP2222 с тестерами с нормальным цитотипом В и выращивания потомства в примерно 10 местоположениях для
25 испытания урожайности. У гибридного потомства, полученного в результате реципрокного скрещивания, не были обнаружены очевидные фенотипические различия, и между гибридами, местоположениями или какими-либо эффектами взаимодействия не наблюдались статистически значимые различия. Этот полученный
30 результат позволяет предположить, что цитотип является отличительным свойством, которое, как ожидается, не будет влиять на какое-либо очевидное отличительное свойство растения, и дополнительно иллюстрирует на примере значимость дифференциального эффекта в отношении трансформационной компетентности.

[0068] Хотя настоящее изобретение было описано достаточно подробно, возможны и другие варианты. Следовательно, сущность и объем прилагаемой формулы изобретения не должны ограничиваться описанием вариантов, содержащихся в данном документе.

[0069] Все признаки, раскрытые в настоящем описании, могут быть заменены
5 альтернативными признаками, служащими для той же, эквивалентной или аналогичной цели, если явно не указано иное. Таким образом, если явно не указано иное, каждый раскрытый признак является только одним примером из общего ряда эквивалентных или аналогичных признаков.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ увеличения показателя эффективности трансформации у неподатливой линии маиса, включающий:
 - 5 a. получение неподатливого растения маиса и сбор пыльцы с него;
 - b. опыление реципиентного растения маиса, содержащего нормальную цитоплазму А ("NA"), пыльцой от неподатливого растения маиса; и
 - c. получение из него зародыша-потомка;где зародыш-потомок содержит цитоплазму NA и по меньшей мере ядерный геном
10 неподатливого растения маиса, и где зародыш-потомок характеризуется более высоким показателем эффективности трансформации, чем неподатливое растение маиса.

2. Способ придания способности к трансформации неподатливой линии маиса, включающий:
 - 15 a. получение неподатливого растения маиса и сбор пыльцы с него;
 - b. опыление реципиентного растения маиса, содержащего нормальную цитоплазму А ("NA"), пыльцой от неподатливого растения маиса; и
 - c. выращивание из него растения-потомка;где растение-потомок содержит цитоплазму NA и ядерный геном неподатливого
20 растения маиса, и где растение-потомок является способным к трансформации.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где неподатливое растение маиса содержит цитоплазму, отличную от NA.

- 25 4. Способ по п. 3, где цитоплазма, отличная от NA, выбрана из группы, состоящей из нормальной цитоплазмы В ("NB"), цитоплазмы С с цитоплазматической мужской стерильностью ("С" или "CMS-C"), цитоплазмы S с цитоплазматической мужской стерильностью ("S" или "CMS-S") или цитоплазмы Т с цитоплазматической мужской стерильностью ("Т" или "CMS-T").
30

5. Способ по п. 1 или п. 2, где реципиентное растение маиса представляет собой растение, являющееся индуктором гаплоидии.

6. Способ по п. 5, где растение, являющееся индуктором гаплоидии, представляет собой растение, являющееся индуктором материнской гаплоидии.
7. Способ по п. 6, где растение, являющееся индуктором материнской гаплоидии,
5 содержит мутантный ген *igl* или ген *Matrilineal*.
8. Способ по п. 6, где растение, являющееся индуктором гаплоидии, представляет собой растение, являющееся индуктором отцовской гаплоидии.
- 10 9. Способ по п. 6, где растение, являющееся индуктором отцовской гаплоидии, содержит мутацию *SENH3*.
10. Способ по п. 1, где из зародыша-потомка выращивают растение-потомка.
- 15 11. Способ по п. 2 или п. 10, где растение-потомка подвергают возвратному скрещиванию с неподатливым растением маиса в течение по меньшей мере одного поколения.
12. Способ по п. 11, где растение-потомок является женским родительским
20 растением при возвратном скрещивании.
13. Способ по п. 11, где растение-потомок сохраняет цитоплазму NA.
14. Способ по п. 11, где растение-потомок сохраняет ядерный геном неподатливого
25 растения маиса.
15. Способ увеличения показателя эффективности трансформации у неподатливой линии растений, включающий:
- 30 a. получение неподатливого растения и сбор пыльцы с него;
- b. опыление реципиентного растения, содержащего цитоплазму, способную к трансформации, пыльцой от неподатливого растения;
- c. получение из него зародыша-потомка; и
- d. необязательно

- i. выращивание из ткани-потомка растения-потомка;
 - ii. возвратное скрещивание растения-потомка с использованием пыльцы от неподатливого растения в ходе по меньшей мере одного скрещивания; и
 - e. трансформацию ткани, полученной из зародыша-потомка;
- 5 где ткань-потомок содержит цитоплазму NA и по меньшей мере ядерный геном неподатливого растения, и где ткань-потомок характеризуется более высоким показателем эффективности трансформации, чем неподатливое растение.
16. Растение, полученное посредством способа по пп. 1, 2 или п. 15.
- 10
17. Способ трансформации растения, включающий:
- a. получение множества линий растений;
 - b. тестирование в отношении маркеров, указывающих на цитоплазму NA;
 - c. отбор по меньшей мере одной линии из множества линий растений, где
- 15 отобранные линии содержат маркеры цитоплазмы NA; и
- d. трансформацию клеток, полученных из по меньшей мере одной отобранной линии из стадии (c).
18. Способ по п. 17, где в тесте выявляют нуклеотид G в положении, которое
- 20 соответствует положению 11 в последовательности митохондриальной ДНК под SEQ ID NO: 7.
19. Способ по п. 18, где в тесте в отношении маркеров, указывающих на цитоплазму NA, выявляют присутствие последовательности, соответствующей SEQ ID NO: 7.
- 25
20. Способ по пп. 17–19, где тест в отношении маркеров, указывающих на цитоплазму NA, предусматривает прямой праймер под SEQ ID NO: 5 и обратный праймер под SEQ ID NO: 6.
- 30
21. Способ по п. 20, где тест в отношении маркеров, указывающих на цитоплазму NA, предусматривает зонд под SEQ ID NO: 7 и/или зонд под SEQ ID NO: 8.
22. Способ по п. 21, где зонды дифференциально мечены флуорофорами.