(43)

**2022.02.22 (22)** Дата подачи заявки

Дата публикации заявки

(22) Дата подачи заявки 2020.05.13 (51) Int. Cl. C12Q 1/68 (2018.01) A01H 1/04 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)

## (54) ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТЬ У КУКУРУЗЫ

- (31) 19174242.8; 19201403.3; 20163676.8
- (32) 2019.05.13; 2019.10.04; 2020.03.17
- (33) EP
- (86) PCT/EP2020/063317
- (87) WO 2020/229533 2020.11.19

**(72)** Изобретатель:

Урбани Клауде, Оузунова Милена, Престерль Томас, Шойерманн Даниэла, Шон Крис-Каролин, Альтер Свенья, Аврамова Виктория, Бауэр Ева, Грессет Себастиан (DE)

- (74) Представитель: Зуйков С.А. (RU)
- (57) Настоящее изобретение относится к аллелю QTL кукурузы, ассоциированному с засухостойкостью и изотопным составом углерода, а также к специфическим маркерным аллелям, ассоциированным с аллелем QTL. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам идентификации растений кукурузы на основе скрининга на присутствие аллеля QTL или маркерных аллелей. Настоящее изобретение также относится к способам модификации засухостойкости и изотопного состава углерода в растениях кукурузы.

## ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТЬ У КУКУРУЗЫ

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к локусам количественных признаков (QTL) и к ассоциированным маркерам, которые участвуют и/или ассоциированы с засухоустойчивостью, к изотопному составу углерода, устьичным параметрами и к агрономической продуктивности растений и частей растений, таких как кукуруза. Настоящее изобретение дополнительно относится к использованию таких QTL или маркеров для целей идентификации и/или отбора, а также для трансгенных или нетрансгенных растений.

## ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Стресс от засухи является одним из наиболее серьезных естественных ограничений производительности в сельскохозяйственных системах по всему миру. С изменением климата, сельскохозяйственные культуры будут подвергаться более частым эпизодам засухи и воздействию высокой температуры, которые препятствуют росту и развитию растений на всех стадиях (МГЭИК (Межправительственная группа экспертов по изменению климата), 2014). В частности, когда такие условия влияют на развитие растений до, во время и после цветения, снижение продуктивности и урожайности растений почти неизбежно. Селекция засухоустойчивых сортов сельскохозяйственных культур является неотложным приоритетом для решения вышеупомянутых экологических проблем и предоставления фермерам сельскохозяйственных культур, подходящих для устойчивых производственных систем.

Грессе и соавт. (2014. Дискриминация стабильных изотопов углерода находится под генетическим контролем у кукурузы вида С4 с несколькими геномными областями, влияющими на уровень экспрессии признака. Журнал Plant Physiology, 164(1), 131-143) сообщили об анализе патентованной библиотеки интрогрессивных линий (IL) кукурузы (Zea mays L.), происходящей от двух инбредных линий KWS SAAT SE, полученных от линии европейской элитной кукурузы зубовидной, использованной в качестве рекуррентного родителя (RP,) и линии кукурузы кремнистой, использованной в качестве родителя-донора (DP), с целью выявления потенциального генетического контроля за изотопным составом углерода (δ13С). В полевых и тепличных условиях у δ13С была обнаружена в высоконаследуемая значимая генетическая изменчивость. В результате оценки 77 линий IL, авторы изобретения смогли идентифицировать 22 геномные области,

отрицательно влияющие на  $\delta 13$ С. Представлялось, что две его целевые области, расположенные на хромосомах 6 и 7, имеют особую значимость (Фигура 1A).

Изотопный состав углерода можно использовать в качестве механизма для получения информации о коэффициенте транспирации у видов СЗ (Фаркуар и соавт., 1989. Дискриминация изотопов углерода и фотосинтез. Annual review of plant biology, 40(1), 503-537). Несколько исследований, проведенных с видом С4, показали отрицательную корреляцию между б13С и эффективностью водопотребления (WUE; Хендерсон и соавт., 1998. Корреляция между дискриминацией изотопов углерода и коэффициентом транспирации в линиях двухцветного сорго вида С4 в тепличных и полевых условиях. Functional Plant Biology, 25(1), 111-123; Деркон и соавт., 2006. Дифференциальная дискриминация изотопов 13 С в кукурузе при водном стрессе разного уровня и при наличии азота от низкого до высокого уровня. Plant and Soil, 282(1-2), 313-326; Шервуд и соавт., 2014. Фотосинтетическая гибкость кукурузы, подверженной воздействию солености и тени. Јоигпаl оf ехрегіmental botany, 65(13), 3715-3724.), которая определяется как количество биомассы или урожайность, аккумулированная на единицу потребленной воды.

(2019. Изотопный состав углерода, Аврамова И соавт. эффективность водопотребления и чувствительность к засухе контролируются в кукурузе общим геномным сегментом. Theoretical and Applied Genetics, 132:53-63) дополнительно проанализировали почти изогенные линии, описанные в работе Грессе и соавт. 2014, несущие перекрывающиеся донорские сегменты на хромосоме 7. Были разработаны две почти изогенные линии, NIL A и NIL B, посредством скрещиваний между линиями из библиотеки интрогрессивных линий. Генотипический анализ с использованием Массива генотипирования кукурузы, 600 К, Ахіоттм (Унтерзеер и соавт., 2014. Мощный анализа кукурузы: инструмент для геномного разработка и оценка массива генотипирования однонуклеотидного полиморфизма (SNP), 600 K, высокой плотности. BMC Genomics, 15:823) показал, что обе NIL несут геномный сегмент, полученный от DP на хромосоме 7, который, как было подтверждено, значительно увеличивает ядро  $\delta 13$ С, по сравнению с RP. Авторы изобретения предположили, что сегмент интрогрессии на хромосоме 7 (110,76-166,10 Млн.п.о. ), переносимый NIL В (Фигура 1С), содержит несколько QTL, которые отрицательно влияют на различные признаки и оказывают кумулятивное влияние на отдельные признаки. Предположение о влиянии QTL на отдельные признаки сделано на основе NIL A (Фигура 1B), содержащей меньший сегмент на хромосоме 7, по сравнению с NIL B, и у которой QTL оказывают менее выраженное влияние на измеряемые параметры. Кроме того, NIL A содержит второй большой сегмент

на хромосоме 2, где расположен ранее идентифицированный QTL для δ13C (Грессе и соавт. 2014), который может изменить действие интрогрессии на хромосоме 7.

В исследовании, описанном Альваресом Прадо и соавт. (2018. Феномика позволяет идентифицировать геномные области, отрицательно влияющие на устьичную проводимость у кукурузы, с условным действием дефицита воды и потребности в испарении. Plant, cell & environment, 41(2), 314-326.), три дополнительных QTL, отрицательно влияющих на устьичную проводимость у всего растения (два с положительным и один с отрицательным действием), были идентифицированы в той же геномной области, которая описана в работе Аврамовой и соавт. (124,35-160,14 Млн.п.о.), на хромосоме 7 в панели разнообразия кукурузы.

Несмотря на то, что области на хромосоме 7 у кукурузы интенсивно изучались в свете отрицательного влияния на изотопный состав углерода, устьичные параметры и агрономическую продуктивность, внимание зачастую было в большей степени направлено на фенотипические аспекты и физиологические параметры, чем на геномную природу. Было обнаружено несколько QTL, влияющих на засухоустойчивость частично положительно и частично отрицательно. Взаимодействие между этими QTL еще недостаточно изучено и до конца не понято. Кроме того, геномная область, исследованная Аврамовой и соавт. 2019, и предположительно несущая несколько соответствующих QTL, размером более 20 млн.п.о, является довольно большой, а доступность подходящих молекулярных маркеров очень ограничена, поэтому до сих пор этот признак неэффективно используется в селекции и разработке растений. Существует необходимость в характеристике геномов небольших геномных областей или каузативных генов, а также молекулярных маркеров, позволяющих отслеживать эти геномные области или гены в процессе селекции и интрогрессировать их в новую элитную линию, возможно без прикрепленного сцепленного груза.

Поэтому целью настоящего изобретения является устранение, по меньшей мере, одного недостатка предшествующего уровня техники. Существует постоянная потребность в повышении засухостойкости кормовых культур, а также в идентификации растений, в том числе конкретных частей растений или их производных, обладающих измененной засухостойкостью. В частности, целью настоящего изобретения является предложение новых основных QTL, в том числе, для засухостойкости и ассоциированных с ней параметров, таких как изотопный состав углерода, устьичные параметры и агрономическая продуктивность, а также каузативный ген (гены), и предложение маркеров, которые позволяют экономно использовать эти QTL в разработке и селекции кукурузы.

## КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано на идентификации QTL, способствующего генетической вариации, в том числе, при стабильном изотопном составе углерода, устьичной проводимости и продуктивности растений в условиях засухи.

Настоящее изобретение, в частности, относится к способам идентификации растения или части растения кукурузы, содержащим скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7, при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем специфические молекулярные маркеры. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, аллель QTL содержит молекулярные маркеры А и/или В, при этом, молекулярные маркеры А и В представляют собой SNP (однонуклеотидные полиморфизмы), которые представляют собой, соответственно, С, соответствующий положению 125861690, и А, соответствующий положению 126109267, или которые, представляют собой, соответственно, соответствующий положению 125861690, и G, соответствующий положению 126109267, см. эталонный геном AGPv2 B73. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами А и/или В. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, указанный аллель QTL содержит молекулярные маркеры C, D, E и/или F, при этом, молекулярные маркеры C, D, E и F представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, соответствующий положению 125976029, А, соответствующий положению 127586792, С, соответствующий положению 129887276, и С, соответствующий положению 130881551, или которые представляют собой, соответственно, G, соответствующий положению 125976029, G, соответствующий положению 127586792, T, соответствующей положению 129887276, и T, соответствующей положению 130881551, см. эталонный геном AGPv2 B73. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами А и/или F.

Настоящее изобретение также относится к описанным маркерам и маркерным аллелям, и полинуклеиновым кислотам, подходящим для определения маркеров и маркерных аллелей, таких как праймеры и зонды, и к содержащим их наборам. Настоящее изобретение также относится к способам модификации засухостойкости или засухоустойчивости растений, в частности, путем естественного или искусственного введения в растения и/или отбора растений, содержащих QTL (аллель) и/или маркеры, или маркерные аллели, описанные в настоящем документе, а также модификации уровня

экспрессии генов или активности генов среди генов, содержащихся в QTL (аллеле), в соответствии с настоящим изобретением, как определено в настоящем документе. Настоящее изобретение также относится к растениям, содержащим QTL (аллель) и/или маркеры, или маркерые аллели, в соответствии с настоящим изобретением, как определено в настоящем документе.

Настоящее изобретение, в частности, позволяет использовать молекулярные маркеры для получения представления о состоянии генома

- i) QTL, размером 5,02 млн.п.о., находящегося между фланкирующими маркерами 7 (125,861,690 пар оснований (п.о.)) и 11 (130,881,551 п.о.) на хромосоме 7, отрицательно влияющего на  $\delta$ 13С и устьичные параметры,
- іі) усеченной части этого QTL, размером 248 т.п.о., находящегося в диапазоне от маркера 7 (125,861,690 п.о.) до маркера 8b (126,109,267 п.о.), оказывающего определенное влияние на параметры газообмена,

и осуществления отбора на основе генного картирования, соответствующего интервалу размером 5,02 млн.п.о. Корреляции генотипа/фенотипа интрогрессивных линий с сегментами родителя-донора (DP) и рекуррентного родителя (RP) позволяют фактически установить и изменить изотопный состав углерода, режим реакции устьичных параметров и уровень экспрессии агрономической продуктивности в идиоплазме. В этом аспекте, в сценарии умеренного стресса, донорская интрогрессия может быть использована для поддержания устьичной проводимости на повышенных уровнях даже при водном стрессе. Таким образом, достигается длительный фотосинтез и некоторое преимущество в росте после восстановления, что улучшает агрономическую продуктивность и урожайность. Кроме того, эта информация также может быть использована для интрогрессии аллелей DP с целью содействия более быстрому ответу на засуху в подверженной засухе идиоплазме.

В целом, настоящее изобретение позволяет использовать маркерную информацию для характеристики материала по устьичным параметрам, изотопному составу углерода, эффективности водопотребления и продуктивности в условиях засухи. Соответственно, использование одной маркерной информации, а также сгруппированной информации, приводящей к информации о гаплотипах, является основой для быстрой, точной и улучшенной классификации генетического материала в ходе общего процесса отбора.

Наконец, аллельная изменчивость на уровне гена-кандидата может быть использована для улучшения вышеупомянутых фенотипов либо путем модуляции уровня экспрессии генов-кандидатов, модификации молекулярной активности таких генов и

продуктов генов, либо путем генерирования любых аллельных версий, полученных от таких генов.

Настоящее изобретение, в частности, охватывается любым одним или любой комбинацией, по меньшей мере, одного из приведенных ниже утверждений, пронумерованных от 1 до 25, с любым другим утверждением и/или вариантами осуществления настоящего изобретения.

- [1] Способ идентификации растения или части растения кукурузы, содержащий скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7, при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры (аллели) А и/или В, при этом, молекулярные маркеры (аллели) А и В представляют собой SNP, которые, представляют собой, соответственно, С, соответствующий положению 125861690, и А, соответствующий положению 126109267, или которые, представляют собой, соответственно, Т, соответствующий положению 125861690, и G, соответствующий положению 126109267, см. эталонный геном АGPv2 B73.
- [2] Способ по утверждению 1, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами (аллелями) А и/или В, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, обоими, необязательно, при этом, указанный аллель QTL содержит молекулярные маркеры (аллели) А и/или В, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, оба.
- [3] Способ по любому из утверждений 1-2, при этом, указанный аллель QTL содержит молекулярные маркеры (аллели) С, D, E и/или F, при этом, молекулярные маркеры (аллели) С, D, E и F представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, A, соответствующий положению 125976029, A, соответствующий положению 127586792, C, соответствующий положению 129887276, и C, соответствующий положению 130881551, или которые представляют собой, соответственно, G, соответствующий положению 125976029, G, соответствующий положению 127586792, T, соответствующей положению 129887276, и T, соответствующей положению 130881551, см. эталонный геном AGPv2 B73.
- [4] Способ по утверждению 3, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами A и/или B, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, обоими, необязательно, при этом, указанный аллель QTL содержит молекулярные маркеры (аллели) A и/или F, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, оба.

- [5] Способ по любому из утверждений 1-4, при этом, скрининг на присутствие указанного аллеля QTL содержит идентификацию любого, по меньшей мере, одного из молекулярных маркеров A и B.
- [6] Способ по любому из утверждений 3-5, при этом, скрининг на присутствие указанного аллеля QTL содержит идентификацию любого, по меньшей мере, одного из молекулярных маркеров A, B, C, D, E и F.
- [7] Способ по любому из утверждений 3-5, при этом, скрининг на присутствие указанного аллеля QTL содержит определение уровня экспрессии, активности и/или последовательности, по меньшей мере, одного гена, расположенного в QTL, как определено в любом из утверждений 1-6.
- [8] Способ идентификации растения или части растения кукурузы, содержащий определение уровня экспрессии, активности и/или последовательности, по меньшей мере, одного гена, расположенного в QTL, как определено в любом из утверждений 1-6.
- [9] Способ по любому из утверждений 7 или 8, дополнительно содержащий сравнение уровня экспрессии и/или активности указанного, по меньшей мере, одного гена с заданным пороговым значением.
- [10] Способ по любому из утверждений 7-9, дополнительно содержащий сравнение уровня экспрессии и/или активности указанного, по меньшей мере, одного гена в условиях контроля и в условиях стресса от засухи.
- [11] Способ идентификации растения кукурузы, содержащий изменение уровня экспрессии и/или активности, по меньшей мере, одного гена, расположенного в QTL, как определено в любом из утверждений 1-6.
- [12] Способ по любому из утверждений с 7-11, при этом, указанный, по меньшей мере, один ген выбран из Abh4, CSLE1, WEB1, RMZM2G397260 и Hsftf21, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, из Abh4.
  - [13] Способ по утверждению 12, при этом, Abh4 выбран из
- (i) нуклеотидной последовательности, содержащей или состоящей из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9 или 18;
- (ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 11, 14, 17 или 20;
- (iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, 15 или 21;

- (iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9, 11, 14, 17, 18 или 20;
- (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12, 15 или 21;
- (vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и
- (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты;

#### CSLE1 выбран из

- (i) нуклеотидной последовательности, содержащей или состоящей из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или 4;
- (ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 2 или 5;
- (iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или 6;
- (iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, 2, 4 или 5;

- (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3 или 6;
- (vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и
- (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты;

## WEB1 выбран из

- (i) нуклеотидной последовательности, содержащей или состоящей из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24 или 27;
- (ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 25 или 28;
- (iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26 или 29;
- (iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24, 25, 27 или 28;
- (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 26 или 29;

- (vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и
- (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты;

## GRMZM2G397260 выбран из

- (i) нуклеотидной последовательности, содержащей или состоящей из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 32;
- (ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 33;
- (iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34;
- (iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32 или 33;
- (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 34;
- (vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и
- (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты;

## Hsftf21 выбран из

- (i) нуклеотидной последовательности, содержащей или состоящей из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36 или 39;
- (ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 37 или 40;
- (iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38 или 41;
- (iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 36, 37, 39 или 40;
- (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 38 или 41;
- (vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и
- (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты.
- [14] Способ генерирования растения кукурузы, содержащий введение в геном растения аллеля QTL, как определено в любом из утверждений 1-6.
- [15] Способ получения части растения кукурузы, содержащий (а) предложение первого растения кукурузы, имеющего аллель QTL или, по меньшей мере, один молекулярный маркер, как определено в любом из утверждений 1-6, (b) скрещивание указанного первого растения кукурузы со вторым растением кукурузы, (c) отбор потомков

растений, имеющих указанный аллель QTL или указанный, по меньшей мере, один молекулярный маркер, и (d) сбор указанной части растения среди указанного потомства.

- [16] Способ по любому из утверждений 1-15, при этом, указанный QTL ассоциирован с засухостойкостью или засухоустойчивостью и/или с δ13C.
- [17] Способ по любому из утверждений 1-16, при этом, указанный QTL отрицательно влияет на устьичные параметры и/или параметры газообмена.
- [18] Способ по любому из утверждений 1-17, при этом, указанный QTL отрицательно влияет на эффективность (внутреннего или во всем растении) водопотребления, устьичную проводимость, скорость нетто-ассимиляции СО<sub>2</sub>, транспирацию, устьичную плотность, содержание ABA (в листьях), чувствительность роста (листьев) к засухе, потребность в испарении и/или состояние почвенной воды, и/или фотосинтетический ответ.
- [19] Растение или часть растения кукурузы, содержащая аллель QTL и/или, по меньшей мере, один молекулярный маркер, как определено в любом из утверждений 1-18.
- [20] Растение или часть растения из утверждения 19, при этом, указанное растение получено от растения, содержащего указанный аллель QTL или маркерные аллели, полученные путем интрогрессии.
- [21] Растение или часть растения из утверждения 19 или 20, при этом, растение является трансгенным или генетически отредактированным.
- [22] Способ, растение или часть растения из любого из предыдущих утверждений, при этом, упомянутая часть растения не представляет собой материал для размножения.
- [23] Выделенная полинуклеиновая кислота, специфически гибридизующаяся с геномной нуклеотидной последовательностью кукурузы, содержащей любой, меньшей мере, один из молекулярных маркеров A, B, C, D, E и F, или ее комплемент, или обратный комплемент.
- [24] Выделенная полинуклеиновая кислота из утверждения 23, которая представляет собой праймер или зонд, способный специфически обнаруживать аллель QTL или любой, меньшей мере, один молекулярный маркер, как определено в любом из утверждений 1-6.
- [25] Выделенная полинуклеиновая кислота, содержащая и/или фланкированная, по меньшей мере, одним из молекулярных маркеров A, B, C, D, E или F.

# КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Фигура 1. Графические генотипы IL-005 (Фигура 1A), NIL A (Фигура 1B) и NIL В (Фигура 1C). Показаны хромосомы (Chr) и центромеры (центромера) с распределением маркеров и вызовы соответствующих RP (черный) и DP (серый). Физические координаты относятся к AGPv02. Подробные данные получены из массива 600 К.

Фигура 2. Обзор размера и состояния интрогрессии хромосомы 7 в IL-005, NIL A и NIL B, и значимого интервала, как сообщается в работе Грессе и соавт. (2014). Нижний трек показывает общее распределение 600 маркеров (черные полосы) и моделей генов (ген) на хромосоме 7 AGPv02 кукурузы. Показан размер интрогрессии (донор-мишень) в ILs с количеством маркеров в состоянии DP (вызовы DP), а также соответствующее количество моделей генов в пределах интрогрессии. Верхний трек дает общее представление о молекулярном состоянии мишени, о котором сообщалось в работе Грессет и соавт. (2014).

Фигура 3. Обзор процесса отбора вновь сгенерированных рекомбинантов. Маркеры KASP (KASP - конкурентная аллель-специфическая ПЦР) показаны вертикальными оранжевыми линиями и точками с соответствующими названиями. Возможные события рекомбинации, которые были обнаружены во время скрининга, представлены черными/серыми ступеньками.

Фигура 4. Идентифицированные рекомбинанты и молекулярное состояние QTL. На графике представлены рекомбинанты с их соответствующими названиями. Изображены интервалы последовательности с размером и состоянием, относящиеся к гомозиготному RP (черный) и гомозиготному DP (серый). Целевой интервал размером 5,02млн.п.о.обрамлен двумя линиями (стрелками).

Фигура 5. Экспрессия гена ZmAbh4 (все транскрипты вместе) и транскриптов Т01 и Т03 по отдельности у обильно политых (контроль; С), находящихся в условиях засухи (D) и повторно политых растений (R). Экспрессию гена сравнивали между рекуррентным родителем (генотип RP) и почти изогенной линией (генотип NIL B), несущей аллель родителя-донора гена. Был проведен двусторонний анализ ANOVA (дисперсионный анализ) для оценки значимых различий между генотипами, методами обработки и взаимодействием между ними в отношении уровня экспрессии всех транскриптов ZmAbh4 вместе, и P-значения отображены под первой панелью. Nd: не обнаружено

**Фигура 6.** Химическая реакция, катализируемая Abh4. Фигура взята из работы Сайто и соавт. (2004). Гены CYP707As Arabidopsis кодируют (+)-абсцизовой кислоты 8'-гидроксилазу, ключевой фермент в окислительном катаболизме абсцизовой кислоты. Plant Physiol. 134 (4): 1439–1449.. Гены CYP707As Arabidopsis кодируют (+)-абсцизовой кислоты

8'-гидроксилазу, ключевой фермент в окислительном катаболизме абсцизовой кислоты. Plant Physiol. 134 (4): 1439–1449.

**Фигура 7.** Соотношение продуктов (PA - фазовой кислоты, PA - дигидрофазовой кислоты) к субстрату (ABA - абсцизовой кислоте) реакции, катализируемой Abh4, для рекомбинантов из Фигуры 4. Изображены интервалы последовательности с размером и состоянием, относящимися к гомозиготному RP (темно-серый) и гомозиготному DP (светло-серый). Отображены координаты AGPv02. Перекрывающийся интервал для рекомбинантов с одинаковым фенотипом заключен в рамку. Было проведено сравнение LSD (LSD - минимально значимое различие) между RP и каждым рекомбинантом (N = 10), и \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001.

**Фигура 8.** Соотношение продуктов (PA - фазовой кислоты, PA - дигидрофазовой кислоты) к субстрату (ABA - абсцизовой кислоте) реакции, катализируемой *Abh4*, для линий TILLING (TILLING - нацеливание на индуцированные локальные повреждения в геномах), несущих мутации P377L (377mut) или G453E (453mut) и их соответствующие дикие типы (377WT, 453WT), а также для гетерозиготных растений для мутации G453E (453het) и инбредной линии, используемой для генерации мутантов, PH207. N = 7-12. \* p < 0.05

**Фигура 9.** Дискриминация изотопов углерода ( $\Delta^{13}$ C) последнего развитого листа линий TILLING, несущих мутации P377L (377mut) или G453E (453mut) и их соответствующие дикие типы (377WT, 453WT), а также гетерозиготных растений для мутации G453E (453het) и PH207. N = 8-12

**Фигура 10.** А. Устьичная проводимость ( $g_s$ ) и В. Эффективность мгновенного водопотребления (iWUE), измеренная для Мо17, В73, РН207 и трех NIL с фоном Мо17, и интрогрессированных сегментов, происходящих от В73 на хромосоме 7 (m031, m007, m046; Эйхтен и соавт. 2011). Цветовое кодирование, зависимое от аллеля Abh4, переносимого линией. N = 10-11. Значимые различия (p < 0.05) отмечены дискретными буквами.

**Фигура 11.** А. Соотношение продуктов (РА - фазовой кислоты, РА - дигидрофазовой кислоты) к субстрату (АВА - абсцизовой кислоте) реакции, катализируемой ZmAbh4 для PH207, B73 и двух NIL с фоном B73, и интрогрессированных сегментов, происходящих от Mo17 на хромосоме 7 (b004, b102; Эйхтен и соавт. 2011). ). N = 12 В. Устьичная проводимость ( $g_s$ ) и С. Эффективность мгновенного водопотребления (iWUE), измеренная для B73, PH207 и двух NIL. N = 13-14. Цветовое кодирование, зависимое от аллеля Abh4, переносимого линией. Значимые различия (p < 0.05) отмечены дискретными буквами.

**Фигура 12.** ABA и ее катаболиты PA, DPA и ABA-Glc в поколении T1 мутантов CRISPR/Cas9, выращенных в теплице. Концентрации в листьях растений, несущих две мутантные копии ZmAbh4 (мутант, n = 3), в сравнении с растениями, несущими две копии дикого типа (WT, n = 4) ZmAbh4 (среднее значение  $\pm$  SD (стандартное отклонение)).

**Фигура 13.** Измерения газообмена листа 6 (V6) мутантов CRISPR/Cas9 в поколении T1, выращенном в теплице. Были измерены линия дикого типа B104 (n = 17), сибсы дикого типа мутантных растений (WTsib, n = 5), растения, показывающие мутацию в ZmAbh4, но не в ZmAbh1 (zmabh4, n = 9), и растения, показывающие мутацию в обоих генах, ZmAbh4 и ZmAbh1 (zmabh4, zmabh1, n = 15). Многократная коррекция испытаний отсутствовала из-за высокой гетерогенности в T1.

**Фигура 14.** Сравнение почти изогенной линии В (NIL В) и девяти рекомбинантных NIL (D-L) с их рекуррентным родителем (RP) в рамках эффективности водопотребления всего растения (WUE<sub>plant</sub>). Каждая NIL несет интрогрессию (отмеченную темно-серым цветом) от кремнистого родителя-донора на генетическом фоне зубовидного RP (светлосерого цвета). Начиная с одинакового количества почвы и воды в горшках, растения помещали в условия постепенного высыхания почвы. Испарение воды через поверхность почвы предотвращали посредством пластикового укрытия горшков. Конечную сухую биомассу измеряли в конце эксперимента, когда растения прекращали расти, и WUE<sub>plant</sub> рассчитывали как соотношение между конечной сухой биомассой и потребленной водой. Данные представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (n=10). Значимые различия между RP и каждой из NIL, основанные на тесте Даннета, обозначены полосами темно-серого цвета (светло-серые полосы не обозначают значимых различий с RP). Черная квадратная рамка указывает на целевую область генома, связанную с этим признаком. Координаты, указанные в последней строке, соответствуют B73 v4 (www.maizegdb.org).

**Фигура 15.** Сравнение почти изогенной линии В (NIL В) и девяти рекомбинантных NIL (D-L) с их рекуррентным родителем (RP) в рамках эффективности внутреннего водопотребления растения (*i*WUE). Каждая NIL несет интрогрессию (отмеченную темносерым цветом) от кремнистого родителя-донора на генетическом фоне зубовидного RP (светло-серого цвета). Были проведены измерения газообмена листьев на полностью развитом листе 5 на стадии развития V5 с использованием LI-6800 (LI-COR Biosciences GmbH, CША) в эксперименте, проводимом в теплице, и *i*WUE была рассчитана как соотношение между ассимиляцией  $CO_2$  и устьичной проводимостью. Данные представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (n = 10). Значимые различия между RP и каждой из NIL, основанные на тесте Даннета, обозначены полосами темно-серого цвета

(светло-серые полосы не обозначают значимых различий с RP). Черная квадратная рамка указывает на целевую область генома, связанную с этим признаком. Координаты, указанные в последней строке, соответствуют B73 v4 (www.maizegdb.org).

**Фигура 16.** Сравнение почти изогенной линии В (NIL В) и девяти рекомбинантных NIL (D-L) с их рекуррентным родителем (RP) в рамках устьичной проводимости ( $g_s$ ). Каждая NIL несет интрогрессию (отмеченную темно-серым цветом) от кремнистого родителя-донора на генетическом фоне зубовидного RP (светло-серого цвета). Были проведены измерения газообмена листьев на полностью развитом листе 5 на стадии развития V5 с использованием LI-6800 (LI-COR Biosciences GmbH, CIIIA) для определения  $g_s$  в эксперименте, проводимом в теплице. Данные представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (n=10). Значимые различия между RP и каждой из NIL, основанные на тесте Даннета, обозначены полосами темно-серого цвета (светло-серые полосы не обозначают значимых различий с RP). Черная квадратная рамка указывает на целевую область генома, связанную с этим признаком. Координаты, указанные в последней строке, соответствуют B73 v4 (www.maizegdb.org).

**Фигура 17.** Сравнение почти изогенной линии В (NIL В) и девяти рекомбинантных NIL (D-L) с их рекуррентным родителем (RP) в рамках устьичной плотности. Каждая NIL несет интрогрессию (отмеченную темно-серым цветом) от кремнистого родителя-донора на генетическом фоне зубовидного RP (светло-серого цвета). Устьица подсчитывали по отпечаткам эпидермиса, взятым с полностью развитого листа 5 на стадии развития V5 в эксперименте, проводимом в теплице. Данные представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (n = 10). Значимые различия между RP и каждой из NIL, основанные на тесте Даннета, обозначены полосами темно-серого цвета (светло-серые полосы не обозначают значимых различий с RP). Черная квадратная рамка указывает на целевую область генома, связанную с этим признаком. Координаты, указанные в последней строке, соответствуют B73 v4 (www.maizegdb.org).

**Фигура 18.** Сравнение почти изогенной линии В (NIL В) и девяти рекомбинантных NIL (D-L) с их рекуррентным родителем (RP) в рамках концентраций абсцизовой кислоты (ABA) в листе. Каждая NIL несет интрогрессию (отмеченную темно-серым цветом) от кремнистого родителя-донора на генетическом фоне зубовидного RP (светло-серого цвета). Концентрации ABA определяли в образцах, собранных с полностью развитого листа 5 на стадии развития V5 в эксперименте, проводимом в теплице. Данные представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (n = 10). Значимые различия между RP и каждой из NIL, основанные на тесте Даннета, обозначены полосами темно-серого цвета (светло-серые

полосы не обозначают значимых различий с RP). Черная квадратная рамка указывает на целевую область генома, связанную с этим признаком. Координаты, указанные в последней строке, соответствуют B73 v4 (www.maizegdb.org).

**Фигура 19.** Сравнение почти изогенной линии В (NIL В) и девяти рекомбинантных NIL (D-L) с их рекуррентным родителем (RP) в рамках концентраций фазовой кислоты (PA) в листе. Каждая NIL несет интрогрессию (отмеченную темно-серым цветом) от кремнистого родителя-донора на генетическом фоне зубовидного RP (светло-серого цвета). Концентрации PA определяли в образцах, собранных с полностью развитого листа 5 на стадии развития V5 в эксперименте, проводимом в теплице. Данные представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (n=10). Значимые различия между RP и каждой из NIL, основанные на тесте Даннета, обозначены полосами темно-серого цвета (светло-серые полосы не обозначают значимых различий с RP). Черная квадратная рамка указывает на целевую область генома, связанную с этим признаком. Координаты, указанные в последней строке, соответствуют B73 v4 (www.maizegdb.org).

**Фигура 20.** Сравнение почти изогенной линии В (NIL В) и девяти рекомбинантных NIL (D-L) с их рекуррентным родителем (RP) в рамках отношения продуктов катаболизма фазовой кислоты (PA) и дигидрофазовой кислоты (DPA) к их субстрату абсцизовой кислоты (ABA). Каждая NIL несет интрогрессию (отмеченную темно-серым цветом) от кремнистого родителя-донора на генетическом фоне зубовидного RP (светло-серого цвета). Концентрации метаболитов определяли в образцах, собранных с полностью развитого листа 5 на стадии развития V5 в эксперименте, проводимом в теплице. Данные представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка (n = 10). Значимые различия между RP и каждой из NIL, основанные на тесте Даннета, обозначены полосами темносерого цвета (светло-серые полосы не обозначают значимых различий с RP). Черная квадратная рамка указывает на целевую область генома, связанную с этим признаком. Координаты, указанные в последней строке, соответствуют B73 v4 (www.maizegdb.org).

**Фигура 21.** Сравнение почти изогенной линии В (NIL В) и девяти рекомбинантных NIL (D-L) с их рекуррентным родителем (RP) в рамках изотопного состава углерода ядра ( $\delta^{13}$ С). Каждая NIL несет интрогрессию (отмеченную темно-серым цветом) от кремнистого родителя-донора на генетическом фоне зубовидного RP (светло-серого цвета).  $\delta^{13}$ С определяли в ядрах, собранных в эксперименте, проводимом в теплице. Данные представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (n = 10). Значимые различия между RP и каждой из NIL, основанные на тесте Даннета, обозначены полосами темносерого цвета (светло-серые полосы не обозначают значимых различий с RP). Черная

квадратная рамка указывает на целевую область генома, связанную с этим признаком. Координаты, указанные в последней строке, соответствуют B73 v4 (www.maizegdb.org).

**Фигура 22.** Сравнение почти изогенной линии В (NIL В) и девяти рекомбинантных NIL (D-L) с их рекуррентным родителем (RP) в рамках изотопного состава углерода ядра ( $\delta^{13}$ С). Каждая NIL несет интрогрессию (отмеченную темно-серым цветом) от кремнистого родителя-донора на генетическом фоне зубовидного RP (светло-серого цвета).  $\delta^{13}$ С определяли в ядрах, собранных в эксперименте, проводимом в условиях обильного полива. Данные представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (n=10). Значимые различия между RP и каждой из NIL, основанные на тесте Даннета, обозначены полосами темно-серого цвета (светло-серые полосы не обозначают значимых различий с RP). Черная квадратная рамка указывает на целевую область генома, связанную с этим признаком. Координаты, указанные в последней строке, соответствуют B73 v4 (www.maizegdb.org).

**Фигура 23.** Сравнение почти изогенной линии В (NIL В) и девяти рекомбинантных NIL (D-L) с их рекуррентным родителем (RP) в рамках изотопного состава углерода ядра ( $\delta^{13}$ C). Каждая NIL несет интрогрессию (отмеченную темно-серым цветом) от кремнистого родителя-донора на генетическом фоне зубовидного RP (светло-серого цвета).  $\delta^{13}$ C определяли в ядрах, собранных при укрытии от дождя в условиях умеренной засухи. Данные представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (n=10). Значимые различия между RP и каждой из NIL, основанные на тесте Даннета, обозначены полосами темно-серого цвета (светло-серые полосы не обозначают значимых различий с RP). Черная квадратная рамка указывает на целевую область генома, связанную с этим признаком. Координаты, указанные в последней строке, соответствуют B73 v4 (www.maizegdb.org).

#### Последовательности

SEQ ID NO:	описание
1	геномная ДНК ZmCSLE1, полученная от B73
2	сДНК ZmCSLE1, полученная от B73
3	аминокислотные последовательности ZmCSLE1, полученные от B73
4	геномная ДНК ZmCSLE1, полученная от PH207
5	сДНК ZmCSLE1, полученная от РН207
6	аминокислотные последовательности ZmCSLE1, полученные от PH207

7	геномная ДНК ZmCSLE1, полученная от B73, включая
	верхние и нижние фланкирующие области
8	геномная ДНК ZmCSLE1, полученная от PH207, включая
	верхние и нижние фланкирующие области
9	геномная ДНК ZmAbh4, полученная от B73
10	транскрипт 1 ZmAbh4, полученный от B73
11	сДНК транскрипта 1 ZmAbh4, полученная от B73
12	аминокислотные последовательности транскрипта 1
	ZmAbh4, полученные от B73
13	транскрипт 2 ZmAbh4, полученный от B73
14	сДНК транскрипта 2 ZmAbh4, полученная от B73
15	аминокислотные последовательности транскрипта 2 и 3
	ZmAbh4, полученные от B73
16	транскрипт 3 ZmAbh4, полученный от B73
17	сДНК транскрипта 3 ZmAbh4, полученная от B73
18	геномная ДНК ZmAbh4, полученная от PH207
19	транскрипт ZmAbh4, полученный от PH207
20	сДНК ZmAbh4, полученная от PH207
21	аминокислотные последовательности ZmAbh4, полученные
21	от РН207
22	геномная ДНК ZmAbh4, полученная от B73, включая
	верхние и нижние фланкирующие области
23	геномная ДНК ZmAbh4, полученная от PH207, включая
	верхние и нижние фланкирующие области
24	геномная ДНК ZmWEB1, полученная от B73
25	сДНК ZmWEB1, полученная от B73
26	аминокислотные последовательности ZmWEB1,
	полученные от В73
27	геномная ДНК ZmWEB1, полученная от PH207
28	сДНК ZmWEB1, полученная от PH207
29	аминокислотные последовательности ZmWEB1,
	полученные от РН207

30	геномная ДНК ZmWEB1, полученная от B73, включая верхние и нижние фланкирующие области
31	геномная ДНК ZmWEB1, полученная от PH207, включая верхние и нижние фланкирующие области
32	геномная ДНК GRMZM2G397260, полученная от B73
33	сДНК GRMZM2G397260, полученная от B73
34	аминокислотные последовательности GRMZM2G397260, полученные от B73
35	геномная ДНК GRMZM2G397260, полученная от B73, включая верхние и нижние фланкирующие области
36	геномная ДНК ZmHsftf21, полученная от B73
37	сДНК ZmHsftf21, полученная от B73
38	аминокислотные последовательности ZmHsftf21, полученные от B73
39	геномная ДНК ZmHsftf21, полученная от PH207
40	сДНК ZmHsftf21, полученная от PH207
41	аминокислотные последовательности ZmHsftf21, полученные от PH207
42	геномная ДНК ZmHsftf21, полученная от B73, включая верхние и нижние фланкирующие области
43	геномная ДНК ZmHsftf21, полученная от PH207, включая верхние и нижние фланкирующие области

# ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Перед описанием системы и способа настоящего изобретения, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается описанными конкретными системами и способами или комбинациями, поскольку подразумевается, что такие системы, способы и комбинации могут варьироваться. Также, следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология не является ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

В контексте настоящего документа, формы единственного числа «а», «an» и «the» включают как единственное, так и множественное число, если иное не следует явно из контекста.

В контексте настоящего документа, термины «содержащий», «содержит» и «состоящий из» являются синонимами терминов «включающий», «включает» или «содержащий в себе», «содержит в себе» и включают, или являются многовариантными, и не исключают использование дополнительных, неперечисленных членов, элементов или этапов способа. Понятно, что термины «содержащий», «содержит» и «состоящий из», в контексте настоящего документа, содержат термины «состоящий из», «состоит» и «состоит из», а также термины «состоящий по существу из», «состоит по существу» и «состоит по существу из».

Перечисление диапазонов числовых значений по конечным точкам включает все числа и доли, включенные в соответствующие диапазоны, а также перечисленные конечные точки.

В контексте настоящего документа, термин «примерно» или «приблизительно», относящийся к измеряемому значению, в частности, к параметру, количеству, временной длительности и тому подобному, предусматривает включение вариаций +/-20% или менее, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, +/-10% или менее, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, +/-5% или менее, и в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, +/-1% или менее от указанного значения, в той мере, в какой такие вариации подходят для использования в раскрытом изобретении. Следует понимать, что значение, к которому относится обстоятельство «примерно» или «приблизительно», само также определенным образом и преимущественно раскрыто.

Хотя термин «по меньшей мере, один», в частности, по меньшей мере, один член из группы членов, ясен *per se*, посредством дальнейшего пояснения на примерах будет понятно, что этот термин охватывает, в частности, ссылку на любой один из указанных членов или на любые, по меньшей мере, два из указанных членов, в частности, например, любые  $\geq 3$ ,  $\geq 4$ ,  $\geq 5$ ,  $\geq 6$  или  $\geq 7$  и так далее из указанных членов, и вплоть до всех указанных членов.

Все ссылки, приведенные в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В частности, идеи, содержащиеся во всех, определенным образом приведенных, ссылках настоящего документа, включены в него посредством ссылки.

Если не дано иное определение, то все термины, использованные в раскрытии настоящего документа, включая технические и научные термины, имеют значения, которые, как правило, понятны специалисту средней квалификации в данной области

техники, к которой относится настоящее изобретение. Посредством дополнительных разъяснений, в настоящий документ включены определения терминов для лучшего понимания идеи настоящего изобретения.

Стандартные справочные издания, излагающие общие принципы технологии рекомбинантной ДНК, включают Молекулярное клонирование: Инструкция по проведению лабораторных работ, 2-е изд., т. 1-3, под ред. Сэмбрук и соавт., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, 1989; Текущие протоколы в молекулярной биологии, под ред. Осубель и соавт., Greene Publishing и Wiley-Interscience, Нью-Йорк, 1992 (с периодическими обновлениями) («Осубель и соавт. 1992"); серия «Методы в энзимологии» (Асаdemic Press, Inc.); Иннис и соавт., Протоколы ПЦР: Руководство по методам и применению, Асаdemic Press: Сан-Диего, 1990 год; ПЦР 2: Практический подход (М.Дж. Макферсон, Б.Д. Хеймс и Г.Р. Тейлор, под ред. (1995); Харлоу и Лейн, под ред. (1988) Антитела, Инструкция по проведению лабораторных работ; и Культура животных клеток (Р. Я. Фрешни, под ред. (1987). Общие принципы микробиологии изложены, например, в работе Дэвис, Б.Д. и соавт., Microbiology, 3-е изд., Нагрег & Row, издательство, Филадельфия, Пенсильвания (1980).

Различные аспекты настоящего изобретения определены более подробно в нижеследующих выдержках. Каждый аспект, определенный таким образом, можно комбинировать с любым другим аспектом или аспектами, если явно не указано обратное. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или имеющий преимущество, можно комбинировать с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительные или имеющие преимущество.

Ссылка, приводимая на протяжении всего данного описания на «один вариант осуществления настоящего изобретения» или «вариант осуществления настоящего изобретения» означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанная в связи с этим вариантом осуществления настоящего изобретения, включена, по меньшей мере, в один вариант осуществления настоящего изобретения. Таким образом, выражения «в одном варианте осуществления настоящего изобретения» или «в варианте осуществления настоящего изобретения», присутствующие в разных местах настоящего описания, необязательно все относятся к одному и тому же варианту осуществления настоящего изобретения, однако это может иметь место. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики можно комбинировать любым подходящим образом, как это было бы очевидно из настоящего раскрытия специалисту в данной области техники, по меньшей мере, в одном варианте осуществления настоящего изобретения. Кроме того, хотя

некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, включают некоторые, но не другие признаки, включенные в другие варианты осуществления настоящего изобретения, предполагается, что комбинации признаков различных вариантов осуществления настоящего изобретения входят в объем настоящего изобретения и образуют различные варианты его осуществления, что было бы понятно специалистам в данной области техники. Например, в прилагаемой формуле изобретения, любой из заявленных вариантов осуществления настоящего изобретения может быть использован в любой комбинации.

В нижеследующем подробном описании настоящего изобретения приведена ссылка на прилагаемые чертежи, которые составляют часть настоящего документа, и в которых для наглядности показаны только конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, посредством которых настоящее изобретение может быть осуществлено. Следует понимать, что могут быть использованы и другие варианты осуществления настоящего изобретения, а структурные или логические изменения могут быть внесены, не выходя за рамки объема настоящего изобретения. Поэтому нижеследующее подробное описание вариантов осуществления настоящего изобретения не следует понимать в ограничивающем смысле, а объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения.

Предпочтительные утверждения (признаки) и варианты осуществления настоящего изобретения изложены ниже. Каждое из утверждений и вариантов осуществления настоящего изобретения, определенных таким образом, можно комбинировать с любым другим утверждением и/или вариантом осуществления настоящего изобретения, если явно не указано обратное. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или имеющий преимущество, можно комбинировать с любым другим признаком или признаками, или утверждениями, указанными как предпочтительные или имеющие преимущество.

В контексте настоящего документа, термин «кукуруза» относится к растению вида *Zea mays*, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, Zea mays ssp mays.

Термин «растение» включает целые растения, включая их потомков или потомство. Термин «часть растения» включает любую часть или производное растения, включая определенные ткани или структуры растения, растительные клетки, растительный протопласт, растительную клетку или культуру ткани, из которой можно регенерировать растения, каллусы растения, скопления растительных клеток и растительные клетки,

находящиеся в интактном состоянии в растениях или частях растений, такие как семена, зерна, початки, цветки, семядоли, листья, стебли, почки, корни, корневые кончики, стерня и тому подобное. Части растения могут включать обработанные части растения или их производные, включая цветки, масла, экстракты и так далее.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения или его производное содержит, состоит или состоит по существу из, по меньшей мере, одного, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, из всех стеблей, листьев и початков. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения или его производное представляет собой листья. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения или его производное представляет собой стебли. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения или его производное представляет собой початки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения или его производное содержит, состоит или состоит по существу из, по меньшей мере, одного, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, из всех стеблей и листьев. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения или его производное содержит, состоит или состоит по существу из, по меньшей мере, одного, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, из всех стеблей и початков. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения или его производное содержит, состоит или состоит по существу из, по меньшей мере, одного, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, из всех листьев и початков. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения или его производное не является (функциональным) материалом для размножения, таким как зародышевая плазма, семя или зародыш растения, или другой материал, из которого можно регенерировать растение. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения или его производное не содержит (функциональных) мужских и женских репродуктивных органов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения или его производное является или содержит материал для размножения, но материал для размножения, который не используется или не может использоваться (больше) для получения или генерирования новых растений, например, материал для размножения, который был химическим, механическим или иным образом приведен в нефункциональное состояние, например, путем термической обработки, кислотной обработки, уплотнения, дробления, измельчения

и так далее, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения представляет собой початки или стерню.

Засухостойкость или засухоустойчивость, как указано в настоящем документе, относится к способности, с помощью которой растение поддерживает производство биомассы в засушливый период или в засушливых условиях, то есть, в условиях недостаточного водоснабжения или водообеспечения. Механизмы, лежащие в основе засухоустойчивости, сложны и включают множество путей, которые позволяют растениям отвечать на конкретную совокупность условий в любое время. Некоторые из этих взаимодействий включают устьичную проводимость, деградацию каротиноидов и аккумуляцию антоцианов, вмешательство осмопротекторов (таких как сахароза, глицин и пролин), ферменты, поглощающие АФК. Молекулярный контроль засухоустойчивости также очень сложен и зависит от других факторов, таких как окружающая среда и стадия развития растения. Этот контроль состоит в основном из транскрипционных факторов, таких как белок, связывающий элементы, отвечающие на обезвоживание (DREB), фактор связывания элементов, отвечающих на абсцизовую кислоту (ABA) (AREB), и NAM (не апикальная меристема). Засухостойкое или засухоустойчивое растение, растительная клетка или часть растения относятся в настоящем документе к растению, растительной части соответственно, обладающей повышенной клетке или растения, засухостойкостью/засухоустойчивостью, по сравнению с родительским растением, от которого они получены. Способы определения засухостойкости/засухоустойчивости известны специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, растения или части растений являются более засухостойкими или засухоустойчивыми. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, растения или части растений являются менее засухостойкими или менее засухоустойчивыми. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, растения или части растений являются более чувствительными к засухе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, растения или части растений являются менее чувствительными к засухе. Термин «менее чувствительные», в контексте настоящего документа, наоборот, может рассматриваться как «более устойчивые» или «более стойкие». Аналогичным образом, термин «более устойчивые» или «более стойкие», наоборот, может рассматриваться как «менее чувствительные». Термин «более чувствительные», в контексте настоящего документа, наоборот, может рассматриваться как «менее устойчивые» или «менее стойкие». Аналогичным образом, термин «менее устойчивые» или «менее стойкие», наоборот, может рассматриваться как «более чувствительные». В

некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, более засухостойкие или засухоустойчивые растения демонстрируют потерю производства биомассы (например, выраженную в г/день или кг/га, или кг/га/день, например, выраженную в сухом веществе, например, выраженную в процентах по массе) в условиях засухи, которая составляет, по меньшей мере, 1%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 2%, например, по меньшей мере, 3%, по меньшей мере, 4%, по меньшей мере, 5% или еще ниже, чем у соответствующих контрольных растений, таких как растения, являющиеся менее засухостойкими или засухоустойчивыми, или растения, не содержащие QTL (аллель) или маркеры, или маркерные аллели в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе.

 $\delta$ 13С, в контексте настоящего документа, относится к изотопной сигнатуре, показателю соотношения стабильных изотопов 13С:12С (то есть, к изотопному составу углерода), выраженному в частях на тысячу (промилле, ‰).  $\delta$ 13С рассчитывают следующим образом:

$$\delta 13C = \left(\frac{\left(\frac{13C}{12C}\right)sample}{\left(\frac{13C}{12C}\right)standard} - 1\right)x\ 1000$$

где стандартом является общепризнанный эталонный материал. Общепризнанным стандартом для работы с углеродом-13, был Пи-Ди белемнит (PDB), основанный на морской окаменелости мелового периода Belemnitella americana, которая была обнаружена в Формации Пи-Ди в Южной Каролине. Этот материал имел аномально высокое соотношение 13C:12C (0,01118), и по общему признанию его приняли за нулевое значение  $\delta$ 13C. Поскольку исходный образец PDB больше недоступен, его соотношение 13C:12C в настоящее время рассчитывают путем обратного расчисления на основе всесторонне измеренного стандарта карбоната NBS-19, который имеет значение  $\delta$ 13C +1,95‰.[3] Соотношение 13C:12C NBS-19 составляет 0,011078/0,988922 = 0,011202. Поэтому корректное соотношение 13C:12C PDB, полученное на основе NBS-19, должно составлять 0,011202/(1,95/1000 + 1) = 0,011202/1,00195 = 0,01118.

δ13С изменяется во времени в зависимости от продуктивности, сигнатуры неорганического источника, уровня захоронения органического углерода и типа растительности. Биологические процессы преимущественно поглощают изотоп с меньшей массой посредством кинетического фракционирования. Однако некоторые абиотические процессы делают то же самое, метан из гидротермальных источников может быть истощен вплоть до 50%.

Углерод в материалах, образованных в результате фотосинтеза, истощается более тяжелыми изотопами. Кроме того, существует два типа растений, имеющих разные биохимические пути; фиксация углерода С3, где влияние разделения изотопов более выражено, фиксация углерода С4, где более тяжелый 13С менее истощен, и растения с метаболизмом крассулацеиновой кислоты (САМ), где влияние аналогично, но менее выражено, чем у растений С4. Фракционирование изотопов в растениях обусловлено физическими (более медленная диффузия 13С в тканях растений вследствие увеличения атомной массы) и биохимическими (для 12С предпочтение отдается двум ферментам: RuBisCO (рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза-оксигеназа) и фосфоенолпируваткарбоксилаза) факторами.

Изотопный состав углерода можно использовать в качестве механизма для получения информации о коэффициенте транспирации у видов СЗ (Фаркуар и соавт., 1989. Дискриминация изотопов углерода и фотосинтез. Annual review of plant biology, 40(1), 503-537). Некоторые исследования, проведенные с видом С4, показали отрицательную корреляцию между б13С и эффективностью водопотребления (WUE; Хендерсон и соавт., 1998. Корреляция между дискриминацией изотопов углерода и коэффициентом транспирации в линиях двухцветного сорго вида С4 в тепличных и полевых условиях. Functional Plant Biology, 25(1), 111-123; Деркон и соавт., 2006. Дифференциальная дискриминация изотопов 13 С в кукурузе при водном стрессе разного уровня и при наличии азота от низкого до высокого уровня. Plant and Soil, 282(1-2), 313-326; Шервуд и соавт., 2014. Фотосинтетическая гибкость у кукурузы, подверженной воздействию солености и тени. Јошпаl оf ехрегіmental botany, 65(13), 3715-3724.), которую определяют как количество биомассы или урожайность, аккумулированная на единицу потребленной воды.

В контексте настоящего изобретения, конкретный QTL или маркер считается «ассоциированным с» или «отрицательно влияющим» на конкретный признак или параметр, такой как засухостойкость/засухоустойчивость или δ13С, если значение признака или параметра изменяется (то есть, признак или параметр проявляет фенотипическое различие) в зависимости от идентичности QTL или маркера (то есть, последовательности). Такая корреляция может быть каузативной или не каузативной.

В контексте настоящего документа, термин «устьичный параметр» относится к любому параметру, относящемуся, влияющему или являющемуся результатом устьичной функциональности, структуры (включая размер, распределение, плотность) и так далее. В контексте настоящего документа, термин «параметр газообмена» относится к любому параметру, относящемуся, влияющему или являющемуся результатом поглощения

растением и/или выделения растением газов (таких как  $CO_2$ ,  $O_2$ ,  $H_2O$ ). Специалист в данной области техники поймет, что устьичные параметры и параметры газообмена могут быть в некоторой степени взаимосвязаны или перекрываться.

В контексте настоящего документа, термин «эффективность водопотребления» (WUE) относится к соотношению между эффективным водопотреблением и фактическим забором воды. Он характеризует, в конкретном процессе, насколько эффективно водопотребление. WUE может быть выражена как отношение воды, потребляемой в метаболизме растений, к воде, теряемой растением в результате транспирации. WUE может быть измерена в различных масштабах, начиная от мгновенных измерений на листе и заканчивая более интегративными измерениями на уровне растений и культур. Эффективность внутреннего водопотребления (iWUE) представляет собой отношение скорости нетто-ассимиляции CO<sub>2</sub> к устьичной проводимости (A/g<sub>s</sub>; выраженной в моль CO<sub>2</sub>/моль H<sub>2</sub>O). Эффективность водопотребления во всем растении (WUE растения) представляет собой соотношение разницы между конечной и начальной биомассой растения и общим количеством потребленной воды (выраженное в г/л). Интегрированные по времени жизни механизмы WUE измеряют как отношение 13C к 12C (Δ13C или δ13C).

В контексте настоящего документа, термин «устьичная проводимость» ( $g_s$ ; выраженная в моль/ $m^2/c$ ) относится к скорости прохождения диоксида углерода ( $CO_2$ ), поступающего через устьице листа, или водяного пара, выходящего через устьице листа. Устьичная проводимость представляет собой функцию устьичной плотности, устьичной апертуры и устьичного размера. Устьичная проводимость может быть измерена с помощью средств, известных в данной области техники, таких как стационарные порометры, динамические порометры или порометры, уравновешенные с помощью нуль-индикатора.

В контексте настоящего документа, термин «скорость нетто-ассимиляции  $CO_2$ » (А; выраженная в моль/ $M^2$ /с) относится к фотосинтетической ассимиляции  $CO_2$  на площадь листа в течение заданного периода времени. Скорость нетто-ассимиляции  $CO_2$  может быть измерена средствами, известными в данной области техники.

В контексте настоящего документа, термин «транспирация» (Е; выраженная в мл/г или мл/м $^2$ , или мл/г/с, или мл/м $^2$ /с для скорости транспирации) относится к процессу движения воды через растение и испарения воды из надземных частей, таких как листья, стебли и цветы. Транспирация происходит через устьичные апертуры. Транспирация может быть измерена средствами, известными в данной области техники.

В контексте настоящего документа, термин «устьичная плотность» относится к количеству устьиц на площадь листа.

В контексте настоящего документа, термин «содержание ABA» относится к количеству или концентрации абсцизовой кислоты. Содержание ABA, например, может быть определено как содержание ABA в различных тканях или органах растений, например, содержание ABA в листьях.

В контексте настоящего документа, термин «чувствительность роста к засухе» относится к влиянию засухи или водообеспечения в целом на характеристики роста (такие как, например, производство биомассы). Повышенная чувствительность роста к засухе отражается в более сильном (негативном) воздействии засухи на рост.

В контексте настоящего документа, эталонный геном AGPv2 B73 относится к сборке RefGen\_v2 B73 (также известной как AGPv2, RefGen\_v2 B73), как указано в Базе данных по генетике и геномике кукурузы (https://www.maizegdb.org/genome/genome assembly/B73%20RefGen\_v2).

В контексте настоящего документа, эталонный геном AGPv4 B73 относится к сборке RefGen\_v2 B73 (также известной как AGPv4, RefGen\_v4 B73), как указано в Базе данных по генетике и геномике кукурузы (https://www.maizegdb.org/genome/genome\_assembly/Zm-B73-REFERENCE-GRAMENE-4.0).

В контексте настоящего документа, полинуклеиновая кислота, такая как, например, QTL (аллель), как описано в настоящем документе, считается фланкированной определенными молекулярными маркерами или аллелями молекулярных маркеров, если полинуклеиновая кислота содержится в пределах полинуклеиновой кислоты, при этом, соответственно, первый маркер (аллель) расположен выше (то есть, на 5') указанной полинуклеиновой кислоты, а второй маркер (аллель) расположен ниже (то есть, на 3') указанной полинуклеиновой кислоты. Такой первый и второй маркер (аллель) могут граничить с полинуклеиновой кислотой. Нуклеиновая кислота может в равной степени содержать такой первый и второй маркер (аллель), например, соответственно, на или вблизи 5' и 3' конца, например, соответственно, в пределах 50 т.п.о. от 5' и 3' конца, в пределах 10 т.п.о. от 5' и 3' конца, например, в пределах 5 т.п.о. от 5' и 3' конца, в пределах 1 т.п.о. от 5' и 3' конца например, в пределах 5 т.п.о. от 5' и 3' конца, в пределах 1 т.п.о. от 5' и 3' конца или в меньшем пределе.

В контексте настоящего документа, повышенные (белка и/или mPHK) уровни экспрессии относятся к уровням экспрессии, повышенным, примерно, по меньшей мере, на 10%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 30%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 50%, например, по меньшей мере, на 20%, 40%, 60%, 80% или более,

например, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95% или более. В контексте настоящего документа, пониженные (белка и/или mPHK) уровни экспрессии относятся к уровням экспрессии, пониженным, примерно, по меньшей мере, на 10%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 30%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 50%, например, по меньшей мере, на 20%, 40%, 60%, 80% или более, например, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95% или более. Экспрессия (по существу) отсутствует или элиминирована, если уровни экспрессии понижены, по меньшей мере, на 80%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 90%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 95%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, экспрессия (по существу) отсутствует, если не удается обнаружить белок и/или mPHK, в частности, дикого типа или нативный белок и/или mPHK. Уровни экспрессии могут быть определены любыми средствами, известными в данной области техники, такими как стандартные методы обнаружения, включая, например, мгновенная (количественная) ПЦР, нозерн-блоттинг, вестерн-блоттинг, ELISA (ИФА) и так далее.

В контексте настоящего документа, повышенная (белка) активность относится к активности, повышенной, примерно, по меньшей мере, на 10%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 30%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 50%, например, по меньшей мере, на 20%, 40%, 60%, 80% или более, например, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95% или более. В контексте настоящего документа, пониженная (белка) активность относится к активности, пониженной, примерно, по меньшей мере, на 10%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 30%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 50%, например, по меньшей мере, на 20%, 40%, 60%, 80% или более, например, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95% или более. Активность (по существу) отсутствует или элиминирована, если активность понижена, по меньшей мере, на 80%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 90%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 95%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, активность (по существу) отсутствует, если не удается обнаружить

активность, в частности, активность белка дикого типа или нативного белка. Уровни активности (белка) могут быть определены любыми средствами, известными в данной области техники, в зависимости от типа белка, такими как стандартные способы обнаружения, включая, например, ферментативные количественные анализы (для ферментов), транскрипционные количественные анализы (для факторов транскрипции), количественные анализы для анализа выхода фенотипа и так далее.

Уровни экспрессии или активность могут быть сопоставлены между различными растениями (или частями растений), такими как растение (часть), содержащее QTL (аллель) и/или маркер (маркеры) (аллель (аллель) и в соответствии с настоящим изобретением, и растение (часть), не содержащее QTL (аллель) и/или маркер (маркеры) (аллель (аллели)) в соответствии с настоящим изобретением. Уровни экспрессии или активность могут быть сопоставлены между различными условиями, такими как условия засухи и условия отсутствия засухи. Уровни экспрессии или активности могут быть сопоставлены с заданным пороговым значением. Такое заданное пороговое значение может, например, соответствовать уровням экспрессии или активности в конкретном генотипе (например, в растении, не содержащем QTL (аллель) и/или маркер (маркеры) (аллель (аллелы)) в соответствии с настоящим изобретением) или в определенных условиях (например, в условиях отсутствия засухи).

Термин «локус» (локусы - множественное число) означает определенное место или места, или сайт на хромосоме, где обнаружен, например, QTL, ген или генетический маркер. В контексте настоящего документа, термин «локус количественных признаков», или «QTL», используется в своем обычном значении, известном в данной области техники. Посредством дополнительных разъяснений, и без ограничения, QTL может относиться к области ДНК, которая ассоциирована с дифференциальной экспрессией количественного фенотипического признака, по меньшей мере, в одном генетическом фоне, например, по меньшей мере, в одной популяции, полученной в результате селекции. Область QTL включает или тесно сцеплена с геном или генами, которые оказывают отрицательное влияние на рассматриваемый признак. «Аллель QTL» может содержать множество генов или других генетических факторов в пределах области непрерывно сцепленных генов или группы сцепления, такой как гаплотип. Аллель QTL может означать гаплотип в пределах указанного окна, при этом, указанное окно представляет собой область непрерывно сцепленных генов, которую можно определить и отследить с помощью набора из, по меньшей мере, одного полиморфного маркера. Гаплотип можно определить по уникальному отпечатку аллелей на каждом маркере в указанном окне. QTL может

кодировать, по меньшей мере, один аллель, который оказывает отрицательное влияние на экспрессивность непрерывно распределенного (количественного) фенотипа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, QTL, как описано в настоящем документе, может быть гомозиготным. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, QTL, как описано в настоящем документе, может быть гетерозиготным.

В контексте настоящего документа, термин «аллель» или «аллели» относится к, по меньшей мере, одной альтернативной форме, то есть, к другой нуклеотидной последовательности, локуса.

В контексте настоящего документа, термин «мутантные аллели» или «мутация» аллелей включает аллели, имеющие, по меньшей мере, одну мутацию, такую как инсерция, делеция, стоп-кодон, замена основания (например, транзиция или трансверсия), или изменение границ сплайсинга, которые могут приводить или не приводить к появлению измененных генных продуктов. Модификации в аллелях могут возникать в кодирующих или некодирующих областях (например, в промоторных областях, экзонах, интронах или в границах сплайсинга).

В контексте настоящего документа, термины «интрогрессия», «интрогрессированный» и «интрогрессирование» относятся как к естественному, так и к искусственному процессу, благодаря которому хромосомные фрагменты или гены одного вида, разновидности или сорта перемещаются в геном другого вида, разновидности или сорта путем скрещивания этих видов. Этот процесс может быть необязательно завершен обратным скрещиванием с рекуррентным родителем. Например, интрогрессия желаемого аллеля в указанном локусе может быть передана, по меньшей мере, одному потомству посредством полового скрещивания между двумя родителями одного и того же вида, где, по меньшей мере, один из родителей имеет желаемый аллель в своем геноме. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, например, передача аллеля может происходить путем рекомбинации между двумя донорскими геномами, например, в слитом протопласте, где, по меньшей мере, один донорский протопласт имеет в своем геноме желаемый аллель. Желаемый аллель может быть, например, определен маркером, который ассоциирован с фенотипом, в QTL, трансгене или тому подобном. В любом случае, потомство, содержащее желаемый аллель, может быть повторно обратно скрещено с линией, имеющей желаемый генетический фон, и отобрано для желаемого аллеля, чтобы получить аллель, зафиксированный в выбранном генетическом фоне. Процесс «интрогрессирования» зачастую называют «обратным скрещиванием», когда процесс повторяется, по меньшей мере, два раза. Термин «фрагмент интрогрессии» или

«сегмент интрогрессии», или «область интрогрессии» относится к фрагменту хромосомы (или к части хромосомы, или области), который был введен в другое растение одного и того же или родственного вида либо искусственным, либо естественным путем, например, путем скрещивания или традиционными методами селекции, такими как обратное скрещивание, то есть, интрогрессированный фрагмент является результатом методов селекции, обозначаемых глаголом «интрогрессировать» (например, обратное скрещивание). Следует понимать, что термин «фрагмент интрогрессии» никогда не включает целую хромосому, а только часть хромосомы. Фрагмент интрогрессии может быть большим, например, он может составлять даже три четверти или половину хромосомы, но в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, он составляет менее, например, примерно, 15 млн.п.о. или менее, например, примерно, 10 млн.п.о. или менее, примерно, 9млн.п.о. или менее, примерно, 8 млн.п.о. или менее, примерно, 7 млн.п.о. или менее, примерно, 6млн.п.о. или менее, примерно, 5 млн.п.о. или менее, примерно, 4 млн.п.о. или менее, примерно, 3 млн.п.о. или менее, примерно, 2,5 млн.п.о. или 2 млн.п.о., или менее, примерно, 1 млн.п.о. (равно 1 000 000 п.о.) или менее, или, примерно, 0,5млн.п.о. (равно 500 000 п.о.) или менее, например, примерно, 200 000 п.о. (равно 200 т.п.о.) или менее, примерно, 100 000 п.о. (равно 100 т.п.о.) или менее, или, примерно, 50 000 п.о. (50 т.п.о.) или менее, примерно, 25 000 п.о. (25 т.п.о.) или менее. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фрагмент интрогрессии содержит, состоит или состоит по существу из QTL в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе.

Считается, что генетический элемент, фрагмент интрогрессии или ген, или аллель, придающий признак (например, улучшенную перевариваемость), можно «получить от», или его может быть «получен от», или его можно «произвести от», или он может быть «произведен от», или «присутствующий в», или «обнаруженный в» растении или части растения, как описано в другом месте настоящего документа, если его можно перенести из растения, в котором он присутствует, в другое растение, в котором он не присутствует (например, линия или сорт), используя традиционные методы селекции, не приводящие к фенотипическому изменению растения-реципиента, за исключением добавления признака, который был придан генетическим элементом, локусом, фрагментом интрогрессии, геном или аллелем. Термины используются взаимозаменяемо, и, таким образом, генетический элемент, локус, фрагмент интрогрессии, ген или аллель могут быть перенесены в любой другой генетический фон, лишенный этого признака. Могут быть использованы не только растения, содержащие генетический элемент, локус, фрагмент интрогрессии, ген или

аллель, но также и потомство/потомки, полученные от таких растений, которые были отобраны для сохранения генетического элемента, локуса, фрагмента интрогрессии, гена или аллеля, которые могут быть использованы и включены в настоящий документ. Специалист в данной области техники сможет определить содержит ли растение (или геномная ДНК, клетка или ткань растения) один и тот же генетический элемент, локус, фрагмент интрогрессии, ген или аллель, который можно получить от такого растения, с использованием, по меньшей мере, одного метода, известного в данной области техники, например, с помощью фенотипических количественных анализов, полногеномного секвенирования, анализа с использованием молекулярных маркеров, картирования признаков, «росписи» хромосомы, испытаний на аллелизм и тому подобного, или комбинации методов. Следует понимать, что могут быть охвачены также и трансгенные растения.

В контексте настоящего документа, термины «генная инженерия», «трансформация» и «генетическая модификация» используются как синонимы переноса выделенных и клонированных генов в ДНК, обычно в хромосомную ДНК или геном, другого организма.

Термины «трансгенные» или «генетически модифицированные организмы» (ГМО), в контексте настоящего документа, представляют собой организмы, генетический материал которых был изменен с использованием методов, обычно известных как «технология рекомбинантной ДНК». Технология рекомбинантной ДНК охватывает способность объединять молекулы ДНК из разных источников в одну молекулу *ex vivo* (например, в пробирке). Эта терминология, как правило, не охватывает организмы, генетическая композиция которых была изменена посредством обычного кроссбридинга или «мутационной» селекции, поскольку эти методы предшествуют открытию способов рекомбинантной ДНК. Термин «нетрансгенный», в контексте настоящего документа, относится к растениям и пищевым продуктам, полученным от растений, которые не являются «трансгенными» или «генетически модифицированными организмами», как определено выше.

Термин «трансген» или «химерный ген» относится к генетическому локусу, содержащему последовательность ДНК, например, рекомбинантный ген, который был введен в геном растения посредством трансформации, например, Agrobacterium-опосредованной трансформацией. Растение, содержащее трансген, стабильно интегрированный в его геном, называется «трансгенным растением».

Термин «редактирование генов» или «редактирование генома» относится к генной инженерии, при которой ДНК или РНК вставляют, удаляют, модифицируют или заменяют

в геноме живого организма. Редактирование генов может содержать целенаправленный или нецеленаправленный (случайный) мутагенез. Целенаправленный мутагенез может быть осуществлен, например, с помощью дизайнерских нуклеаз, таких как мегануклеазы, цинкпальцевые нуклеазы (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции кластеризованных регулярных промежуточных (TALEN), и системы палиндромных повторов (CRISPR/Cas9). Эти нуклеазы создают сайт-специфические двухцепочечные разрывы (DSB) в желаемых местах генома. Индуцированные двухцепочечные разрывы репарируются посредством негомологичного соединения концов (NHEJ) или гомологичной рекомбинации (HR), что приводит к целенаправленным мутациям или к модификациям нуклеиновой кислоты. Использование дизайнерских нуклеаз особенно подходит для генерации нокаутов или нокдаунов генов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, разработаны дизайнерские нуклеазы, которые специфически индуцируют мутацию в гене F35H, как описано в другом месте настоящего документа, например, для генерации мутированного гена F35H или нокаута гена F35H. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, разработаны дизайнерские нуклеазы, в частности, РНК-специфические системы CRISPR/Cas, которые специфически нацелены на mPHK F35H, например, для расщепления mPHK F35H и генерации нокдауна гена/mPHK/белка F35H. Системы доставки и экспрессии систем дизайнерских нуклеаз хорошо известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, нуклеаза или целенаправленная/сайт-специфическая/хоминг нуклеаза является, содержит, состоит по существу или состоит из (модифицированной) системы или комплекса CRISPR/Cas, (модифицированного) Cas, (модифицированного) белка цинкового пальца, (модифицированной) цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN), (модифицированного) эффектора, подобного факторам транскрипции (TALE), (модифицированной) эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции (TALEN) или (модифицированной) мегануклеазы. В изобретения, некоторых вариантах осуществления настоящего упомянутая (модифицированная) нуклеаза или целенаправленная/сайт-специфическая/хоминг нуклеаза является, содержит, состоит по существу или состоит из (модифицированной) РНКнаправляемой нуклеазы. Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, нуклеазы могут быть кодон-оптимизированными для экспрессии в растениях. В контексте настоящего документа, термин «нацеливание» выбранной последовательности нуклеиновой кислоты означает, что нуклеаза или комплекс нуклеаз действует специфическим для нуклеотидной последовательности образом. Например, в

контексте системы CRISPR/Саѕ, направляющая РНК способна к гибридизации с выбранной последовательностью нуклеиновой кислоты. В контексте настоящего документа, термин «гибридизация» или «гибридизирующийся» относится к реакции, в которой, по меньшей мере, один полинуклеотид вступает в реакцию с образованием комплекса, который стабилизируется посредством водородной связи между основаниями нуклеотидных остатков. Водородная связь может осуществляться посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику, связывания по Хугстину или любым другим специфическим для последовательности образом. Комплекс может содержать две цепи, образующие дуплексную структуру, три или более цепей, образующих мультицепочечный комплекс, одиночную самогибридизирующуюся цепь или любую их комбинацию. Реакция гибридизации может представлять собой этап в более экстенсивном процессе, таком как инициация PGR или расщепление полинуклеотида ферментом. Последовательность, способная к гибридизации с данной последовательностью, называется «комплементом» данной последовательности.

Редактирование генов может включать транзиентную, индуцибельную или конститутивную экспрессию систем или компонентов редактирования генов. Редактирование генов может включать геномную интеграцию или эписомальное присутствие систем или компонентов редактирования генов. Системы или компоненты редактирования генов могут быть предложены на векторах, таких как плазмиды, которые можно доставлять соответствующими средствами доставки, известными в данной области техники. Предпочтительными векторами являются экспрессионные векторы.

Для редактирования генов могут быть предложены рекомбинационные матрицы для осуществления гомологически направленной репарации (HDR). Например, генетический элемент может быть заменен посредством редактирования гена, в котором предложена рекомбинационная матрица. ДНК может быть разрезана выше и ниже последовательности, которая должна быть заменена. Таким образом, последовательность, подлежащую замене, вырезают из ДНК. Затем, посредством HDR, вырезанную последовательность заменяют матрицей. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL по настоящему изобретению, как описано в настоящем документе, может быть предложен на/в качестве матрицы. При конструировании системы таким образом, что двухцепочечные разрывы вводятся выше и ниже соответствующей области в геноме растения, не содержащего аллель QTL, эту область вырезают, и она может быть заменена матрицей, содержащей аллель QTL по настоящему изобретению. Таким образом, введение в растение аллеля QTL по настоящему изобретению не обязательно должно включать множественное

обратное скрещивание, в частности, у растения со специфическим генетическим фоном. Аналогичным образом, мутированный F35H по настоящему изобретению может быть предложен на/в качестве матрицы. Однако в большей степени преимуществом обладает вариант осуществления настоящего изобретения, в котором мутированный F35H по настоящему изобретению может быть сгенерирован без использования рекомбинационной матрицы, но исключительно посредством действия эндонуклеазы, приводящего к разрыву двухцепочечной ДНК, который репарируется посредством NHEJ, что приводит к генерированию инсерционно-делеционных мутаций.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, модификация или мутация нуклеиновой кислоты осуществляется посредством (модифицированной) системы эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALEN). Эффекторы, подобные активаторам транскрипции (TALE), могут быть сконструированы для связывания практически любой желаемой последовательности ДНК. Примерные редактирования генома с использованием системы TALEN можно найти, например, в работе Чермак Т., Дойл Э.Л., Кристиан М., Ван Л., Чжан Ю., Шмидт С. и соавт. Эффективный дизайн и сборка специально созданных TALEN и других конструкций на основе эффекторов TAL для нацеливания на ДНК. Nucleic Acids Res. 2011;39:e82; Чжан Ф., Конг Л., Лодато С., Косури С., Чёрч Г.М., Арлотта П. Эффективная конструкция сиквенсспецифических эффекторов TAL для модуляции транскрипции у млекопитающих. Nat ВіотеснпоІ. 2011;29:149–153 и в Патентах США №№: 8,450,471, 8,440,431 и 8,440,432, и все они определенным образом включены в настоящий документ посредством ссылки. Посредством дополнительных разъяснений, и без ограничения, TALE природного происхождения или «TALE дикого типа» представляют собой белки, связывающие нуклеиновые кислоты, секретируемые многочисленными видами протеобактерий. Полипептиды TALE содержат домен, связывающий нуклеиновые кислоты, состоящий из тандемных повторов высококонсервативных мономерных полипептидов, которые преимущественно имеют длину 33, 34 или 35 аминокислот и отличаются друг от друга, в основном, положениями аминокислот 12 и 13. В преимущественных вариантах осуществления настоящего изобретения, нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В контексте настоящего документа, термин «мономеры полипептидов» или «мономеры TALE» будет использоваться для обозначения высококонсервативных повторяющихся полипептидных последовательностей, находящихся в пределах домена, связывающего нуклеиновые кислоты TALE, а термин «пара вариабельных аминокислотных остатков» или «RVD» будет использоваться для обозначения высоковариабельных аминокислот в

положениях 12 и 13 мономеров полипептидов. Как предложено в настоящем изобретении, аминокислотные остатки RVD представлены с использованием однобуквенного кода IUPAC для аминокислот. Общее представление мономера TALE, который входит в ДНКсвязывающий домен, выглядит следующим образом: X1-11-(X12X13)-X14-33 или 34, или 35, где нижний индекс указывает на положение аминокислоты, а X представляет любую аминокислоту. X12X13 указывают на RVD. В некоторых мономерах полипептидов, вариабельной аминокислоты в положении 13 нет, или она отсутствует, и в таких мономерах полипентидов RVD состоят из одиночной аминокислоты. В таких случаях RVD могут быть альтернативно представлены как  $X^*$ , где X представляет X12, а (\*) указывает на то, что X13отсутствует. ДНК-связывающий домен содержит несколько повторов мономеров TALE, и это может быть представлено как (X1-11-(X12X13)-X14-33 или 34, или 35)г, где, в преимущественном варианте осуществления настоящего изобретения, z составляет, по меньшей мере, от 5 до 40. В другом преимущественном варианте осуществления настоящего изобретения, z составляет, по меньшей мере, от 10 до 26. Мономеры ТАLE обладают аффинностью связывания нуклеотидов, которая определяется по идентичности аминокислот в своих RVD. Например, мономеры полипептидов с RVD NI, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, связываются с аденином (A), мономеры полипептидов с RVD NG, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, связываются с тимином (Т), мономеры полипентидов с RVD HD, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, связываются с цитозином (С), а мономеры полипептидов с RVD NN, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, связываются как с аденином (A), так и с гуанином (G). В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, мономеры полипептидов с RVD IG, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, связываются с Т. Таким образом, количество и порядок повторов мономеров полипептидов в домене TALE, связывающем нуклеиновые кислоты, определяют целенаправленную специфичность его нуклеиновых кислот. Кроме того, в других вариантах осуществления настоящего изобретения, мономеры полипептидов с RVD NS распознают все четыре пары оснований и могут связываться с A, T, G или C. Структура и функция TALE описаны ниже, например, в работах Моску и соавт., Science 326:1501 (2009); Бох и соавт., Science 326:1509-1512 (2009); и Чжан и соавт., Nature Biotechnology 29:149-153 (2011), каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, модификация или мутация нуклеиновой кислоты осуществляется посредством (модифицированной) системы цинк-пальцевых (ZFN) нуклеаз. В системе ZFN используются искусственные рестрикционные ферменты, сгенерированные путем слияния ДНК-связывающего домена цинкового пальца с ДНК-расщепляющим доменом, который может быть сконструирован нацеливания на желаемые последовательности ДНК. Примерные способы редактирования генома с использованием системы ZFN можно найти, например, в Патентах США №№: 6,534,261, 6,607,882, 6,746,838, 6,794,136, 6,824,978, 6,866,997, 6,933,113, 6,979,539, 7,013,219, 7,030,215, 7,220,719, 7,241,573, 7,241,574, 7,585,849, 7,595,376, 6,903,185 и 6,479,626, и все они определенным образом включены в настоящий документ посредством ссылки. Посредством дополнительных разъяснений, и без ограничения, технология искусственного цинкового пальца (ZF) включает массивы модулей ZF для нацеливания на новые ДНК-связывающие сайты в геноме. Модуль каждого пальца в массиве ZF нацелен на три основания ДНК. Специально созданный массив отдельных цинкпальцевых доменов собран в белок ZF (ZFP). ZFP может содержать функциональный домен. Первые синтетические цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN) были разработаны путем слияния белка ZF с каталитическим доменом рестрикционного фермента типа IIS FokI. (Ким, Ю.Г. и соавт., 1994, Химерная рестрикционная эндонуклеаза, Proc. Natl. Acad. Sci. США 91, 883-887; Ким, Ю.Г. и соавт., 1996, Гибридные рестрикционные ферменты: слияния цинковых пальцев с доменом расщепления Fok I. Proc. Natl. Acad. Sci. США 93, 1156-1160). Повышенная специфичность расщепления может быть достигнута с пониженной нецеленаправленной активностью посредством использования парных гетеродимеров ZFN, которых каждый ИЗ нацелен на разные нуклеотидные последовательности, разделенные коротким спейсером. (Дойон, Ю. и соавт., 2011, нуклеазы Повышение активности цинк-пальцевой cулучшенной гетеродимерной архитектурой. Nat. Methods 8, 74-79). ZFP также могут быть сконструированы как активаторы и репрессоры транскрипции и используются для нацеливания на многие гены у самых разных организмов.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, модификация нуклеиновой кислоты осуществляется посредством (модифицированной) мегануклеазы, которая представляет собой эндодезоксирибонуклеазы, характеризующиеся крупным сайтом распознавания (последовательности двухцепочечной ДНК из 12-40 пар оснований). Примерный способ использования мегануклеаз можно обнаружить в патентах США №№:

8,163,514; 8,133,697; 8,021,867; 8,119,361; 8,119,381; 8,124,369; и 8,129,134, которые определенным образом включены в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, модификация нуклеиновой кислоты осуществляется посредством (модифицированного) комплекса или системы CRISPR/Cas. Что касается общей информации о системах CRISPR/Cas, их компонентах и доставке таких компонентов, включая способы, материалы, средства доставки, векторы, частицы, а также информации о их получении и использовании, в том числе о количестве и составах, а также о Cas9CRISPR/Cas-экспрессирующих эукариотических клетках, Cas-9CRISPR/Cas-экспрессирующих эукариотах, таких как у мыши, то приведена ссылка на: Патенты США №№: 8,999,641, 8,993,233, 8,697,359, 8,771,945, 8,795,965, 8,865,406, 8,871,445, 8,889,356, 8,889,418, 8,895,308, 8,906,616, 8,932,814, 8,945,839, 8,993,233 и 8,999,641; Патентные публикации США US 2014-0310830 (Регистрационный номер заявки США 14/105,031), US 2014-0287938 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/213,991), US 2014-0273234 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/293,674), US2014-0273232 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/290,575), US 2014-0273231 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/259,420), US 2014-0256046 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/226,274), US 2014-0248702 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/258,458), US 2014-0242700 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/222,930), US 2014-0242699 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/183,512), US 2014-0242664 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/104,990), US 2014-0234972 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/183,471), US 2014-0227787 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/256,912), US 2014-0189896 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/105,035), US 2014-0186958 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/105,017), US 2014-0186919 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/104,977), US 2014-0186843 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/104,900), US 2014-0179770 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/104,837), US 2014-0179006 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/183,486), US 2014-0170753 (Регистрационный номер заявки США 14/183,429); US 2015-0184139 (Регистрационный номер заявки США 14/324,960); 14/054,414 Европейские патентные заявки ЕР 2 771 468 (ЕР13818570.7), ЕР 2 764 103 (ЕР13824232.6) и ЕР 2 784 162 (EP14170383.5); и Патентные публикации PCT WO 2014/093661 (PCT/US2013/074743), WO (PCT/US2013/074790), 2014/093694 WO 2014/093595 (PCT/US2013/074611), WO 2014/093718 (PCT/US2013/074825), WO 2014/093709 (PCT/US2013/074812), WO (PCT/US2013/074691), 2014/093622 (PCT/US2013/074667), WO 2014/093635 WO 2014/093655 (PCT/US2013/074736), WO 2014/093712 (PCT/US2013/074819), WO

(PCT/US2013/074800), WO 2014/018423 (PCT/US2013/051418), WO 2014/093701 2014/204723 (PCT/US2014/041790), WO 2014/204724 (PCT/US2014/041800), WO 2014/204725 (PCT/US2014/041803), 2014/204726 (PCT/US2014/041804), WO WO 2014/204727 (PCT/US2014/041806), 2014/204728 (PCT/US2014/041808), WO WO 2014/204729 (PCT/US2014/041809), 2015/089351 (PCT/US2014/069897), WO WO 2015/089354 (PCT/US2014/069902), WO 2015/089364 (PCT/US2014/069925), WO (PCT/US2014/070068), (PCT/US2014/070127), 2015/089427 WO 2015/089462 WO 2015/089419 (PCT/US2014/070057), WO 2015/089465 (PCT/US2014/070135), WO 2015/089486 (PCT/US2014/070175), PCT/US2015/051691, PCT/US2015/051830. Также приведена ссылка на предварительные патентные заявки США 61/758,468; 61/802,174; 61/806,375; 61/814,263; 61/819,803 и 61/828,130, поданные 30 января 2013 года; 15 марта 2013 года; 28 марта 2013 года; 20 апреля 2013 года; 6 мая 2013 года и 28 мая 2013 года, соответственно. Также приведена ссылка на предварительную патентную заявку США 61/836,123, поданную 17 июня 2013 года. Дополнительно приведена ссылка на предварительные патентные заявки США 61/835,931, 61/835,936, 61/835,973, 61/836,080, 61/836,101 и 61/836,127, каждая из которых подана 17 июня 2013 года. Приведена еще одна ссылка на предварительные патентные заявки США 61/862,468 и 61/862,355, поданные 5 августа 2013 года; 61/871,301, поданную 28 августа 2013 года; 61/960,777, поданную 25 сентября 2013 года и 61/961,980, поданную 28 октября 2013 года. Также приведена ссылка на: PCT/US2014/62558, поданную 28 октября 2014 года, и предварительные патентные заявки США, Регистрационные номера: 61/915,148, 61/915,150, 61/915,153, 61/915,203, 61/915,251, 61/915,301, 61/915,267, 61/915,260 и 61/915,397, каждая из которых подана 12 декабря 2013 года; 61/757,972 и 61/768,959, поданные 29 января 2013 года и 25 февраля 2013 года; 62/010,888 и 62/010,879, обе поданы 11 июня 2014 года; 62/010,329, 62/010,439 и 62/010,441, каждая из которых подана 10 июня 2014 года; 61/939,228 и 61/939,242, каждая из которых подана 12 февраля 2014 года; 61/980,012, поданную 15 апреля 2014 года; 62/038,358, поданную 17 августа 2014 года; 62/055,484, 62/055,460 и 62/055,487, каждая из которых подана 25 сентября 2014 года; и 62/069,243, поданную 27 октября 2014 года. Приведена ссылка на заявку РСТ, в которой указаны, в частности, США, на заявку № PCT/US14/41806, поданную 10 июня 2014 года. Приведена ссылка на предварительную патентную заявку США 61/930,214, поданную 22 января 2014 года. Приведена ссылка на заявку РСТ, в которой указаны, в частности, США, на заявку № РСТ/US14/41806, поданную 10 июня 2014 года. Также упоминается заявка США 62/180,709, поданная 17 июня 2015 года, ЗАЩИЩЕННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК (PGRNA); Заявка США 62/091,455,

поданная 12 декабря 2014 года, ЗАЩИЩЕННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК (PGRNA); США 62/096,708, поданная 24 декабря 1214 года, ЗАЩИЩЕННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК (PGRNA); Заявки США 62/091,462, поданная 12 декабря 2014 года, 62/096,324, поданная 23 декабря 2014 года, 62/180,681, поданная 17 июня 2015 года и 62/237,496, поданная 5 октября 2015 года, НЕАКТИВНЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ ДЛЯ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ CRISPR; Заявка США 62/091,456, поданная 12 декабря 2014 года и 62/180,692, поданная 17 июня 2015 года, СОПРОВОЖДАЕМЫЕ И ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ ДЛЯ СИСТЕМ CRISPR-CAS; Заявка США 62/091,461, поданная 12 декабря 2014 года, ДОСТАВКА, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМ И КОМПОЗИЦИЙ CRISPR-CAS ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА В ОТНОШЕНИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (HSC); Заявка США 62/094,903, поданная 19 декабря 2014 года, ОБЪЕКТИВНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ РАЗРЫВОВ И ГЕНОМНАЯ ПЕРЕСТРОЙКА ПОСРЕДСТВОМ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЗАХВАЧЕННОЙ ИНСЕРЦИИ; Заявка США 62/096,761, поданная 24 декабря 2014 года, РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗИРОВАННЫХ СПОСОБОВ ФЕРМЕНТОВ, И СИСТЕМ, **НАПРАВЛЯЮЩИХ** КАРКАСОВ  $\mathbf{C}$ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ; Заявка США 62/098,059, поданная 30 декабря 2014 года, 62/181,641, поданная 18 июня 2015 года и 62/181,667, поданная 18 июня 2015 года, СИСТЕМА НАЦЕЛИВАНИЯ НА РНК; Заявка США 62/096,656, поданная 24 декабря 2014 и 62/181,151 от 17 июня 2015 года, CRISPR, ИМЕЮЩИЕ ИЛИ АССОЦИИРОВАННЫЕ С ДЕСТАБИЛИЗИРУЮЩИМИ ДОМЕНАМИ; Заявка США 62/096,697, поданная 24 декабря 2014 года, CRISPR, ИМЕЮШИЕ ИЛИ АССОЦИИРОВАННЫЕ С AAV; Заявка США 62/098,158, поданная 30 декабря 2014 года, РАЗРАБОТАННЫЕ ИНСЕРЦИОННЫЕ НАЦЕЛИВАЮЩИЕ СИСТЕМЫ КОМПЛЕКСА CRISPR; Заявка США 62/151,052, поданная 22 апреля 2015 года, КЛЕТОЧНОЕ НАЦЕЛИВАНИЕ ДЛЯ СОСТАВЛЕНИЯ ДАННЫХ ПО ВНЕКЛЕТОЧНЫМ ЭКЗОСОМАМ; Заявка США 62/054,490, поданная 24 сентября 2014 года, ДОСТАВКА, И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМ И КОМПОЗИЦИЙ **CRISPR-CAS** ДЛЯ НАЦЕЛИВАНИЯ HA ПАТОЛОГИИ И ЗАБОЛЕВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПОНЕНТОВ ДОСТАВКИ ЧАСТИЦ; Заявка США 61/939,154, поданная 12 февраля 2014 года, СИСТЕМЫ, СПОСОБЫ И МАНИПУЛЯЦИИ C ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ композиции ДЛЯ ПОСРЕДСТВОМ ОПТИМИЗИРОВАННЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ CRISPR- САЅ; Заявка США 62/055,484, поданная 25 сентября 2014 года, СИСТЕМЫ, СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ C ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ ПОСРЕДСТВОМ ОПТИМИЗИРОВАННЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ CRISPR-САЅ; Заявка США 62/087,537, поданная 4 декабря 2014 года, СИСТЕМЫ, СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ  $\mathbf{C}$ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ ПОСРЕДСТВОМ ОПТИМИЗИРОВАННЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ CRISPR-САЅ; Заявка США 62/054,651, поданная 24 сентября 2014 года, ДОСТАВКА, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМ И КОМПОЗИЦИЙ **CRISPR-CAS** МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ КОНКУРЕНЦИИ МНОЖЕСТВЕННЫХ МУТАЦИЙ РАКА В УСЛОВИЯХ *IN VIVO*; Заявка США 62/067,886, поданная 23 октября 2014 года, ДОСТАВКА, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМ И КОМПОЗИЦИЙ CRISPR-CAS ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ КОНКУРЕНЦИИ МНОЖЕСТВЕННЫХ МУТАЦИЙ РАКА В УСЛОВИЯХ *IN VIVO*; Заявки США 62/054,675, 24 сентября 14 года и 62/181,002, 17 июня 2015 года, ДОСТАВКА, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМ КОМПОЗИЦИЙ CRISPR-CAS В НЕЙРОНАХ/ТКАНЯХ; Заявка США 62/054,528, поданная 24 сентября 2014 года, ДОСТАВКА, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМ И КОМПОЗИЦИЙ CRISPR-CAS ПРИ ИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ИЛИ ПАТОЛОГИЯХ; Заявка США 62/055,454, поданная 25 сентября 2014 года, ДОСТАВКА, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМ И КОМПОЗИЦИЙ CRISPR-CAS ДЛЯ НАЦЕЛИВАНИЯ НА ПАТОЛОГИИ И ЗАБОЛЕВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕПТИДОВ, ПРОНИКАЮЩИХ В КЛЕТКИ (CPP); Заявка США 62/055,460, поданная 25 сентября 2014 года, МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ CRISPR И/ИЛИ ОПТИМИЗИРОВАННЫЕ, СЦЕПЛЕННЫЕ С ФЕРМЕНТАМИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ CRISPR; Заявка США 62/087,475, поданная 4 декабря 2014 года и 62/181,690, поданная 18 июня 2015 года, ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ПОСРЕДСТВОМ ОПТИМИЗИРОВАННЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ CRISPR-CAS; Заявка США 62/055,487, поданная 25 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ сентября 2014 года, ПОСРЕДСТВОМ ОПТИМИЗИРОВАННЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ CRISPR-CAS; Заявка США 62/087,546, поданная 4 декабря 2014 года и 62/181,687, поданная 18 июня 2015 года, МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ CRISPR И/ИЛИ ОПТИМИЗИРОВАННЫЕ, СЦЕПЛЕННЫЕ С ФЕРМЕНТАМИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ CRISPR; и заявка США 62/098,285, поданная 30 декабря 2014 года, CRISPR-ОПОСРЕДОВАННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ В УСЛОВИЯХ *IN VIVO* И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ РОСТА ОПУХОЛИ И МЕТАСТАЗОВ. Упоминаются заявки США 62/181,659, поданная 18 июня 2015 года и 62/207,318, поданная 19 августа 2015 года, РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМ, СПОСОБОВ, ФЕРМЕНТОВ И НАПРАВЛЯЮЩИХ КАРКАСОВ ОРТОЛОГОВ CAS9 И ВАРИАНТОВ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ. Упоминаются заявки США 62/181,663, поданная 18 июня 2015 года и 62/245,264, поданная 22 октября 2015 года, НОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ И СИСТЕМЫ CRISPR, заявки США 62/181,675, поданная 18 июня 2015 года и дело патентного реестра за № 46783.01.2128, поданное 22 октября 2015 года, НОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ И СИСТЕМЫ CRISPR, заявка США 62/232,067, поданная 24 сентября 2015 года, заявка США 62/205,733, поданная 16 августа 2015 года, заявка США 62/201,542, поданная 5 августа 2015 года, заявка США 62/193,507, поданная 16 июля 2015 года и заявка США 62/181,739, поданная 18 июня 2015 года, каждая из которых озаглавлена «НОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ И СИСТЕМЫ CRISPR», и заявка США 62/245,270, поданная 22 октября 2015 года, НОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ И СИСТЕМЫ CRISPR. Упоминаются также заявки США 61/939,256, поданная 12 февраля 2014 года и WO 2015/089473 (PCT/US2014/070152), поданная 12 декабря 2014 года, каждая из которых озаглавлена «РАЗРАБОТКА СИСТЕМ, СПОСОБОВ И ОПТИМИЗИРОВАННЫХ НАПРАВЛЯЮЩИХ КОМПОЗИЦИЙ ПОСРЕДСТВОМ НОВЫХ АРХИТЕКТУР ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ  $\mathbf{C}$ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ». Упоминаются также PCT/US2015/045504, поданная 15 августа 2015 года, заявка США 62/180,699, поданная 17 июня 2015 года и заявка США 62/038,358, поданная 17 августа 2014 года, каждая из которых озаглавлена «РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НИКАЗ CAS9». Европейская патентная заявка ЕР3009511. Также приведена ссылка на работу «Мультиплексная геномная инженерия с использованием систем CRISPR/Cas». Конг, Л., Рэн, Ф.А., Кокс, Д., Лин, С., Барретто, Р., Хабиб, Н., Сюй, П.Д., Ву, Х., Цзян, В., Марраффини, Л.А. и Чжан, Ф. Science, 15 февраля;339(6121):819-23 (2013); PHKнаправляемое редактирование бактериальных геномов с использованием систем CRISPR-Саѕ. Цзян В., Бикард Д., Кокс Д., Чжан Ф., Марраффини, Л.А. Nat Biotechnol, март;31(3):233-9 (2013); Одноэтапное генерирование мышей, несущих мутации во множестве генов, с помощью CRISPR/Cas-опосредованной геномной инженерии. Ван X., Ян Х., Шивалила К.С., Давлати М.М., Ченг А.В., Чжан Ф., Йениш Р. Cell, 9 мая; 153(4):910-8 (2013); Оптический контроль за эндогенной транскрипцией и эпигенетическими состояниями млекопитающих. Конерманн С., Бригхэм М.Д., Тревино А.Е., Сюй П.Д., Хайденрайх М., Конг Л., Платт Р.Дж., Скотт Д.А., Черч Г.М., Чжан Ф. Nature. 2013, 22

августа;500(7463):472-6. идентификатор цифрового объекта (doi): 10.1038/Nature12466. Электронная публикация 23 августа 2013 года; Двойное никование с помощью РНКнаправляемого Cas9 CRISPR для повышенной специфичности редактирования генома. Рэн, Ф.А., Сюй, П.Д., Лин, С.Ю., Гутенберг, Дж.С., Конерманн, С., Тревино, А.Е., Скотт, Д.А., Иноуэ, А., Матоба, С., Чжан, Ю. и Чжан Ф. Cell, 28 августа. уникальный идентификатор, применяемый издательством для идентификации научных работ (ріі): 8674(13)01015-5. (2013); Специфичность нацеливания на ДНК РНК-направляемых нуклеаз Cas9. Сюй, П., Скотт, Д., Вайнштейн, Дж., Рэн, Ф.А., Конерманн, С., Агарвала, В., Ли, Ю., Файн, Э., Ву, Х., Шалем, О., Крадик, Т.Дж., Марраффини, Л.А., Бао, Г. и Чжан, Ф. Nat Biotechnol doi:10.1038/nbt.2647 (2013); Геномная инженерия с использованием системы CRISPR-Cas9. Рэн, Ф.А., Сюй, П.Д., Райт, Дж., Агарвала, В., Скотт, Д.А., Чжан, Ф., Nature Protocols, ноябрь;8(11):2281-308. (2013); Полногеномный скрининг нокаутов CRISPR-Cas9 в клетках человека. Шалем О., Санджана, Нью-Йорк, Хартениан, Э., Ши, Х., Скотт, Д.А., Миккельсон, Т., Хекл, Д., Эберт, Б.Л., Рут, Д.Е., Доенч, Дж.Г., Чжан, Ф. Science, 12 декабря. (2013). [Электронная публикация до печати]; Кристаллическая структура саѕ9 в комплексе с направляющей РНК и ДНК-мишенью. Нисимасу, Х., Рэн, Ф.А., Сюй, П.Д., Конерманн, С., Шехата, С.И., Дохма, Н., Ишитани, Р., Чжан, Ф., Нуреки, О. Cell 27 февраля. (2014). 156(5):935-49; Полногеномное связывание эндонуклеазы Cas9 системы CRISPR в клетках млекопитающих. Ву Х., Скотт Д.А., Криз А.Дж., Чиу А.С., Сюй, П.Д., Дадон Д.Б., Ченг А.В., Тревино А.Е., Конерманн С., Чен С., Йениш Р., Чжан, Ф., Шарп П.А. Nat Biotechnol. (2014) 20 апреля. doi: 10.1038/nbt.2889; Нокин CRISPR-Cas9 мышей для редактирования генома и моделирования рака, Платт и соавт., Cell 159(2): 440-455 (2014) DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.014; Разработка и применение CRISPR-Cas9 для геномной инженерии, Сюй и соавт., Cell 157, 1262-1278 (5 июня 2014 года) (Сюй 2014); Генетические экраны в клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9, Ван и соавт., Science. 2014, 3 января; 343(6166): 80-84. doi:10.1126/science.1246981; Рациональная конструкция высокоактивных sgPHK для CRISPR-Cas9-опосредованной инактивации генов, Доенч и соавт., Nature Biotechnology 32(12):1262-7 (2014), опубликовано онлайн 3 сентября 2014 года; doi:10.1038/nbt.3026, и Исследование функции генов в мозге млекопитающих в условиях in vivo с использованием системы CRISPR-Cas9, Свич и соавт., Nature Biotechnology 33, 102-106 (2015), опубликовано онлайн 19 октября 2014 года; doi:10.1038/nbt.3055, Cpf1 - это единственная РНК-направляемая эндонуклеаза системы CRISPR-Cas класса 2, Цетше и соавт., Cell 163, 1-13 (2015); Открытие и функциональная характеристика разнообразных систем CRISPR-Cas класса 2, Шмаков и соавт., Mol Cell

60(3): 385-397 (2015); С2с2 — это однокомпонентный, программируемый, РНКнаправляемый, нацеленный на РНК, эффектор CRISPR, Абудайе и соавт., Science (2016)
опубликовано онлайн 2 июня 2016 года doi: 10.1126/science.aaf5573. Каждая из этих
публикаций, патентов, патентных публикаций и заявок, а также все документы,
цитируемые в них или в находящиеся в делопроизводстве по ним («документы, цитируемые
в заявке»), и все документы, цитируемые или приводимые в качестве ссылки в документах,
цитируемых в заявке, вместе с любыми инструкциями, описаниями, спецификациями
продуктов и паспортами продуктов в отношении любых продуктов, упомянутых в них, или
в любом из таких документов, и включенные в настоящий документ в качестве ссылки,
считаются настоящим включенными в настоящий документ в качестве ссылки и могут
использоваться для осуществления настоящего изобретения. Все документы (например,
указанные патенты, патентные публикации и заявки, а также документы, цитируемые в
заявке) включены в настоящий документ в качестве ссылки в той же степени, как если бы
каждый отдельный документ был определенным образом и отдельно указан, как
включенный в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, система или комплекс CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR/Cas класса 2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, упомянутая система или комплекс CRISPR/Cas является системой или комплексом CRISPR/Cas типа II, типа V или типа VI. Система CRISPR/Cas не требует генерации специально созданных белков для нацеливания на специфические последовательности, но скорее одиночный белок Cas может быть запрограммирован направляющей PHK (gPHK) для распознавания специфической нуклеиновой кислоты-мишени, другими словами, ферментный белок Cas может быть рекрутирован в интересующий локус специфической нуклеиновой кислоты-мишени (который может содержать или состоять из PHK и/или ДНК) с использованием упомянутой короткой направляющей PHK.

В целом, система CRISPR/Cas или CRISPR, в контексте вышеупомянутых документов, используемых в настоящем документе, в совокупности относится к транскриптам и другим элементам, участвующим в экспрессии или направляющим активность CRISPR-ассоциированных («Cas») генов, включая последовательности, кодирующие ген Cas и, по меньшей мере, одну из следующих: tracr (трансактивирующую CRISPR) последовательность (например, tracrPHK или активную частичную tracrPHK), tracr-mate (напарницу трансактивирующей) последовательность (охватывающую «прямой повтор» и частичный прямой повтор, процессированный tracrPHK, в контексте эндогенной

системы CRISPR), направляющую последовательность (также называемую «спейсером» в контексте эндогенной системы CRISPR) или «РНК», в том смысле, в котором этот термин используется в настоящем документе (например, РНК, служащие для направления Саѕ, такого как Cas9, например, PHK CRISPR, и там, где это применимо, трансактивирующую (tracr) РНК или одиночную направляющую РНК (sgPHK) (химерную РНК)), или другие последовательности и транскрипты из локуса CRISPR. В целом, система CRISPR характеризуется элементами, которые способствуют образованию комплекса CRISPR в сайте последовательности-мишени (также называемой протоспейсером в контексте эндогенной системы CRISPR). В контексте образования комплекса CRISPR, термин «последовательность-мишень» относится К последовательности, которой для сконструирована направляющая последовательность для комплементарности, при этом, гибридизация последовательностью-мишенью направляющей между И последовательностью способствует образованию комплекса CRISPR. Последовательностьмишень может содержать любой полинуклеотид, например, полинуклеотиды ДНК или РНК.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, gPHK представляет собой химерную направляющую PHK или одиночную направляющую PHK (sgPHK). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, gPHK содержит направляющую последовательность и tracr-mate последовательность (или прямой повтор). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, gPHK содержит направляющую последовательность, tracr-mate последовательность (или прямой повтор) и tracr последовательность. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, система или комплекс CRISPR/Cas, описанные в настоящем документе, не содержит и/или не зависит от присутствия tracr последовательности (например, если белок Cas представляет собой Cpf1).

В контексте настоящего документа, термин «crPHK» или «направляющая PHK», или «одиночная направляющая РНК», или «sgPHK», или «по меньшей мере, один компонент нуклеиновой кислоты» эффекторного белка локуса CRISPR/Cas, если применимо, содержит любую полинуклеотидную последовательность, имеющую достаточную комплементарность с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишенью, гибридизации с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишенью и для прямого сиквенс-специфического связывания комплекса, нацеленного на нуклеиновую кислоту, с нуклеиновой последовательностью кислоты-мишенью. В некоторых осуществления настоящего изобретения, степень комплементарности, при оптимальном

выравнивании с использованием подходящего алгоритма выравнивания составляет, примерно или более, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99%, или более. Оптимальное выравнивание может быть определено с использованием любого подходящего алгоритма для выравнивания последовательностей, неограничивающий пример которого включают алгоритм Смита-Уотермана, алгоритм Нидлмана-Вунша, алгоритмы, основанные на преобразовании Барроуза-Уилера (например, выравниватель Барроуза-Уилера), программы для множественного выравнивания последовательностей ClustalW, ClustalX, BLAST, Novoalign (Novocraft Technologies; доступно по адресу www.novocraft.com), ELAND (Illumina, Caн-Диего, Калифорния), SOAP (доступно по адресу soap.genomics.org.cn), и Maq (доступно по адресу maq.sourceforge.net). Способность направляющей последовательности (в пределах направляющей РНК, нацеленной на нуклеиновую кислоту) направлять сиквенс-специфическое связывание комплекса, нацеленного на нуклеиновую кислоту, к последовательности нуклеиновой кислотымишени может быть оценена с помощью любого подходящего количественного анализа.

Направляющая последовательность и, следовательно, направляющая нацеленная на нуклеиновую кислоту, могут быть выбраны для нацеливания на любую целевую последовательность нуклеиновой кислоты. Последовательность-мишень может представлять собой ДНК. Последовательность-мишень может представлять собой геномную ДНК. Последовательность-мишень может представлять собой митохондриальную ДНК. Последовательность-мишень может представлять собой любую последовательность РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, последовательность-мишень может представлять собой последовательность, находящуюся в пределах молекулы РНК, выбранной из группы, состоящей из информационной РНК (mPHK), предшественника мРНК (pre-mPHK), рибосомной РНК (rPHK), транспортной РНК (tPHK), микро-РНК (miPHK), малой интерферирующей РНК (siPHK), малой ядерной РНК (snPHK), малой ядрышковой РНК (snoPHK), двухцепочечной РНК (dsPHK), некодирующей РНК (псРНК), длинной некодирующей РНК (ІпсРНК) и малой цитоплазматической РНК (scPHK). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, последовательность-мишень может представлять собой последовательность, находящуюся в пределах молекулы РНК, выбранной из группы, состоящей из тРНК, ргеmPHK и rPHK. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, последовательность-мишень может представлять собой последовательность, находящуюся в пределах молекулы РНК, выбранной из группы, состоящей из псРНК и ІпсРНК. В некоторых более предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, последовательность-мишень может представлять собой последовательность, находящуюся в пределах молекулы mPHK или молекулы pre-mPHK.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, дРНК содержит петлю стебля, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, одиночную петлю стебля. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, последовательность прямого повтора образует петлю стебля, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, одиночную петлю стебля. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, длина спейсера направляющей РНК составляет от 15 до 35 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, длина спейсера направляющей РНК составляет, по меньшей мере, 15 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, длина спейсера составляет от 15 до 17 нуклеотидов, например, 15, 16 или 17 нуклеотидов, от 17 до 20 нуклеотидов, например, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов, от 20 до 24 нуклеотидов, например, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида, от 23 до 25 нуклеотидов, например, 23, 24 или 25 нуклеотидов, от 24 до 27 нуклеотидов, например, 24, 25, 26 или 27 нуклеотидов, от 27 до 30 нуклеотидов, например, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов, от 30 до 35 нуклеотидов, например, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 нуклеотидов, или 35 нуклеотидов, или более. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения, система CRISPR/Cas требует наличия tracrPHK. Последовательность «tracrPHK» или аналогичных терминов включает полинуклеотидную последовательность, которая обладает достаточной для гибридизации комплементарностью c последовательностью crPHK. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, комплементарности степень последовательностью tracrPHK и последовательностью crPHK по длине более короткой из двух при оптимальном выравнивании составляет, примерно или более, примерно, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97,5%, 99%, или более. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, tracr последовательность составляет, примерно или более, примерно, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50 или более нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, tracr последовательность и последовательность gPHK содержатся в пределах одного транскрипта, таким образом, в результате гибридизации между ними образуется транскрипт, имеющий вторичную структуру, такую как шпилька. В одном варианте изобретения, осуществления настоящего транскрипт или транскрибируемая полинуклеотидная последовательность имеет, по меньшей мере, две шпильки. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, транскрипт имеет

две, три, четыре или пять шпилек. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, транскрипт имеет не более пяти шпилек. В шпилечной структуре участок последовательности 5' конечного «N» и выше петли может соответствовать tracr-mate последовательности, а участок последовательности 3' петли, следовательно, соответствует tracr последовательности. В шпилечной структуре участок последовательности 5' конечного «N», и находящийся выше петли, может, в альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, соответствовать tracr последовательности, а участок последовательности 3' петли соответствует tracr-mate последовательности. В альтернативных вариантах осуществления настоящего изобретения, для системы СRISPR/Cas не требуется tracrPHK, что известно специалисту в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, направляющая РНК (способная направлять Саѕ к локусу-мишени) может содержать (1) направляющую последовательность, способную гибридизоваться с локусом-мишенью, и (2) tracr-mate последовательность или последовательность прямого повтора (в ориентации от 5' до 3' или, в альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, в ориентации от 3' до 5', в зависимости от типа белка Cas, что известно специалисту в данной области техники). В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения, белок CRISPR/Cas характеризуется тем, что он использует направляющую РНК, содержащую направляющую последовательность, способную гибридизоваться c локусом-мишенью последовательностью прямого повтора, и ему не требуется tracrPHK. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения, при этом, белок CRISPR/Cas характеризуется тем, что он использует tracrPHK, а направляющая последовательность, tracr-mate последовательность и tracr последовательность могут находиться в одиночной РНК, то есть, в sgРНК (расположенные в ориентации от 5' до 3' или, в альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, расположенные в ориентации от 3' до 5'), или tracr РНК может представлять собой РНК, отличную от РНК, содержащей направляющую и tracr-mate последовательность. В этих вариантах осуществления настоящего изобретения, tracr последовательность гибридизируется с tracr-mate последовательностью и направляет комплекс CRISPR/Cas к последовательности-мишени.

Как правило, в контексте эндогенной системы, нацеленной на нуклеиновую кислоту, образование комплекса, нацеленного на нуклеиновую кислоту (содержащего направляющую РНК, гибридизированную с последовательностью-мишенью и входящую в состав, по меньшей мере, одного эффекторного белка, нацеленного на нуклеиновую кислоту), приводит к модификации (например, к расщеплению) одной или обеих цепей

ДНК или РНК, находящихся в пределах или рядом (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 или более пар оснований) с последовательностью-мишенью. В контексте настоящего документа, термин «последовательность (последовательности), ассоциированная с интересующим локусом-мишенью» относится к последовательностям, находящимся рядом с последовательностью-мишенью (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 или более пар оснований от последовательности-мишени, при этом, последовательность-мишень содержится в интересующем локусе-мишени). Специалисту в данной области техники известны специфические сайты разреза, предназначенные для выбранных систем CRISPR/Cas, применительно к последовательности-мишени, которая, как это известно в данной области техники, может находиться в пределах последовательности-мишени или, в альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, в ориентации 3' или 5' последовательности-мишени.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, немодифицированный эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, может обладать активностью расщепления нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, нуклеаза, как описано в настоящем документе, может направлять расщепление одной или обеих цепей нуклеиновых кислот (ДНК, РНК или гибридов, которые могут быть одно- или двухцепочечными) в месте расположения или рядом с последовательностью-мишенью, например, в пределах последовательностимишени и/или пределах комплемента последовательности-мишени, последовательностей, ассоциированных с последовательностью-мишенью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, может направлять расщепление одной или обеих цепей ДНК или РНК, находящихся в пределах, примерно, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 500 или более пар оснований от первого или последнего нуклеотида последовательностимишени. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, расщепление может быть тупым (например, для Cas9, таких как SaCas9 или SpCas9). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, расщепление может быть ступенчатым (например, для Cpf1), то есть, с генерированием липких концов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, расщепление представляет собой ступенчатый разрез с 5' выступающими нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, расщепление представляет собой ступенчатый разрез с 5' выступающими нуклеотидами в количестве от 1 до 5 нуклеотидов, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, 4 или 5 нуклеотидов. В некоторых

вариантах осуществления настоящего изобретения, сайт расщепления находится выше РАМ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, сайт расщепления находится ниже РАМ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, который может быть мутирован по отношению к соответствующему ферменту дикого типа таким образом, что мутированный эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, будет лишен способности расщеплять одну или обе цепи ДНК или РНК полинуклеотида-мишени, содержащего последовательность-мишень. В качестве дополнительного примера, по меньшей мере, два каталитических домена белка Cas (например, домены RuvC I, RuvC II и RuvC III или домен HNH белка Cas9) могут быть мутированы для продуцирования мутированного белка Cas, по существу, полностью лишенного активности расщепления ДНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, можно считать, что эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, по существу, полностью лишен активности расщепления ДНК и/или РНК, когда активность расщепления мутированного фермента составляет, примерно, не более 25%, 10%, 5%, 1%, 0,1%, 0,01% или менее активности расщепления нуклеиновой кислоты фермента немутрированной формы; примером может служить случай, когда активность расщепления нуклеиновой кислоты фермента мутированной формы является нулевой или незначительной, по сравнению с ферментом немутрированной формы. В контексте настоящего документа, термин «модифицированный» Cas обычно относится к белку Cas, имеющему, по меньшей мере, одну модификацию или мутацию (включая точечные мутации, усечения, инсерции, делеции, химеры, белки слияния и так далее), по сравнению с белком Саѕ дикого типа, от которого он получен. Термин «получен» означает, что полученный фермент в значительной степени основан, по смыслу обладания высокой степенью гомологии последовательностей, на ферменте дикого типа, но был мутирован (модифицирован) каким-либо образом, известным в данной области техники или описанным в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, последовательность-мишень должна быть ассоциирована с РАМ (мотив, примыкающий к протоспейсеру) или PFS (последовательность, фланкирующая протоспейсер или сайт); то есть, с короткой последовательностью, распознаваемой комплексом CRISPR. Требования к точности и длине последовательностей для РАМ различаются в зависимости от используемого фермента CRISPR, но PAM обычно представляют собой последовательности из 2-5 пар оснований, примыкающие к протоспейсеру (то есть, к последовательности-мишени). Примеры последовательностей РАМ приведены в разделе

примеров ниже, а специалист в данной области техники сможет идентифицировать другие последовательности РАМ для использования с данным ферментом CRISPR. Кроме того, разработка домена взаимодействия с PAM (PI) может позволить программировать специфичность РАМ, повысить точность распознавания сайта-мишени и повысить универсальность Cas, такого как Cas9, платформы геномной инженерии. Белки Cas, такие как белки Cas9, могут быть разработаны для изменения их PAM-специфичности, например, как описано в работе Клейнстивер Б.П. и соавт. Разработанные нуклеазы CRISPR-Cas9 с измененной РАМ-специфичностью. Nature. 2015, 23 июля;523(7561):481-5. 10.1038/nature14592. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способ содержит возможность связывания комплекса CRISPR с полинуклеотидоммишенью для осуществления расщепления упомянутого полинуклеотида-мишени, модифицируя тем самым полинуклеотид-мишень, при этом, комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, связанный в комплекс с направляющей последовательностью, гибридизированной последовательностью-мишенью c пределах олотункмопу полинуклеотида-мишени, при этом, упомянутая направляющая последовательность сцеплена с tracr-mate последовательностью, которая, в свою очередь, гибридизируется с tracr последовательностью. Специалист в данной области техники поймет, что другие белки Cas могут быть модифицированы аналогичным образом.

Белок Cas, упомянутый в настоящем документе, например, без ограничения, Cas9, Cpf1 (Cas12a), C2c1 (Cas12b), C2c2 (Cas13a), C2c3, Cas13b, может происходить из любого подходящего источника и, следовательно, может включать различные ортологи, происходящие из множества (прокариотических) организмов, что в полной мере документально подтверждено в данной области техники. В некоторых вариантах изобретения, осуществления настоящего белок Cas представляет собой (модифицированный) Cas9, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, (модифицированный) Staphylococcus aureus Cas9 (SaCas9) или (модифицированный) Streptococcus pyogenes Cas9 (SpCas9). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, белок Cas представляет собой (модифицированный) Cpf1, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, Acidaminococcus sp., такой как Acidaminococcus sp. Cpf1 BV3L6 (AsCpf1) или Cpf1 Lachnospiraceae bacterium, такой как Lachnospiraceae bacterium MA2020 или Lachnospiraceae bacterium MD2006 (LbCpf1). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, белок Саѕ представляет собой (модифицированный) С2с2, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, Leptotrichia wadei

С2с2 (LwC2c2) или Listeria newyorkensis FSL M6-0635 C2c2 (LbFSLC2c2). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, (модифицированный) белок Саѕ представляет собой C2c1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, (модифицированный) белок Саѕ представляет собой C2c3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, (модифицированный) белок Саѕ представляет собой Cas13b.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, модификация нуклеиновой кислоты осуществляется случайным мутагенезом. Клетки или организмы могут подвергаться воздействию мутагенов, таких как УФ-излучение или мутагенные химические вещества (например, такие как этилметансульфонат (EMS)), а затем отбирают мутантов желаемыми характеристиками. Например, мутанты МОГУТ быть идентифицированы посредством метода TILLING (Нацеливание на индуцированные локальные повреждения в геномах). Этот метод сочетает в себе мутагенез, в частности, мутагенез с использованием химического мутагена, в частности, этилметансульфоната (EMS), и метод скрининга, чувствительного к ДНК, который идентифицирует мутации с одним основанием/точечные мутации в гене-мишени. Метод TILLING основан на образовании гетеродуплексов ДНК, которые образуются, когда множество аллелей амплифицируются посредством ПЦР, а затем нагревают и медленно охлаждают. При несовпадении двух цепей ДНК образуется «пузырь», который затем расщепляется одноцепочечными нуклеазами. Затем продукты разделяют по размеру, например, посредством ВЭЖХ. См. также Маккаллум, и соавт. «Скрининг, нацеленный на индуцированные мутации»; Nat Biotechnol. 2000, апрель; 18(4): 455-7 и Маккаллум, и соавт. «Нацеливание на индуцированные локальные повреждения в геномах (TILLING) для функциональной геномики растений»; Plant Physiol. 2000, июнь; 123(2):439-42.

РНК-интерференция (РНКі) представляет собой биологический процесс, в котором молекулы РНК ингибируют экспрессию или трансляцию генов, нейтрализуя молекулымишени mРНК. Два типа малых молекул рибонуклеиновой кислоты (РНК) — микро-РНК (mіРНК) и малая интерферирующая РНК (siRNA) — являются центральными для РНК-интерференции. РНК являются непосредственными продуктами генов, и эти малые РНК могут связываться с другими специфическими молекулами информационной РНК (mРНК) и либо повышать, либо понижать их активность, например, предотвращая трансляцию mРНК в белок. Путь РНКі обнаружен у многих эукариот, включая животных, и инициируется ферментом Дайсер (Dicer), который расщепляет молекулы длинных двухцепочечных РНК (dsPHK) на короткие двухцепочечные фрагменты, состоящие из,

примерно, 21 нуклеотида siRNA (малые интерферирующие PHK). Каждая siRNA разматывается на две одноцепочечные РНК (ssPHK), сопровождающую цепь и направляющую цепь. Сопровождающая цепь деградирует, а направляющая цепь включается в РНК-индуцированный сайленсинг-комплекс (RISC). Зрелые miPHK структурно схожи с siPHK, продуцированными из экзогенной dsPHK, но прежде чем miPHK должны подвергнуться обширной достичь зрелости, сначала посттранскрипционной модификации. miPHK экспрессируется из гораздо более длинного РНК-кодирующего гена в виде первичного транскрипта, известного как pri-miPHK, которая обрабатывается (в ядре клетки, до 70-нуклеотидной структуры «петля стебля», называемой рге-тіРНК) микропроцессорным комплексом. Этот комплекс состоит из фермента РНазы III, называемого Дроша (Drosha), и dsPHK-связывающего белка DGCR8. Участок dsPHK этой pre-miPHK связывается и расщепляется ферментом Дайсер для получения зрелой молекулы miPHK, которая может быть интегрирована в комплекс RISC; таким образом, miPHK и siPHK имеют одинаковый нисходящий клеточный механизм. Короткая шпилька РНК или малая шпилька РНК (shPHK/Шпилечный вектор) — это искусственная молекула РНК с крутым поворотом шпильки, которая может быть использована для сайленсинга экспрессии гена-мишени посредством РНК-интерференции. Наиболее хорошо изученным результатом является посттранскрипционный сайленсинг генов, который происходит, когда направляющая цепь спаривается с комплементарной последовательностью в молекуле информационной РНК и индуцирует расщепление посредством Argonaute 2 (Ago2), каталитическим компонентом RISC. В контексте настоящего документа, молекула РНКі может представлять собой siPHK, shPHK или miPHK. Следует понимать, что молекулы РНКі могут применяться как таковые к/в растении или могут кодироваться соответствующими векторами, из которых экспрессируется молекула РНКі. Системы доставки и экспрессии молекул РНКі, такие как siPHK, shPHK или miPHK, хорошо известны в данной области техники.

В контексте настоящего документа, термин «гомозигота» относится к отдельной клетке или растению, имеющему одинаковые аллели в, по меньшей мере, одном локусе или во всех локусах. Когда этот термин используется по отношению к специфическому локусу или гену, это означает, что, по меньшей мере, этот локус или ген имеет одинаковые аллели. В контексте настоящего документа, термин «гомозиготный» означает генетическое состояние, которое существует, когда идентичные аллели находятся в соответствующих локусах на гомологичных хромосомах. В контексте настоящего документа, термин «гетерозигота» относится к отдельной клетке или растению, имеющему разные аллели в,

по меньшей мере, одном локусе или во всех локусах. Когда этот термин используется по отношению к специфическому локусу или гену, это означает, что, по меньшей мере, этот локус или ген имеет разные аллели. В контексте настоящего документа, термин «гетерозиготный» означает генетическое состояние, которое существует, когда разные аллели находятся в соответствующих локусах на гомологичных хромосомах. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, QTL и/или, по меньшей мере, один маркер, описанный в настоящем документе, является гомозиготным. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, QTL и/или, по меньшей мере, один маркер, описанный в настоящем документе, является гетерозиготным. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL и/или, по меньшей мере, один маркерный аллель, описанный в настоящем документе, является гомозиготным. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL и/или, по меньшей мере, один маркерный аллель, описанный в настоящем документе, является гетерозиготным.

«Маркер» представляет собой (средство нахождения положения на карте) генетическую или физическую карту, или также сцепления между маркерами и локусами признаков (локусами, оказывающими отрицательное воздействие на Положение, которое определяет маркер, может быть известно посредством определения полиморфных аллелей и их генетического картирования или также посредством гибридизации, сопоставления совпадения последовательностей или амплификации последовательности, которая была физически картирована. Маркер может представлять собой маркер ДНК (определяет полиморфизмы ДНК), белок (определяет изменчивость в кодируемом полипептиде) или просто наследственный фенотип (такой как «восковой» Маркер фенотип). ДНК быть разработан нуклеотидной может на основе последовательности генома или на основе экспрессируемых нуклеотидных последовательностей (например, на основе сплайсированной РНК или сДНК). В зависимости от технологии маркеров ДНК, маркер может состоять из комплементарных фланкирующих локус, и/или из комплементарных зондов, которые гибридизуются с полиморфными аллелями в локусе. Термин «маркерный локус» означает локус (ген, последовательность или нуклеотид), который определяется маркером. Термин «маркер», или «молекулярный маркер», или «маркерный локус» также можно использовать для обозначения последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, которая является достаточно уникальной для характеристики конкретного локуса в геноме. Любой определяемый полиморфный признак может использоваться в качестве маркера, если он наследуется дифференциально и демонстрирует неравновесие по сцеплению с интересующим фенотипическим признаком.

Маркеры, определяющие генетические полиморфизмы между членами популяции, хорошо известны в данной области техники. Маркеры могут быть определены по типу полиморфизма, который они определяют, а также по маркерной технологии, используемой для определения полиморфизма. Типы маркеров включают, но этим не ограничиваются, например, определение полиморфизмов длин рестрикционных фрагментов (RFLP), определение изоферментных маркеров, случайно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD), полиморфизмов длин амплифицированных фрагментов (AFLP), определение простых повторяющихся последовательностей (SSR), определение амплифицированных вариабельных последовательностей генома растения, определение самоподдерживающейся репликации последовательностей, или определение одноуклеотидных полиморфизмов (SNP). SNP могут быть определены, например, посредством секвенирования ДНК, методами сиквенс-специфической амплификации на основе ПЦР, определением полинуклеотидных полиморфизмов посредством аллельспецифической гибридизации (ASH), динамической аллель-специфической гибридизации (DASH), посредством молекулярных маячков, гибридизации количественных анализов олигонуклеотидных лигаз, Флэп-эндонуклеаз, 5' эндонуклеаз, удлинения праймеров, одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP) или геля с использованием градиента температуры (TGGE). Преимущество секвенирования ДНК, в частности, технологии пиросеквенирования, состоит в том, что оно позволяет определить серию сцепленных аллелей SNP, составляющих гаплотип. Гаплотипы, как правило, являются более информативными (определяют более высокий уровень полиморфизма), по сравнению с SNP.

«Маркерный аллель», в альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения – «аллель маркерного локуса», может относиться к одной из множества полиморфных нуклеотидных последовательностей, обнаруженных в маркерном локусе у популяции. Применительно к маркеру SNP, аллель относится к специфическому нуклеотидному основанию, присутствующему в этом локусе SNP у этого отдельного растения.

Термин «тонкое картирование» относится к способам, посредством которых положение QTL может быть определено более точно (локализовано) и посредством которых размер фрагмента интрогрессии, содержащего QTL, уменьшается. Например, могут быть использованы Почти изогенные линии для QTL (QTL-NIL), которые содержат

различные, перекрывающиеся фрагменты фрагмента интрогрессии в пределах другого однородного генетического фона рекуррентного родителя. Затем такие линии могут быть использованы для картирования фрагмента, на котором расположен QTL, и для идентификации линии, имеющей более короткий фрагмент интрогрессии, содержащий QTL.

Термин «отбор с помощью маркера» (MAS) означает процесс, при котором отбирают отдельные растения на основе маркерных генотипов. Термин «контр-отбор с помощью маркера» означает процесс, с помощью которого маркерные генотипы используются для идентификации растений, которые не будут отобраны, что позволяет исключить их из программы селекции или посадки. При отборе с помощью маркера используется присутствие молекулярных маркеров, которые генетически сцеплены с определенным локусом или с определенной областью хромосомы (например, с фрагментом интрогрессии, трансгеном, полиморфизмом, мутацией и так далее), для отбора растений, у которых присутствует специфический локус или область (фрагмент интрогрессии, трансген, полиморфизм, мутация и так далее). Например, молекулярный маркер, генетически сцепленный с QTL перевариваемости, как определено в настоящем документе, может быть использован для определения и/или отбора растений, содержащих QTL на хромосоме 7. Чем ближе генетическое сцепление молекулярного маркера с локусом (например, примерно, 7 cM, 6 cM, 5 cM, 4 cM, 3 cM, 2 cM, 1 cM, 0,5 cM или менее), тем менее вероятно, что маркер диссоциирован от локуса посредством мейотической рекомбинации. Аналогичным образом, чем ближе два маркера сцеплены друг с другом (например, в пределах 7 или 5 сМ, 4 сМ, 3 сМ, 2 сМ, 1 сМ или менее), тем менее вероятно, что два маркера будут отделены друг от друга (и тем более вероятно, что они будут совместно сегрегироваться как единое целое). Маркер «в пределах 7 сМ или в пределах 5 сМ, 3 сМ, 2 сМ или 1 сМ» от другого маркера относится к маркеру, который генетически картирован в пределах 7 сМ или 5 сМ, 3 сМ, 2 сМ или 1 сМ от области, фланкирующей маркер (то есть, по обе стороны от маркера). Аналогичным образом, маркер в пределах 5 млн.п.о., 3 млн.п.о., 2,5 млн.п.о., 2 млн.п.о., 1 млн.п.о., 0,5 млн.п.о., 0,4 млн.п.о., 0,3 млн.п.о., 0,2 млн.п.о., 0,1 млн.п.о., 50 т.п.о., 20 т.п.о., 10 т.п.о., 5 т.п.о., 2 т.п.о., 1 т.п.о. или менее от другого маркера относится к маркеру, который физически расположен в пределах 5 млн.п.о., 3 млн.п.о., 2,5 млн.п.о., 2 млн.п.о., 1 млн.п.о., 0,5 млн.п.о., 0,4 млн.п.о., 0,3 млн.п.о., 0,2 млн.п.о., 0,1 млн.п.о., 50 т.п.о., 20 т.п.о., 10 т.п.о., 5 т.п.о., 2 т.п.о., 1 т.п.о. или менее от области геномной ДНК, фланкирующей маркер (то есть, по обе стороны от маркера). Термин «LOD-балл» (логарифм (основание 10) вероятности) относится к

статистическому тесту, часто используемому для анализа сцеплений в популяциях животных и растений. LOD-балл сравнивает вероятность получения тестовых данных, если два локуса (локус молекулярного маркера и/или локус фенотипического признака) действительно сцеплены, с вероятностью наблюдения одинаковых данных по чистой случайности. Положительные LOD-баллы свидетельствуют о присутствии сцепления, а LOD-балл, превышающий 3,0, считается доказательством сцепления. LOD-балл со значением +3 указывает на вероятность 1000 к 1, что наблюдаемое сцепление произошло не случайно.

Термин «маркерный гаплотип» относится к комбинации аллелей в маркерном локусе.

Термин «маркерный локус» означает место расположения специфической хромосомы в геноме вида, где может быть обнаружен специфический маркер. Маркерный локус может быть использован для отслеживания присутствия второго сцепленного локуса, например, локуса, который оказывает отрицательное влияние на экспрессию фенотипического признака. Например, маркерный локус может использоваться для мониторинга сегрегации аллелей в генетически или физически сцепленном локусе.

Термин «маркерный зонд» означает последовательность или молекулу нуклеиновой кислоты, которая может быть использована для идентификации присутствия маркерного локуса, например, зонда нуклеиновой кислоты, комплементарного последовательности маркерного локуса, посредством гибридизации нуклеиновой кислоты. Маркерные зонды, содержащие 30 или более непрерывных нуклеотидов маркерного локуса («вся или участок» последовательности маркерного локуса), могут быть использованы для гибридизации нуклеиновой кислоты. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, в некоторых аспектах, маркерный зонд относится к зонду любого типа, который способен различать (то есть, генотип) конкретный аллель, который присутствует в маркерном локусе.

Термин «молекулярный маркер» может использоваться для обозначения генетического маркера или его кодируемого продукта (например, белка), используемого в качестве исходной точки при идентификации сцепленного локуса. Маркер ДНК может быть получен из нуклеотидных последовательностей генома или из экспрессированных нуклеотидных последовательностей (например, из сплайсированной РНК или сДНК и так далее) или из кодируемого полипептида. Этот термин также относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые комплементарны или фланкируют маркерные последовательности, таким как нуклеиновые кислоты, используемые в качестве

зондов или пар праймеров, способных амплифицировать маркерную последовательность. Термин «молекулярный маркерный зонд» означает последовательность или молекулу нуклеиновой кислоты, которая может быть использована для идентификации присутствия маркерного локуса, например, зонда нуклеиновой кислоты, который комплементарен последовательности маркерного локуса. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, в некоторых аспектах, маркерный зонд относится к зонду любого типа, который способен различать (то есть, генотип) конкретный аллель, который присутствует в маркерном локусе. Нуклеиновые кислоты «комплементарны», когда они специфически гибридизуются в растворе, например, в соответствии с правилами спаривания оснований по Уотсону-Крику. Некоторые из маркеров, описанных в настоящем документе, также относятся к гибридизационным маркерам, когда они расположены в области индела, такой как неколлинеарная область, описанная в настоящем документе. Это связано с тем, что область инсерции, по определению, представляет собой полиморфизм по отношению к растению без инсерции. Таким образом, маркер должен только указывать, присутствует ли или отсутствует область индела. Для идентификации такого гибридизационного маркера может быть использована любая подходящая технология определения маркера, например, технология SNP используется в примерах, приведенных в настоящем документе.

«Генетические маркеры» представляют собой нуклеиновые кислоты, которые являются полиморфными в популяции, и аллели которых можно определить и выделить посредством, по меньшей мере, одного аналитического метода, например, RFLP, AFLP, изофермента, SNP, SSR и тому подобного. Термины «молекулярный маркер» и «генетический маркер» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Этот термин также относится к последовательностям нуклеиновых кислот, комплементарным геномным последовательностям, таким как нуклеиновые кислоты, используемые в качестве зондов. Маркеры, соответствующие генетическим полиморфизмам между членами популяции, могут быть определены методами, хорошо известными в данной области техники. Они включают, например, методы сиквенс-специфической амплификации на основе ПЦР, определение полиморфизмов длины рестрикционных фрагментов (RFLP), определение изоферментных маркеров, определение полинуклеотидных полиморфизмов аллель-специфической гибридизации посредством (ASH), определение амплифицированных вариабельных последовательностей генома растения, определение самоподдерживающейся репликации последовательностей, определение (SSR), повторяющихся последовательностей определение одноуклеотидных

полиморфизмов (SNP) или определение полиморфизмов длины амплифицированных фрагментов (AFLP). Также известны хорошо зарекомендовавшие себя методы для определения маркеров экспрессируемых последовательностей (EST) и маркеров SSR, полученных из последовательностей EST, и случайно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD).

Термин «полиморфизм» означает изменчивость в ДНК между, по меньшей мере, двумя особями в пределах популяции. Полиморфизм, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, имеет частоту встречаемости, составляющую, по меньшей мере, 1% в популяции. Полезный полиморфизм может включать однонуклеотидный полиморфизм (SNP), простую повторяющуюся последовательность (SSR) или полиморфизм инсерции/делеции, также называемый в настоящем документе «инделом». Термин «индел» относится к инсерции или делеции, при этом, одна линия может быть обозначена как имеющая вставленный нуклеотид или фрагмент ДНК относительно второй линии, или вторая линия может быть обозначена как имеющая удаленный нуклеотид или фрагмент ДНК относительно первой линии.

Термин «физическое расстояние» между локусами (например, между молекулярными маркерами и/или между фенотипическими маркерами) на одной и той же хромосоме означает фактическое физическое расстояние, выраженное в основаниях или парах оснований (п.о.), тысячах оснований или тысячах пар оснований (т.п.о.) или миллионах оснований или миллионах пар оснований (млн.п.о.).

«Генетическое расстояние» между локусами (например, между молекулярными маркерами и/или между фенотипическими маркерами) на одной и той же хромосоме измеряется частотой кроссинговера или частотой рекомбинаций (RF) и указывается в сантиморганах (сМ). Один сМ соответствует частоте рекомбинации 1%. Если рекомбинанты не обнаружены, то RF равна нулю, а локусы либо находятся очень близко друг к другу физически, либо они идентичны. Чем дальше два локуса находятся друг от друга, тем выше RF.

Термин «физическая карта» генома означает карту, показывающую линейный порядок идентифицируемых ориентиров (включая гены, маркеры и так далее) на ДНК хромосомы. Однако, в отличие от генетических карт, расстояния между ориентирами являются абсолютными (например, измеряются в парах оснований или в изолированных и перекрывающихся непрерывных генетических фрагментах) и не основаны на генетической рекомбинации (которая может варьироваться у разных популяций).

Аллель «отрицательно» коррелирует с признаком, когда он сцеплен с ним, и когда присутствие аллеля является показателем того, что желаемый признак или форма признака не будут встречаться в растении, содержащем этот аллель. Аллель «положительно» коррелирует с признаком, когда он сцеплен с ним, и когда присутствие аллеля является показателем того, что желаемый признак или форма признака будут встречаться в растении, содержащем этот аллель.

Сантиморган («сМ») представляет собой единицу измерения частоты рекомбинаций. Один сМ равен 1% вероятности того, что маркер в одном генетическом локусе будет отделен от маркера во втором локусе из-за кроссинговера в одном поколении.

В контексте настоящего документа, термин «хромосомный интервал» означает непрерывный линейный участок геномной ДНК, находящийся в растении на одной хромосоме. Генетические элементы или гены, расположенные на одном хромосомном интервале, физически сцеплены. Размер хромосомного интервала не является конкретно ограниченным. В некоторых аспектах, генетические элементы, расположенные в пределах одного хромосомного интервала, генетические сцеплены, как правило, с расстоянием генетической рекомбинации, например, менее или равным 20 сМ или, в альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, менее или равным 10 сМ. То есть, два генетических элемента в пределах одного хромосомного интервала подвергаются рекомбинации с частотой, менее или равной 20% или 10%.

Термин «тесно сцепленный», применяемый в настоящей заявке, означает, что рекомбинация между двумя сцепленными локусами происходит с частотой, менее или равной, примерно, 10% (то есть, они разделены на генетической карте расстоянием, составляющем не более 10 сМ). Другими словами, тесно сцепленные локусы совместно сегрегируются, по меньшей мере, в 90% случаев. Маркерные локусы особенно подходят для объекта настоящего изобретения, когда они демонстрируют значительную вероятность совместной сегрегации (сцепления) с желаемым признаком (например, устойчивость к серой пятнистости листьев). Тесно сцепленные локусы, такие как маркерный локус и второй локус, могут демонстрировать частоту межлокусной рекомбинации, составляющую 10% или менее, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения — примерно, 9% или менее, в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения — примерно, 7% или менее, в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения — примерно, 6% или менее, в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения — примерно, 6% или менее, в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения — примерно, 6% или менее, в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения — примерно, 6% или менее, в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения — примерно, 6% или менее, в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения — примерно, 6% или менее, в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения

– примерно, 5% или менее, в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – примерно, 4% или менее, в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – примерно, 3% или менее, и в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – примерно, 2% или менее. В особенно предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, соответствующие локусы демонстрируют рекомбинацию с частотой, составляющей, примерно, 1% или менее, например, примерно, 0,75% или менее, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – примерно, 0,5% или менее, или в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – примерно, 0,25% или менее. Также считается, что два локуса, расположенные на одной хромосоме, и на таком расстоянии, что рекомбинация между этими двумя локусами происходит с частотой, составляющей менее 10% (например, примерно, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25% или менее), «проксимальны» по отношению друг к другу. В некоторых случаях, два разных маркера могут иметь одинаковые координаты генетической карты. В этом случае, два маркера настолько тесно проксимальны по отношению друг к другу, что рекомбинация происходит между ними с такой низкой частотой, что ее невозможно определить.

Термин «сцепление» относится к тенденции аллелей совместно сегрегироваться чаще, чем это можно было бы ожидать вследствие случайности, если их трансмиссия была независимой. Как правило, сцепление относится к аллелям, находящимся на одной и той же хромосоме. Генетическая рекомбинация происходит с предполагаемой случайной частотой по всему геному. Генетические карты строят путем измерения частоты рекомбинации между парами признаков или маркеров. Чем теснее признаки или маркеры находятся друг к другу на хромосоме, тем ниже частота рекомбинации и тем выше степень сцепления. В настоящем документе признаки или маркеры рассматриваются как сцепленные, если они, как правило, совместно сегрегируются. Вероятность рекомбинации 1/100 на поколение определяется как расстояние генетической карты, составляющее 1,0 сантиморган (1,0 cM). Термин «неравновесие по сцеплению» относится к неслучайной сегрегации генетических локусов или признаков (или и того, и другого). В любом случае, неравновесие по сцеплению подразумевает, что соответствующие локусы находятся в пределах достаточной физической проксимальности по длине хромосомы, благодаря чему они совместно сегрегируются чаще, чем со случайной частотой (то есть, с неслучайной частотой). Маркеры, которые показывают неравновесие по сцеплению, считаются сцепленными. Сцепленные локусы совместно сегрегируются более чем в 50% случаев,

например, в диапазоне от, примерно, 51% до, примерно, 100% случаев. Другими словами, два маркера, которые совместно сегрегируются, имеют частоту рекомбинации, составляющую менее 50% (и, по определению, они разделены расстоянием, составляющем менее 50 сМ, в одной и той же группе сцепления.) В контексте настоящего документа, сцепление может присутствовать между двумя маркерами или, в альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, между маркером и локусом, оказывающим отрицательное влияние на фенотип. Маркерный локус может быть «ассоциирован с» (сцеплен с) признаком. Степень сцепления маркерного локуса и локуса, оказывающего отрицательное влияние на фенотипический признак, измеряется, например, как статистическая вероятность совместной сегрегации этого молекулярного маркера с фенотипом (например, F-статистика или LOD-балл).

Генетические элементы или гены, расположенные на одном сегменте хромосомы, физически сцеплены. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, два локуса расположены в непосредственной близости, таким образом рекомбинация между гомологичными парами хромосом не происходит между двумя локусами во время мейоза с высокой частотой случаев, например, с такой частотой, что сцепленные локусы совместно сегрегируются, по меньшей мере, примерно, в 90% случаев, например, в 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,75% случаев, или более. Генетические элементы, расположенные в пределах хромосомного сегмента, также «генетически сцеплены», как правило, в пределах расстояния генетической рекомбинации, которое менее или равно 50 сМ, например, примерно, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,75, 0,5, 0,25 сМ или менее. То есть, два генетических элемента в пределах одного хромосомного сегмента подвергаются рекомбинации во время мейоза друг с другом с частотой случаев, которая менее или равна, примерно, 50%, например, примерно, 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25% случаев или менее. «Тесно сцепленные» маркеры отображают частоту пересечения с заданным маркером, составляющую, примерно, 10% случаев или менее, например, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25% случаев или менее (данный маркерный локус находится в пределах, примерно, 10 сМ от тесно сцепленного маркерного локуса, например, в пределах 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,75, 0,5, 0,25 сМ или менее от тесно сцепленного маркерного локуса). Иными словами, тесно сцепленные маркерные локусы совместно

сегрегируются, по меньшей мере, примерно, в 90% случаев, например, в 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,75% случаев или более.

В контексте настоящего документа, термин «идентичность последовательностей» относится к степени идентичности между любой данной последовательностью нуклеиновой кислоты и последовательностью нуклеиновой кислоты-мишенью. Процент последовательностей вычисляют путем определения совпадающих положений в выровненных последовательностях нуклеиновых кислот, деления количества совпадающих положений на общее количество выровненных нуклеотидов и умножения на 100. Совпадающее положение относится к положению, когда идентичные нуклеотиды встречаются в одном и том же положении в выровненных последовательностях нуклеиновых кислот. Процент идентичности последовательностей также может быть определен для любой аминокислотной последовательности. Для определения процента идентичности последовательностей, целевая последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотную последовательность-мишень сравнивают с идентифицированной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью c использованием программы **BLAST** 2 Sequences (Последовательности) (Bl2seq) из автономной версии BLASTZ, содержащей BLASTN и BLASTP. Эту автономную версию BLASTZ можно приобрести на веб-сайте компании Fish & Richardson (World Wide Web по адресу fr.com/blast) или на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации правительства США (World Wide Web по адресу ncbi.nlm.nih.gov). Инструкции, объясняющие, как пользоваться программой Bl2seq, можно найти в файле «readme», прилагаемом к BLASTZ. BI2seq выполняет сравнение двух последовательностей с использованием алгоритма BLASTN или BLASTP.

ВLASTN используется для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, а ВLASTP используется для сравнения аминокислотных последовательностей. Для сравнения двух последовательностей нуклеиновых кислот, параметры устанавливаются следующим образом: -і устанавливается в файл, содержащий первую последовательность нуклеиновой кислоты, подлежащую сравнению (например, C:\seq l .txt); -ј устанавливается в файл, содержащий вторую последовательность нуклеиновой кислоты, подлежащую сравнению (например, C:\seq2.txt); -р устанавливается в blastn; -о устанавливается в файл с любым желаемым именем (например, C:\output.txt); -q устанавливается на - 1 ; -г устанавливается на 2; а для всех остальных параметров остаются их значения, установленные по умолчанию. Следующая команда будет генерировать выходной файл, содержащий сравнение двух последовательностей: C:\B12seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p

blastn -o c:\output.txt -q - 1 -r 2. Если последовательность-мишень имеет гомологию с любым участком идентифицированной последовательности, то указанный выходной файл будет представлять эти области гомологии как выровненные последовательности. Если последовательность-мишень не имеет гомологию с любым участком идентифицированной последовательности, то указанный выходной файл не будет представлять эти области гомологии как выровненные последовательности. После выравнивания, определяют длину путем подсчета количества последовательных нуклеотидов из последовательностимишени, представленной в выравнивании с последовательностью из идентифицированной последовательности, начиная с любого совпадающего положения и заканчивая любым другим совпадающим положением. Совпадающее положение представляет собой любое положение, в котором идентичный нуклеотид представлен как в последовательностимишени, так и в идентифицированной последовательности. Гэпы, представленные в последовательности-мишени, не учитываются, поскольку гэпы не являются нуклеотидами. Аналогичным образом, гэпы, представленные в идентифицированной последовательности, не учитываются, поскольку учитываются нуклеотиды последовательности-мишени, а не нуклеотиды из идентифицированной последовательности. Процент идентичности по определенной длине определяют путем подсчета количества совпадающих положений по этой длине и деления этого количества на длину, а затем умножения полученного значения на 100. Например, если (і) целевая последовательность нуклеиновой кислоты с основанием из 500 нуклеотидов сравнивают с рассматриваемой последовательностью нуклеиновой кислоты, (ii) программа Bl2seq представляет 200 оснований из последовательностимишени, выровненной с областью рассматриваемой последовательности, где первое и последнее основания этой области из 200 оснований совпадают, и (ііі) количество совпадений по этим 200 выровненным основаниям равно 180, то последовательность нуклеиновой кислоты-мишени с основанием из 500 нуклеотидов имеет длину 200, а идентичность последовательности по этой длине составляет 90% (то есть, 180 / 200 x 100 = 90). Понятно, что каждая из различных областей в пределах одиночной последовательности нуклеиновой кислоты-мишени, выровненной С идентифицированной последовательностью, может иметь свой собственный процент идентичности. Следует отметить, что значение процента идентичности округляется до ближайшей десятой доли. Например, 78,11, 78,12, 78,13 и 78,14 округляются до 78,1, а 78,15, 78,16, 78,17, 78,18 и 78,19 округляются до 78,2. Также следует отметить, что значение длины всегда будет целым числом.

Термин «выделенная последовательность нуклеиновой кислоты» или «выделенная ДНК» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая больше не находится в естественной среде, из которой она была выделена, например, последовательность нуклеиновой кислоты в бактериальной клетке-хозяине или в ядерном, или пластидном геноме растения. При упоминании в настоящем документе термина «последовательность», подразумевается, что имеется в виду молекула, имеющая такую последовательность, например, молекула нуклеиновой кислоты. «Клетка-хозяин» или «рекомбинантная клетка-хозяин», или «трансформированная клетка» – это термины, относящиеся к новой отдельной клетке (или организму), возникающей в результате введения в упомянутую клетку, по меньшей мере, одной молекулы нуклеиновой кислоты. Клетка-хозяин, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, является растительной клеткой или бактериальной клеткой. Клетка-хозяин может содержать нуклеиновую кислоту в виде экстрахромосомно (эписомально) реплицирующейся молекулы, или она содержит нуклеиновую кислоту, интегрированную в ядерный или пластидный геном клетки-хозяина, или в виде введенной хромосомы, например, мини-хромосомы.

Когда упоминается последовательность нуклеиновой кислоты (например, ДНК или геномной ДНК), имеющая «в значительной степени идентичность последовательностей» с эталонной последовательностью или имеющая идентичность последовательностей, составляющую, по меньшей мере, 80%>, например, по меньшей мере, 85%, 90%, 95%, 98%> или 99% идентичность последовательностей нуклеиновой кислоты с эталонной последовательностью, то в одном варианте осуществления настоящего изобретения, упомянутая нуклеотидная последовательность считается в значительной степени идентичной данной нуклеотидной последовательности и может быть идентифицирована с использованием жестких условий гибридизации. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты содержит, по меньшей мере, одну мутацию, по сравнению с данной нуклеотидной последовательностью, однако ее можно идентифицировать с использованием жестких условий гибридизации. «Жесткие условия гибридизации» могут быть использованы для идентификации нуклеотидных последовательностей, которые в значительно степени идентичны данной нуклеотидной последовательности. Жесткие условия зависят от последовательности, и в разных обстоятельствах они будут различными. Как правило, жесткие условия выбирают с учетом температуры, которая, должна быть примерно, на 5° С ниже температуры плавления (Tm) для специфических последовательностей при определенной ионной силе и рН. Тт представляет собой температуру (при определенной ионной силе и рН), при которой 50%

последовательности-мишени гибридизуются с идеально совпадающим зондом. Как правило, выбирают жесткие условия, при которых концентрация соли составляет, примерно, 0,02 моляра при рН 7 и температуре, составляющей, по меньшей мере, 60° С. Снижение концентрации соли и/или повышение температуры повышает жесткость. Жесткие условия гибридизации РНК-ДНК (Нозерн-блоты с использованием зонда, состоящего из, например, 100 нуклеотидов) представляют собой, например, такие условия, которые включают, по меньшей мере, одну промывку в 0,2 х SSC при 63° С в течение 20 минут или эквивалентные условия. Жесткие условия гибридизации ДНК-ДНК (Саузерн-блоты с использованием зонда, состоящего из, например, 100 нуклеотидов) представляют собой, например, такие условия, которые включают, по меньшей мере, одну промывку (обычно 2) в 0,2 х SSC при температуре, составляющей, по меньшей мере, 50° С, обычно, примерно, 55° С, в течение 20 мин или эквивалентные условия. См. также Сэмбрук и соавт. (1989) и Сэмбрук и Рассел (2001).

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры А и/или В, при этом, молекулярные маркеры А и В представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, С, соответствующий положению 125861690, и А, соответствующий положению 126109267, или которые представляют собой, соответственно, Т, соответствующий положению 125861690, и G, соответствующий положению 126109267, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами А и/или В; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров А и/или В.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры А и/или В, при этом, молекулярные маркеры А и В представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, С, соответствующий положению 125861690, и А, соответствующий положению 126109267, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом,

указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами A и/или B; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров A и/или B.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры А и/или В, при этом, молекулярные маркеры А и В представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, Т, соответствующий положению 125861690, и G, соответствующий положению 126109267, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами А и/или В; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров А и/или В.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярный маркер A, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярным маркером A; или скрининг на присутствие молекулярного маркера A.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярный маркер B, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярным маркером В; или скрининг на присутствие молекулярного маркера В.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры А и В, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами А и В; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров А и В.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярный маркер А, при этом, молекулярный маркер А представляет собой SNP, который представляет собой C, соответствующий положению 125861690, или который представляет собой T, соответствующий положению 125861690, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярным маркером А; или скрининг на присутствие молекулярного маркера А.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярный маркер В, при этом, молекулярный маркер В представляет собой SNP, который представляет собой A, соответствующий положению 126109267, или который представляет собой G, соответствующий положению 126109267, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярным маркером В; или скрининг на присутствие молекулярного маркера В.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры А и В, при этом, молекулярные маркеры А и В представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, С, соответствующий положению 125861690, и А, соответствующий положению 126109267, или которые представляют собой, соответственно, Т, соответствующий положению 125861690, и G, соответствующий положению 126109267, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами A и B; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров А и В.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему

скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярный маркер A, при этом, молекулярный маркер A представляет собой SNP, который представляет собой C, соответствующий положению 125861690, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярным маркером A; или скрининг на присутствие молекулярного маркера A.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярный маркер В, при этом, молекулярный маркер В представляет собой SNP, который представляет собой A, соответствующий положению 126109267, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярным маркером В; или скрининг на присутствие молекулярного маркера В.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры А и В, при этом, молекулярные маркеры А и В представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, С, соответствующий положению 125861690, и А, соответствующий положению 126109267, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами А и В; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров А и В.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярный маркер A, при этом, молекулярный маркер A представляет собой SNP, который представляет собой T, соответствующий положению 125861690, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно,

при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярным маркером A; или скрининг на присутствие молекулярного маркера A.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярный маркер В, при этом, молекулярный маркер В представляет собой SNP, который представляет собой G, соответствующий положению 126109267, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярным маркером В; или скрининг на присутствие молекулярного маркера В.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры А и В, при этом, молекулярные маркеры А и В представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, Т, соответствующий положению 125861690, и G, соответствующий положению 126109267, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами А и В; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров А и В.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры А и/или F, при этом, молекулярные маркеры А и F представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, C, соответствующий положению 125861690, и C, соответствующий положению 130881551, или которые представляют собой, соответственно, T, соответствующий положению 125861690, и T, соответствующий положению 130881551, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами А и/или F; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров А и/или F.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры А и/или F, при этом, молекулярные маркеры А и F представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, C, соответствующий положению 125861690, и C, соответствующий положению 130881551, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами А и/или F; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров А и/или F.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры А и/или F, при этом, молекулярные маркеры A и F представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, T, соответствующий положению 125861690, и T, соответствующий положению 130881551, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами A и/или F; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров А и/или F.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярный маркер F, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярным маркером F; или скрининг на присутствие молекулярного маркера F.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры А и F, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами A и F; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров A и F.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярный маркер F, при этом, молекулярный маркер F представляет собой SNP, который представляет собой C, соответствующий положению 130881551, или который представляет собой T, соответствующий положению 130881551, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярным маркером F; или скрининг на присутствие молекулярного маркера F.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры А и F, при этом, молекулярные маркеры A и F представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, С, соответствующий положению 125861690, и С, 130881551, соответствующий положению или которые представляют соответственно, Т, соответствующий положению 125861690, и Т, соответствующий положению 130881551, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами A и F; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров А и Г.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярный маркер В, при этом, молекулярный маркер В представляет собой SNP, который представляет собой A, соответствующий положению 126109267, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярным маркером В; или скрининг на присутствие молекулярного маркера В.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в

генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры A и F, при этом, молекулярные маркеры A и F представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, C, соответствующий положению 125861690, и C, соответствующий положению 130881551, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами A и F; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров A и F.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярный маркер F, при этом, молекулярный маркер F представляет собой SNP, который представляет собой T, соответствующий положению 130881551, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярным маркером F; или скрининг на присутствие молекулярного маркера F.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры А и В, при этом, молекулярные маркеры А и F представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, Т, соответствующий положению 125861690, и Т, соответствующий положению 130881551, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами А и F; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров А и F.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры C, D и/или E, при этом, молекулярные маркеры C, D и E представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, A, соответствующий положению 125976029, A, соответствующий положению 127586792, и C, соответствующий положению 129887276, или которые

представляют собой, соответственно, G, соответствующий положению 125976029, G, соответствующий положению 127586792, T, соответствующий положению 129887276, см. эталонный геном AGPv2 B73; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров C, D и/или E.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры C, D и/или E, при этом, молекулярные маркеры C, D и E представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, A, соответствующий положению 125976029, A, соответствующий положению 129887276, см. эталонный геном AGPv2 B73; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров C, D и/или E.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры C, D и/или E, при этом, молекулярные маркеры C, D и E представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, G, соответствующий положению 125976029, G, соответствующий положению 129887276, см. эталонный геном AGPv2 B73; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров C, D и/или E.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL содержит молекулярные маркеры A, B, C, D, E и/или F, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, все маркеры.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL содержит молекулярный маркер А. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL содержит молекулярный маркер В. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL содержит молекулярный маркер С. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL содержит молекулярный маркер D. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL содержит молекулярный маркер Е. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL содержит молекулярный маркер F.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллели молекулярных маркеров A, B, C, D, E и F представлены в Таблице A.

Таблица А

Идентификатор маркера	Хромосома	AGPv04	AGPv02	А_Вызов	В_Вызов	SEQ ID NO:
A	7	129798239	125861690	cyt	thy	50
В	7	129919413	125976029	ade	gua	52
С	7	130053680	126109267	ade	gua	51
D	7	131558094	127586792	ade	gua	53
E	7	133928553	129887276	cyt	thy	54
F	7	134903902	130881551	cyt	thy	55

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры A, B, C, D, E и/или F, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, все маркеры; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров A, B, C, D, E и/или F.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры A, B, C, D, E и/или F, в предпочтительном варианте осуществления

настоящего изобретения, все маркеры; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров A, B, C, D, E и/или F; при этом, молекулярные маркеры A, B, C, D, E и F представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, C, соответствующий положению 125861690, A, соответствующий положению 126109267, A, соответствующий положению 125976029, A, соответствующий положению 127586792, C, соответствующий положению 129887276, и C, соответствующий положению 130881551, или которые представляют собой, соответственно, T, соответствующий положению 125861690, G, соответствующий положению 126109267, G, соответствующий положению 125976029, G, соответствующий положению 127586792, T, соответствующий положению 129887276, и T, соответствующий положению 130881551, см. эталонный геном AGPv2 B73.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры A, B, C, D, E и/или F, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, все маркеры; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров A, B, C, D, E и/или F; при этом, молекулярные маркеры A, B, C, D, E и F представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, C, соответствующий положению 125861690, A, соответствующий положению 126109267, A, соответствующий положению 125976029, A, соответствующий положению 127586792, C, соответствующий положению 129887276, и C, соответствующий положению 130881551, см. эталонный геном AGPv2 B73.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7 (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), при этом, указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры A, B, C, D, E и/или F, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, все маркеры; или скрининг на присутствие молекулярных маркеров A, B, C, D, E и/или F; при этом, молекулярные маркеры A, B, C, D, E и F представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, T, соответствующий положению 125861690, G, соответствующий положению 126109267, G, соответствующий положению 12586792, T,

соответствующий положению 129887276, и T, соответствующий положению 130881551, см. эталонный геном AGPv2 B73.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способы в соответствии с настоящим изобретением, описанные в настоящем документе, представляют собой способы идентификации растений (или частей растений), обладающих повышенной засухостойкостью или засухоустойчивостью.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способы в соответствии с настоящим изобретением, описанные в настоящем документе, представляют собой способы идентификации растений (или частей растений), обладающих пониженной засухостойкостью или засухоустойчивостью.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способы в соответствии с настоящим изобретением, описанные в настоящем документе, представляют собой способы идентификации растений (или частей растений), обладающих повышенным изотопным составом углерода ( $\delta 13$ C).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способы в соответствии с настоящим изобретением, описанные в настоящем документе, представляют собой способы идентификации растений (или частей растений), обладающих пониженным изотопным составом углерода (δ13С).

Следует понимать, что всякий раз, когда в настоящем документе приводится ссылка на конкретный молекулярный маркер (аллель), например, на идентификацию конкретного молекулярного маркера (аллеля), то молекулярный маркер (аллель) в равной степени может быть идентифицирован на основе последовательности, как указано в настоящем документе (например, последовательности, указанной в Таблице А), а также на основе комплементарной последовательности (то есть, соответствующего нуклеотида в комплементарной цепи ДНК).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способы, описанные в настоящем документе, содержат этап выделения генетического материала из растения или части растения, например из, по меньшей мере, одной клетки растения или части растения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способы, в настоящем документе, содержат этап отбора растения или части растения, в котором присутствует аллель QTL или молекулярный маркер (аллель).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способы, описанные в настоящем документе, содержат этап выделения генетического материала из

растения или части растения, например, из, по меньшей мере, одной клетки растения или части растения и этап отбора растения или части растения, в котором присутствует аллель QTL или молекулярный маркер (аллель).

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, содержащему (например, в материале, выделенном из растения или части растения) анализ (белка и/или mPHK) уровня экспрессии и/или активности (белка), и/или последовательности гена, содержащегося в QTL, в соответствии с настоящим изобретением, как определено в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способ содержит генетический материал, выделенный из, по меньшей мере, одной клетки растения или части растения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, уровень экспрессии, активность и/или последовательность сопоставлена с уровнем экспрессии, активностью и/или последовательностью эталонного растения (части).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, уровень экспрессии и/или активность сопоставлена с заданным пороговым значением уровня экспрессии и/или активности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пороговое значение указывает на засухостойкость/засухоустойчивость и/или δ13С (например, выражения «выше или ниже порогового значения» относятся к повышенной или пониженной засухостойкости/засухоустойчивости).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, уровень экспрессии и/или активность сопоставлена между различными условиями, например, между контрольными условиями и условиями засухи.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу генерирования или модификации растения кукурузы, содержащему изменение уровня экспрессии и/или активности, по меньшей мере, одного гена, содержащегося в QTL, в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе. Способы изменения экспрессии и/или активности генов описаны в настоящем документе в другом месте (например, siPHK, нокаут, редактирование генома, контроль транскрипции или трансляции, мутагенез, сверхэкспрессия и так далее) и известны в данной области техники. Специалист в данной области техники поймет, что уровень экспрессии и/или активность могут быть модифицированы конститутивно или условно, и/или они могут быть модифицированы селективным образом (например, тканеспецифичным образом) или во всем растении.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, экспрессия и/или активность гена уменьшена, например, по меньшей мере, на 10%, в предпочтительном

варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 20%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 50%.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, экспрессия и/или активность гена повышена, например, по меньшей мере, на 10%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 20%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 50%.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, ген мутирован. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация изменяет экспрессию белка дикого типа или нативного белка и/или mPHK. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация уменьшает или элиминирует экспрессию белка (дикого типа или нативного) и/или mPHK, как описано в другом месте настоящего документа. Мутации могут оказывать отрицательное влияние на транскрипцию и/или трансляцию. Мутации могут происходить в экзонах или интронах. Мутации могут происходить в регуляторных элементах, таких как промоторы, энхансеры, терминаторы, инсуляторы и так далее. Мутации могут происходить в кодирующих последовательностях. Мутации могут происходить в сайтах сигнала сплайсинга, таких как сайты донора сплайсинга или акцептора сплайсинга. Мутации могут представлять собой мутации сдвига рамки считывания. Мутации могут представлять собой нонсенс-мутации. Мутации могут представлять собой инсерцию или делецию, по меньшей мере, одного нуклеотида. Мутации могут представлять собой неконсервативные мутации (при которых, по меньшей мере, одна аминокислота дикого типа заменена, по меньшей мере, одной аминокислотой не дикого типа). Мутации могут оказывать отрицательное влияние или изменять функцию белка, например, ферментативную активность. Мутации могут уменьшать или (по существу) элиминировать функцию белка, например, ферментативную активность. Уменьшенная функция, такая как уменьшенная ферментативная активность, может относиться к уменьшению, примерно, по меньшей мере, на 10%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 30%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 50%, например, по меньшей мере, на 20%, 40%, 60%, 80% или более, например, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95% или более. (По существу) элиминированная функция, такая как (по существу) элиминированная ферментативная активность, может относиться к уменьшению, по меньшей мере, на 80%, в

предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 90%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, на 95%. Мутации могут представлять собой доминантные отрицательные мутации.

некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация представляет собой инсерцию, по меньшей мере, одного нуклеотида в кодирующую последовательность. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация представляет собой нонсенс-мутацию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация приводит к измененной экспрессии гена. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация приводит к нокауту гена или нокдауну тРНК и/или белка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация приводит К сдвигу рамки считывания кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация приводит к измененной последовательности белка, кодируемой геном.

Экспрессия тРНК и/или белка может быть уменьшена или элиминирована посредством мутации самого гена (включая кодирующий, некодирующий и регуляторный элемент). Способы введения мутаций описаны в другом месте настоящего документа. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессия mPHK и/или белка может быть уменьшена или элиминирована посредством (в частности) вмешательства в транскрипцию и/или трансляцию, например, для понижения или элиминирования транскрипции, или трансляции тРНК и/или белка. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессия тРНК и/или белка может быть уменьшена или элиминирована посредством (в частности) вмешательства в стабильность mPHK и/или белка, например, для уменьшения стабильности mPHK и/или белка. Например, тРНК (стабильность) может быть уменьшена посредством РНКі, как описано в другом месте настоящего документа. Также miPHK можно использовать для оказания отрицательного влияния на тРНК (стабильность). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, уменьшенная экспрессия, которая достигается посредством уменьшения стабильности тРНК или белка, также охватывается термином «мутированный». В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, уменьшенная экспрессия, которая достигается посредством уменьшения стабильности mPHK или белка, не охватывается термином «мутированный».

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, уровень экспрессии и/или активность гена повышена посредством сверхэкспрессии, такой как

трансгенная сверхэкспрессия или сверхэкспрессия, возникающая в результате контроля транскрипции и/или трансляции, как известно в данной области техники. Сверхэкспрессия может быть результатом увеличения количества копий.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу генерирования или модификации растения кукурузы, содержащему введение в (геном) растения QTL, в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе. Способы введения QTL описаны в настоящем документе в другом месте (например, трансгенез, интрогрессия и так далее) и известны в данной области техники. Специалист в данной области техники поймет, что QTL может быть введен в зародышевую линию или, в качестве альтернативы, он может быть введен тканеспецифичным образом.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к растению или части растения кукурузы, модифицированному или сгенерированному как таковое. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, растение не является новым сортом растения.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к растению или части растения кукурузы, содержащему QTL в соответствии с настоящим изобретением, или, по меньшей мере, один аллель молекулярного маркера в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе (например, аллели молекулярного маркера А и/или В, или А и/или F, A, B, C, D, E, и/или F, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, все маркеры).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, ген, содержащийся в QTL в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, выбран из Abh4, CSLE1, WEB1, GRMZM2G397260 и Hsftf21.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Abh4 выбран из

- (i) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9 или 18;
- (ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 11, 14, 17 или 20;
- (iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, 15 или 21;
- (iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего

изобретения, по меньшей мере, 95%, например, по меньшей мере, 98% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9, 11, 14, 17, 18 или 20;

- (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95%, например, по меньшей мере, 98% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12, 15 или 21;
- (vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и
- (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, CSLE1 выбран из

- (i) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или 4;
- (ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 2 или 5;
- (iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или 6;
- (iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95%, например, по меньшей мере, 98% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, 2, 4 или 5;
- (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в самом предпочтительном варианте осуществления

настоящего изобретения, по меньшей мере, 95%, например, по меньшей мере, 98% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3 или 6;

- (vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и
- (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, WEB1 выбран из

- (i) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24 или 27;
- (ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 25 или 28;
- (iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26 или 29;
- (iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95%, например, по меньшей мере, 98% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24, 25, 27 или 28;
- (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95%, например, по меньшей мере, 98% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 26 или 29;
- (vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и
- (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из

пунктов (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, GRMZM2G397260 выбран из

- (i) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32;
- (ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 33;
- (iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34;
- (iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95%, например, по меньшей мере, 98% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32 или 33;
- (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95%, например, по меньшей мере, 98% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 34;
- (vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и
- (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Hsftf21 выбран из

(i) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36 или 39;

- (ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 37 или 40;
- (iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38 или 41;
- (iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95%, например, по меньшей мере, 98% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 36, 37, 39 или 40;
- (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 95%, например, по меньшей мере, 98% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 38 или 41;
- (vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и
- (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или mPHK) или активность гена, или генов, содержащихся в QTL в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, снижена, или экспрессия (по существу) отсутствует, или элиминирована, то растение или часть растения обладает повышенной засухостойкостью или засухоустойчивостью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или mPHK) или активность гена, или генов, содержащихся в QTL в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, снижена, или экспрессия (по существу) отсутствует или элиминирована, по сравнению с эталонным уровнем экспрессии, то растение или часть растения обладает повышенной засухостойкостью или

засухоустойчивостью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или mPHK) или активность гена, или генов, содержащихся в QTL в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, снижена, или экспрессия (по существу) отсутствует или элиминирована, по сравнению с эталонным уровнем экспрессии в эталонном растении или части растения, то растение или часть растения обладает повышенной засухостойкостью или засухоустойчивостью.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или mPHK) или активность гена, или генов, содержащихся в QTL в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, повышена, то растение или часть растения обладает повышенной засухостойкостью или засухоустойчивостью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или mPHK) или активность гена, или генов, содержащихся в QTL в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, повышена, по сравнению с эталонным уровнем экспрессии, то растение или часть растения обладает повышенной засухостойкостью или засухоустойчивостью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или mPHK) или активность гена, или генов, содержащихся в QTL в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, повышена, по сравнению с эталонным уровнем экспрессии в эталонном растении или части растения, то растение или часть растения обладает повышенной засухостойкостью или засухоустойчивостью.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или mPHK) или активность гена, или генов, содержащихся в QTL в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, снижена, или экспрессия (по существу) отсутствует или элиминирована, то растение или часть растения обладает повышенным изотопным составом углерода (δ13C). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или mPHK) или активность гена, или генов, содержащихся в QTL в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, снижена, или экспрессии (по существу) отсутствует или элиминирована, по сравнению с эталонным уровнем экспрессии, то растение или часть растения обладает повышенным изотопным составом углерода (б13C). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или mPHK) или активность гена, или генов, содержащихся в QTL в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, снижена, или экспрессия

(по существу) отсутствует или элиминирована, по сравнению с эталонным уровнем экспрессии в эталонном растении или части растения, то растение или часть растения обладает повышенным изотопным составом углерода (δ13C).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или mPHK) или активность гена, или генов, содержащихся в QTL в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, повышена, то растение или часть растения обладает повышенным изотопным составом углерода (δ13C). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или mPHK) или активность гена, или генов, содержащихся в QTL в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, повышена, по сравнению с эталонным уровнем экспрессии, то растение или часть растения обладает повышенным изотопным составом углерода (δ13C). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или mPHK) или активность гена, или генов, содержащихся в QTL в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, повышена, по сравнению с эталонным уровнем экспрессии в эталонном растении или части растения, то растение или часть растения обладает повышенным изотопным составом углерода (δ13C).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, уровень экспрессии (белка и/или mPHK) и/или активность (белка) Abh4 повышена. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, уровень экспрессии (белка и/или mPHK) и/или активность (белка) Abh4 понижена.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, уровень экспрессии (белка и/или mPHK) и/или активность (белка) CSLE1 повышена. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, уровень экспрессии (белка и/или mPHK) и/или активность (белка) CSLE1 понижена.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, уровень экспрессии (белка и/или mPHK) и/или активность (белка) WEB1 повышена. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, уровень экспрессии (белка и/или mPHK) и/или активность (белка) WEB1 is понижена.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, уровень экспрессии (белка и/или mPHK) и/или активность (белка) GRMZM2G397260 повышена. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, уровень экспрессии (белка и/или mPHK) и/или активность (белка) GRMZM2G397260 понижена.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, уровень экспрессии (белка и/или mPHK) и/или активность (белка) Hsftf21 повышена. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, уровень экспрессии (белка и/или mPHK) и/или активность (белка) Hsftf21is понижена.

Способы скрининга на присутствие аллеля QTL или (молекулярного) маркерного аллеля, как описано в настоящем документе, известны в данной области техники. Без ограничения, скрининг может охватывать или содержать секвенирование, методы на основе аллель-специфическая гибридизации (такие как (динамическая) гибридизация, молекулярные маячки, SNP-микрочипы), методы на основе ферментов (такие как ПЦР, КАЅР (Конкурентная аллель-специфическая ПЦР), RFLP, ALFP, RAPD, Флэпэндонуклеаза, удлинение праймера, 5'-нуклеаза, количественный анализ олигонуклеотидных лигаз), методы пост-амплификации на основе физических свойств ДНК (такие как, одноцепочечный конформационный полиморфизм, гель с использованием градиента температуры, денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография, высокоразрешающее плавление всего ампликона, использование белков, связывающих несовпадающие ДНК, SNPlex, количественный анализ расщепления несоответствия ферментов (нуклеазы Surveyor)) и так далее.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL, маркерный аллель (аллели) и/или мутантные гены или гены, экспрессия или активность которых изменена, как описано в настоящем документе, в первом растении присутствует в гомозиготном состоянии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL, маркерный аллель (аллели) и/или мутантные гены или гены, экспрессия или активность которых изменена, как описано в настоящем документе, в первом растении присутствует (присутствуют) в гетерозиготном состоянии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL, маркерный аллель (аллели) и/или мутантные гены или гены, экспрессия или активность которых изменена, как описано в настоящем документе, во втором растении присутствует (присутствуют) в гетерозиготном состоянии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL, маркерный аллель (аллели) и/или мутантные гены или гены, экспрессия или активность которых изменена, как описано в настоящем документе, во втором растении не присутствует.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL, маркерный аллель (аллели) и/или мутантные гены или гены, экспрессия или активность которых изменена, как описано в настоящем документе, присутствует (присутствуют) в

гомозиготном состоянии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL, маркерный аллель (аллели) и/или мутантные гены или гены, экспрессия или активность которых изменена, как описано в настоящем документе, присутствует (присутствуют) в гетерозиготном состоянии.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способы получения растений или частей растений, как описано в настоящем документе в соответствии с настоящим изобретением, такие как способы получения растений или частей растений, обладающих модифицированной засухоустойкостью или засухоустойчивостью, или модифицированным δ13С, например, повышенной или пониженной засухостойкостью или засухоустойчивостью, или повышенным или пониженным  $\delta 13$ С, включают или содержат трансгенез и/или редактирование генов, например, включающие CRISPR/Cas, TALEN, ZFN, мегануклеазы; (индуцированный) мутагенез, который может или не может быть случайным мутагенезом, таким как TILLING. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способы получения растений или частей растений, как описано в настоящем документе, в соответствии с настоящим изобретением, такие как способы получения растений или частей растений, обладающих модифицированной засухостойкостью или засухоустойчивостью, или модифицированным δ13С, например, повышенной или пониженной засухостойкостью или засухоустойчивостью, или повышенным или пониженным δ13С, включают или содержат применение РНКі, которое может или не может представлять собой, содержать или включать применение трансгенов. Например, применение нетрансгенов может включать нанесение компонентов РНКі, таких как двухцепочечные siPHK, на растения или поверхности растений, например, в виде спрея. Стабильная интеграция в геном растения не требуется.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способы получения растений или частей растений, как описано в настоящем документе в соответствии с настоящим изобретением, такие как способы получения растений или частей растений, обладающих модифицированной засухостойкостью или засухоустойчивостью, или модифицированным  $\delta 13$ C, такими как повышенная или пониженная засухостойкость или засухоустойчивость, или повышенный или пониженный  $\delta 13$ C, не включают или не содержат трансгенез, редактирование генов и/или мутагенез.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способы получения растений или частей растений, как описано в настоящем документе в соответствии с настоящим изобретением, такие как способы получения растений или частей растений, обладающих модифицированной засухостойкостью или засухоустойчивостью, или

модифицированным  $\delta$ 13С, такими как повышенная или пониженная засухостойкость или засухоустойчивость, или повышенный или пониженный  $\delta$ 13С, включают, содержат или состоят из селекции и отбора.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способы получения растений или частей растений, как описано в настоящем документе в соответствии с настоящим изобретением, такие как способы получения растений или частей растений, обладающих модифицированной засухостойкостью или засухоустойчивостью, или модифицированным  $\delta 13$ C, такими как повышенная или пониженная засухостойкость или засухоустойчивость, или повышенный или пониженный  $\delta 13$ C, не включают, не содержат или не состоят из селекции и отбора.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к растению или части растения, полученному или получаемому способами в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, такими как способы получения растений или частей растений, обладающих модифицированной засухостойкостью или засухоустойчивостью, или модифицированным δ13С, такими как повышенная или пониженная засухостойкость или засухоустойчивость, или повышенный или пониженный δ13С.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к использованию, по меньшей мере, одного (молекулярного) маркера, описанного в настоящем документе, для идентификации растения или части растения, например, растения или части растения, обладающего модифицированной засухостойкостью или засухоустойчивостью, или модифицированным δ13С, такими как повышенная или пониженная засухостойкость или засухоустойчивость, или повышенный или пониженный  $\delta 13$ С. В одном аспекте, настоящее изобретение относится к использованию, по меньшей мере, одного (молекулярного) маркера, описанного в настоящем документе, который способен обнаружить, по меньшей мере, один диагностический маркерный аллель для идентификации растения или части растения, например, растения или части растения, обладающего модифицированной засухостойкостью или засухоустойчивостью, или модифицированным б13С, такими как повышенная или пониженная засухостойкость или засухоустойчивость, или повышенный или пониженный δ13С. В одном аспекте, настоящее изобретение относится к обнаружению, по меньшей мере, одного (молекулярного) маркера, описанного в настоящем документе, для идентификации растения или части растения, например, растения или части растения, обладающего модифицированной засухостойкостью или засухоустойчивостью, или модифицированным δ13С, такими как повышенная или пониженная засухостойкость или засухоустойчивость, или повышенный или пониженный  $\delta 13 C$ .

Маркерные аллели по настоящему изобретению, как описано в настоящем документе, могут представлять собой диагностические маркерные аллели, которые могут быть использованы для идентификации растений или частей растений, например, растений или частей растений, обладающих модифицированной засухостойкостью или засухоустойчивостью, или модифицированным  $\delta 13$ C, такими как повышенная или пониженная засухостойкость или засухоустойчивость, или повышенный или пониженный  $\delta 13$ C.

В изобретение относится (выделенной) одном аспекте, настоящее К полинуклеиновой кислоте или комплементу, или обратному комплементу, содержащему и/или фланкированному (молекулярным) маркерным аллелем по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к полинуклеиновой кислоте, содержащей, по меньшей мере, 10 непрерывных нуклеотидов, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 15 непрерывных нуклеотидов или, по меньшей мере, 20 непрерывных нуклеотидов (молекулярного) маркерного аллеля по настоящему изобретению, или комплемент, или обратный комплемент (молекулярного) маркерного аллеля по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, полинуклеиновая кислота способна различать (молекулярный) маркерный аллель по настоящему изобретению и немолекулярный маркерный аллель, например, специфически гибридизоваться с (молекулярным) маркерным аллелем по настоящему изобретению. Следует понимать, что уникальный участок или фрагмент, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, относится к участку или фрагменту, содержащему SNP или соответствующие маркерные аллели по настоящему изобретению, или к участку или фрагменту, содержащему 5' или 3' соединение вставки маркерного аллеля по настоящему изобретению, или к участку или фракции, содержащейся в пределах вставки маркерного аллеля по настоящему изобретению, или к участку или фрагменту, содержащему соединение или делецию маркерного аллеля по настоящему изобретению.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к полинуклеиновой кислоте, способной специфически гибридизоваться с (молекулярным) маркерным аллелем по настоящему изобретению, или с ее комплементом, или обратным комплементом.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, полинуклеиновая кислота представляет собой праймер. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, полинуклеиновая кислота представляет собой зонд.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, полинуклеиновая кислота представляет собой аллель-специфическую полинуклеиновую кислоту, такую как аллель-специфический праймер или зонд.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, полинуклеиновая кислота содержит, по меньшей мере, 15 нуклеотидов, например, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, или 25 нуклеотидов, например, по меньшей мере, 30, 35, 40, 45 или 50 нуклеотидов, например, по меньшей мере, 100, 200, 300 или 500 нуклеотидов.

«специфическая Следует гибридизация» понимать, что означает, что полинуклеиновая кислота гибридизируется с (молекулярным) маркерным аллелем (например, в жестких условиях гибридизации, как определено в другом месте настоящего документа), но (по существу) не гибридизируется с полинуклеиновой кислотой, не содержащей маркерный аллель, или (по существу) не может быть использована в качестве праймера ПЦР. Например, в подходящем считывающем устройстве, сигнал гибридизации с маркерным аллелем или ПЦР-амплификация маркерного аллеля, по меньшей мер, в 5 раз, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мер, в 10 раз, сильнее или больше, чем сигнал гибридизации с немаркерным аллелем или с любой другой последовательностью.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к набору, содержащему такие полинуклеиновые кислоты, как, например, праймеры (содержащему прямые и/или обратные праймеры) и/или зонды. Набор также может содержать инструкции по использованию.

Следует понимать, что в вариантах осуществления настоящего изобретения, относящихся к набору прямых и обратных праймеров, может потребоваться, чтобы только один из обоих праймеров (прямой или обратный) был способен различать (молекулярный) маркерный аллель по настоящему изобретению и немаркерный аллель и, следовательно, может быть уникальным. Другой праймер может или не может быть способен различать (молекулярный) маркерный аллель по настоящему изобретению и немаркерный аллель и, следовательно, может быть уникальным.

Аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения подтверждаются нижеследующими неограничивающими примерами.

#### ПРИМЕРЫ

#### ПРИМЕР 1

Настоящее изобретение описывает идентификацию, локализацию и характеристику локуса количественного признака (QTL) на хромосоме 7 кукурузы, способствующего, среди прочего, генетической изменчивости в стабильном изотопном составе углерода, устьичной проводимости и продуктивности растений в условиях засухи. Данный QTL охарактеризован на уровне последовательности, и его фенотипическое влияние на молекулярном, биохимическом, физиологическом и агрономическом уровнях описано. Были идентифицированы гены в пределах QTL, и проводятся исследования функциональной валидации и исследования экспрессии генов, а также трансгенные подходы. Интеграция и применение данных молекулярных маркеров позволили идентифицировать положительные и отрицательные гаплотипы на уровне локуса и на генном уровне, позволили выбирать носителей признаков и отслеживать разнообразие в локусе и вокруг него, как такового.

# Материалы и способы

# <u>Разработка маркеров KASP</u>

Для генерации новых рекомбинантов, полученных в результате обратного скрещивания NIL В с RP (Аврамова и соавт. (2019). Изотопный состав углерода, эффективность водопотребления и чувствительность к засухе контролируются в кукурузе общим геномным сегментом. Theoretical and Applied Genetics, 132:53-63), были разработаны новые молекулярные маркеры. Маркеры KASP, расположенные в интрогрессии на хромосоме 7, и полиморфные между двумя родительскими линиями, были сгенерированы с использованием общедоступного Массива генотипирования кукурузы 600 К, Ахіомтм (Унтерзеер и соавт., 2014) в качестве ресурса.

**Таблица 1** Маркеры KASP, полученные из массива 600 К с информацией о маркерах (название, физические координаты) и соответствующими вызовами А аллеля (RP - рекуррентный родитель) и В аллеля (DP - родитель-донор)

Идентификатор маркера	Хромосома	AGPv04	AGPv02	А_Вызов	В_Вызов	SEQ ID NO:
1	7	114162912	110930219	ade	gua	44
2	7	118512477	115107967	ade	cyt	45

3	7	121214812	117519226	cyt	thy	46
4	7	123728849	119973922	ade	gua	47
5	7	125223361	121316500	gua	ade	48
6	7	127837336	123827128	cyt	ade	49
7 / A	7	129798239	125861690	cyt	thy	50
8a / C	7	129919413	125976029	ade	gua	51
8b / B	7	130053680	126109267	ade	gua	52
9 / D	7	131558094	127586792	ade	gua	53
10 / E	7	133928553	129887276	cyt	thy	54
11 / F	7	134903902	130881551	cyt	thy	55
12	7	135221445	131191105	thy	cyt	56
13	7	137626045	133530779	thy	cyt	57
14	7	139623696	135468905	thy	cyt	58
15	7	141161954	136866388	ade	gua	59
16	7	148349595	143410578	gua	ade	60
17	7	151797979	146596371	ade	gua	61

18	7	155419484	150177783	ade	gua	62
----	---	-----------	-----------	-----	-----	----

# <u>Разработка рекомбинантных NIL</u>

Были выращены растения F2, полученные в результате скрещивания NIL и RP. После отбора образцов, ткани листьев было проведено генотипирование с использованием маркеров KASP (Таблица 1). Растения, демонстрирующие рекомбинацию в области между маркером 1 (110,930,219 п.о.) и маркером 18 (150,177,783 п.о.), были самоопылены, и количество семян увеличилось. Эти рекомбинанты способствовали идентификации фрагмента каузативного QTL в области-мишени (Фигура 2). Рекомбинанты были проанализированы с помощью дополнительных ДНК-маркеров (Фигура 3) и фенотипов для iWUE (эффективность внутреннего водопотребления), устычных параметров и агрономических признаков в ходе эксперимента, проводимого в теплице.

# Анализ РНК-секвенирования и извлечение генов-кандидатов

В теплице был проведен эксперимент с RP и DP. Контроль (обильный полив) и условия обработки (сдержанный полив) были включены в экспериментальную установку. Эксперимент состоял из выращивания растений RP и DP в контролируемых условиях при температуре 29 °C/21 °C день/ночь (d/n), при фотосинтетической активной радиации (PAR) 544 мкмоль  $m^{-2}$  s<sup>-1</sup>, относительной влажности (RH) 47%/72% d/n в течение периода синхронизации. Впоследствии, половину растений перевели на обработку засухой, при которой полив сдерживали в течение 11 дней, в то время как другая половина продолжала расти в контролируемых условиях. Образцы тканей брали через 4, 7 и 11 дней после сдержанного полива. Кроме того, была применена восстановительная обработка путем повторного полива после 11 дней засухи. Каждый образец состоял из смеси 3 растений на одну обработку и генотип. Секвенирование проводили с использованием короткого прочтения Illumina-секвенирования на платформе HiSeq2000 с использованием парных конечных последовательностей. Картирование прочтения проводили с использованием AGPv02 B73 в качестве эталонного генома и с применением параметров по умолчанию пакета серверного программного обеспечения CLC genomics (QIAGEN Bioinformatics, США).

Используя общедоступную эталонную аннотацию AGPv02 (https://www.maizegdb.org/assembly), были извлечены гены, картированные в пределах области-мишени, и, при наличии, функциональная информация (домены семейства белков

[PFAM] и термины генной онтологии [GO]) была интегрирована для дальнейшей характеристики. Группирование генов по функциональным классам семейства белков проводили с использованием статистического программного обеспечения R с базовыми функциональными возможностями. Для анализа обогащения генной онтологии (GO), в качестве фонового набора использовали общедоступную генную аннотацию эталонной последовательности AGPv02 и сравнивали с терминами GO для картирования генов в пределах области-мишени размером 5,02 млн.п.о. Используя R вместе с пакетом topGO R, обогащенные GO для клеточного компонента, биологического процесса и молекулярной функции были идентифицированы с использованием классической статистики Фишера, Колмогорова-Смирнова и испытания на элиминацию Колмогорова-Смирнова. 10 наиболее значимых терминов GO (без многократной коррекции испытаний) для соответствующих категорий GO были извлечены и визуализированы в графе узел/конец GO с использованием пакета R Rgraphviz.

### Фенотипическая оценка

Устьичная проводимость  $(g_s)$ , скорость нетто-ассимиляции  $CO_2$  (A) и транспирация (E) были измерены для набора рекомбинантов D-K и родительских линий на стадии развития V5 в камере роста при оптимальных условиях. Эффективность внутреннего водопотребления (iWUE) была рассчитана как соотношение  $A/g_s$ . Значимые различия между носителями и не носителями донорских фрагментов были определены с помощью теста Тьюки (TukeyHSD) (критерий действительно значимого различия) с использованием статистического программного обеспечения R.

#### Результаты

## Корреляции маркера/фенотипа в наборе идентифицированных рекомбинантов

Используя вновь сгенерированные маркеры KASP, был проведен скрининг примерно 2 000 растений F2 и были отобраны рекомбинанты J, H, D, K, F, E, G и I, которые были проанализированы с помощью дополнительных ДНК-маркеров и охарактеризованы в рамках вышеописанных фенотипических значений. Корреляции маркера/фенотипа показали, что область-мишень размером 5,02 млн.п.о., отрицательно влияющая на δ13C, оказывает влияние на устычные параметры, а маркер 7 (125,861,690 п.о.) и маркер 11 (130,881,551 п.о.) могли быть использованы в качестве маркеров, фланкирующих область (Фигура 4). Фенотипические значения для отобранных рекомбинантов, несущих донорный фрагмент (QTL+) или имеющих состояние аллелей RP (QTL-) в соответствующем

геномном интервале, приведены в Таблице 2. Рекомбинанты дополнительно характеризуются другими признаками, которые, как оказалось, контролируются более крупным донорским сегментом, переносимым NIL B, то есть, δ13С, чувствительностью роста листьев к засухе, эффективностью водопотребления во всем растении (WUEplant), устьичной плотностью, содержанием ABA в листьях.

Были проведены статистические испытания для контрастных групп генотипов, несущих положительный аллель в QTL (QTL+), в сопоставлении с генотипами, несущими отрицательный аллель (QTL-). р-значение TukeyHSD подчеркивает значимое различие между генотипами QTL+ и QTL- для признаков  $g_s$ , A, iWUE и E. Для A не удалось обнаружить значимого различия. Учитывая информацию о генотипе вновь сгенерированных рекомбинантов, влияние донорного фрагмента на изменчивость для iWUE,  $g_s$ , A и E подтверждается картированием казуативных различий в пределах уменьшенного интервала размером 5,02 млн.п.о.

**Таблица 2** Устьичные параметры для рекомбинантов и родительских линий, а также значения iWUE, приведенные как среднее значение по отдельным растениям, имеющим один и тот же генотип, с соответствующим стандартным отклонением и состоянием присутствия QTL

Генотип	$\mathbf{g}_{s}$	A	iWUE	E	QTL
Rec D+	$0,133 \pm 0,012$	$26,778 \pm 0,500$	191,546 ± 5,352	$0,00204 \pm 0,00026$	-
Rec J*	$0,203 \pm 0,007$	30,827 ± 1,106	$152,195 \pm 2,155$	$0,00281 \pm 0,00014$	+
Rec E	$0,193 \pm 0,010$	$31,784 \pm 0,564$	166,001 ± 7,292	$0,00258 \pm 0,00012$	+
Rec F	$0,139 \pm 0,006$	26,701 ± 1,016	$193,724 \pm 4,768$	0,00188 ± 8,48E - 05	-
Rec G	$0,174 \pm 0,006$	$28,071 \pm 0,733$	$162,127 \pm 3,782$	$0,00239 \pm 8,73E - 05$	+
Rec I	$0,179 \pm 0,009$	$28,785 \pm 1,062$	$162,714 \pm 3,890$	$0,00247 \pm 0,00015$	+
Rec K	$0,150 \pm 0,008$	$27,443 \pm 0,871$	185,446 ± 6,987	$0,00206 \pm 9,95E - 05$	-

<sup>\*</sup> Rec J несет гаплотип DP в интервале и, соответственно, считается действующим как донорский генотип;

#### Идентификация генов

В пределах области-мишени размером 5,02 млн.п.о. можно картировать 121 генный признак в соответствии с эталонной аннотацией AGPv02. Учитывая информацию о домене PFAM, модели 121 гена могут быть сгруппированы в различные функциональные классы. Помимо 48 генов без функциональной информации, гены в пределах целевого интервала были отнесены к связыванию ДНК/РНК и активности фактора транскрипции, а также к функциям первичного метаболизма растений (например, к углеводному метаболизму). С помощью гормонов, генов, относящихся к клеточной стенке и фотосинтезу, были обнаружены пути, которые могут влиять на устьичные параметры и изотопный состав углерода.

<sup>\*</sup> Rec D несет гаплотип RP в интервале и, соответственно, считается действующим как рекуррентный родитель

Был проведен анализ обогащения GO для идентификации терминов GO, которые указывают на важные пути, лежащие в основе наблюдаемой изменчивости признаков. Для клеточных компонентов из терминов GO проявляется значимое обогащение процессов, локализованных в хлоропластах. Кроме того, были идентифицированы процессы, относящиеся к сплайсингу ядра и PHK. Анализ обогащения биологических процессов GO относится к ответу на абиотический стресс, к путям, относящимся к жирными кислотам и процессингу PHK.

Наконец, анализ обогащения молекулярных функций GO также привел к значимому обогащению терминов, которые связаны с первичным метаболизмом, модификацией РНК/ДНК и компонентами фотосинтеза.

В целом, проведенный анализ подчеркивает вклад путей, относящихся к модуляции/регуляции РНК и путей, относящихся к фотосинтезу, в изменчивость признаков. Для нескольких генов, расположенных в области размером 5,02 млн.п.о., мы обнаружили дифференциальную экспрессию генов в ответ на стресс от засухи, что указывает на роль наблюдаемого фенотипа.

### Валидация генов

ZmCSLE1

(B73: геномная ДНК: SEQ ID NO: 1; кодирующая последовательность: SEQ ID NO: 2; белок: SEQ ID NO: 3; PH207: геномная ДНК: SEQ ID NO: 4; кодирующая последовательность: SEQ ID NO: 5; белок: SEQ ID NO: 6)

На основании данных РНК-секвенирования, этот ген показал существенно иную экспрессию с более высоким уровнем экспрессии в RP, чем в DP, с кратностью изменения (FC), составляющей 2,044 в контрольных условиях. Его локализация на хромосоме 7 в диапазоне от 130,735,393 до 130,740,535 п.о. по координатам AGPv02 (от 134,723,714 до 134,728,829 п.о. по координатам AGPv04; от 130,675,946 до 130,681,219 п.о. по координатам PH207) делает его позиционным геном. Он также был одним из генов, который был даунрегулирован в условиях стресса от засухи в большей степени в RP (FC 5,05), чем в DP (FC 2,5). Более того, его предполагаемая функция, как фермента, подобного целлюлозосинтазе, делает его функциональным геном. Ферменты целлюлозосинтазы играют важную роль в синтезе клеточных стенок, где они доставляют и модифицируют необходимые строительные блоки. Поскольку процессы синтеза клеточной стенки, особенно структура и состав клеточной стенки, оказывают сильное влияние на транспирацию и потерю воды, этот ген может способствовать наблюдаемой изменчивости

признака. Различия в экспрессии, вызванные изменчивостью аллелей в этом локусе, могут изменить устьичные параметры и/или углеводные отношения между источником и акцептором и, таким образом, отрицательно повлиять на WUE и дискриминацию изотопов углерода. Более высокий уровень экспрессии ZmCSLE1 в донорском состоянии приводит к измененной углеводной сигнализации и/или к различиям в гидравлической сигнализации дефицита воды, так что устьичная проводимость остается высокой даже при водном стрессе. Для валидации ZmCSLE1, мутанты TILLING, имеющие разрушенные сайты сплайсинга, ранние стоп-кодоны и аминокислотный обмен, были сгенерированы у недонорской популяции линии PH207 (Таблицы 3а и 3b), и были испытаны аллельные варианты ZmCSLE1.

Таблица За Обзор сгенерированных мутантов TILLING для модели гена ZmCSLE1

ZmCSLE1		Номера мутантов				
Популяция РН207	1	Интроны	Интроны Экзоны Обмен АА			
Зима 15/16	Зима 15/16 ∑ 18		15	11		

**Таблица 3b** Характеристика отобранных мутантов TILLING популяции PH207. AA = аминокислота, wt = дикий тип, mut = мутант

Код мутанта	Кодон	AA	Кодон	AA	Место-	Положение	Аллель	Аллель
	wt	wt	mut	mut	располо-	в АА	wt	mut
					жение	последо-		
						вательности		
PH207m014a	gca	ala	aca	thr	экзон 7	672	G	A
PH207m014b	gtg	val	atg	met	экзон 7	664	G	A
PH207m014c	gcc	ala	acc	thr	экзон 4	281	G	A
PH207m014d	gtt	val	gtt	ile	экзон 3	242	G	A
PH207m014e	ccg	pro	ctg	leu	экзон 2	158	С	T
PH207m014f	tcc	ser	ttc	phe	экзон 2	150	С	Т
PH207m014g	gtc	val	atc	ile	экзон 2	112	G	A
PH207m014h	tcg	ser	ttg	leu	экзон 2	106	С	T
PH207m014i	ctc	leu	ttc	phe	экзон 1	84	С	T

PH207m014j	ccc	pro	tcc	ser	экзон 1	74	С	T
PH207m014k	tgg	trp	tga	stop	экзон 1	59	G	A

Кроме того, анализ рекомбинантов в рамках параметров газообмена указывает на короткий донорский сегмент размером 248 т.п.о., находящийся в диапазоне от маркера 7 (125,861,690 п.о.) до маркера 8b (126,109,267 п.о.) и содержащий четыре гена на AGPv02. Мы показываем, что этот меньший интервал оказывает специфическое влияние на устьичную проводимость и iWUE. Таким образом, приводим описание четырех генов.

### ZmAbh4

На основании данных РНК-секвенирования, этот ген (геномная ДНК: SEQ ID NO: 9 (B73) и SEQ ID NO: 18 (PH207)) показал значительно более высокий уровень экспрессии почти изогенной линии, несущей аллель DP, по сравнению с RP, в условиях контроля, засухи и повторного полива (Фигура 5). Для этой модели гена описаны три различных варианта транскриптов: Т01 (транскрипт: SEQ ID NO: 10; сДНК: SEQ ID NO: 11), кодирующий самый длинный вариант сплайсинга (уровень экспрессии аллеля DP выше, чем уровень экспрессии аллеля RP с FC ~ 1-2,5; белок: SEQ ID NO: 12) и Т02 (транскрипт: SEQ ID NO: 13; сДНК: SEQ ID NO: 14) и Т03 (транскрипт: SEQ ID NO: 16; сДНК: SEQ ID NO: 17), который короче и кодирует один и тот же белок (уровень экспрессии аллеля DP Т03 выше, чем уровень экспрессии аллеля RP Т03 с FC ~ 1-1,2; белок: SEQ ID NO: 15). Его локализация на хромосоме 7 в диапазоне от 125,973,529 до 125,976,469 п.о. по координатам AGPv02 (от 129,916,913 до 129,919,853 п.о. по координатам AGPv04; от 126,143,580 до 126,147,082 п.о. по координатам РН207) делает его позиционным геном. Будучи отнесенным к семейству оксидаз цитохрома Р450 с предполагаемой функцией абсцизовой кислоты 8'-гидроксилазы 4, он поддерживает свою роль в качестве функционального гена. Абсцизовая кислота (АВА) способна регулировать устьичную апертуру. Поскольку ген участвует в катаболизме АВА (Фигура 6), различия между одной или всеми изоформами транскрипта приводят к измененным уровням АВА (Фигура 7), которые отрицательно влияют на устьичную апертуру, проводимость и, как следствие, могут привести к различиям в эффективности водопотребления и дискриминации изотопов углерода. Соответственно, различие в уровне экспрессии особенно высоко для изоформы длинного транскрипта Т01 между RP и DP. Анализ уровней ABA между RP и DP показал, что RP повысил уровни АВА, по сравнению с DP, что приводит к более быстрому закрытию устьиц и, следовательно, к раннему ответу на засуху. Для валидации ZmAbh4, в качестве предполагаемого гена-кандидата были сгенерированы мутанты TILLING (Таблица 4), и испытаны аллельные варианты ZmAbh4.

**Таблица 4а** Обзор сгенерированных мутантов TILLING для модели гена *ZmAbh4* 

ZmAbh4		Номера мутан	Номера мутантов				
Популяция РН207	,	Интроны	Экзоны	Обмен АА			
Зима 15/16	∑ 12	7	5	1			
Лето 16	∑ 15	4	11	3			
Зима 16/17	∑ 19	4	15	6			
Лето 17	∑ 44	17	27	11			

**Таблица 4b** Характеристика отобранных мутантов TILLING популяции PH207. AA = аминокислота, wt = дикий тип, mut = мутант

Код мутанта	Кодо	AA	Кодо	AA	Место-	Положение	Аллел	Аллел
	нwt	wt	н mut	mut	расположение	в АА	ьwt	ь mut
						последо-		
						вательност		
						И		
PH207m015a					2 основания			
					выше экзона 6			
PH207m015b	ссс	pro	ctc	1eu	экзон б	377	С	T
PH207m015c	gga	gly	gaa	glu	экзон 8	453	G	A

PH207m015d	gtt	val	gtt	ile	экзон 8	452	G	A
PH207m015e					4 основания выше экзона 5		С	Т
PH207m015f	gcc	ala	acc	thr	экзон 4	252	G	A
PH207m015g	cgt	arg	tgt	cys	экзон 7	412	С	Т
PH207m015h	gac	asp	aac	asn	экзон 4	307	G	A
PH207m015i	gcg	ala	gtg	val	экзон 4	289	С	Т
PH207m015j	ccg	pro	tcg	ser	экзон 2	87	С	Т
PH207m015k					1 основание ниже экзона 1		G	A
PH207m015l	gag	glu	aag	lys	экзон 1	55	G	A
PH207m015 m	cct	pro	tct	ser	экзон 1	45	С	Т
PH207m015n	gag	glu	aag	lys		370	G	A
PH207m015o	gcc	ala	acc	thr		367	G	A
PH207m015r	gtc	val	atc	ile		302	G	A
PH207m015s	gac	asp	aac	asn		276	G	A
PH207m015t	cgg	arg	cag	gln		161	G	A

PH207m015u	cgc	arg	cac	his		150	G	A
PH207m015v	ccc	pro	tcc	ser		146	С	Т
PH207m015w	ctt	leu	ttt	phe		83	С	Т
PH207m015x	ccc	pro	tcc	ser		64	С	T
PH207m015y	ссс	pro	tcc	ser		40	С	Т
PH207m015z		gly		ser	экзон	422	G	R

Линия PH207m015b (мутация P377L) TILLING, значительно отличалась от своего дикого типа в плане отношения продуктов (фазовых кислот и дигидрофазовой кислоты) к субстрату (ABA) реакции, катализируемой *ZmAbh4* (Фигура 8). Однако не было никакого различия между PH207m15b и PH 207.

Для линии PH207m015c (мутация G453E) не наблюдалось различий в отношении продуктов к субстрату реакции Abh4, к ее дикому типу, к линии, гетерозиготной для мутации, и к PH207.

Дискриминация изотопов углерода ( $\Delta^{13}$ C) листьев от линий PH207m015b и PH207m015c не отличалась от дискриминации в листьях от их диких типов или PH207 (Фигура 9).

Возможными причинами отсутствия фенотипа, наблюдаемого в этих двух линиях TILLING, может быть либо то, что исследуемые мутации слишком слабы, чтобы повлиять на фенотип, что фоновые мутации маскируют фенотип, либо то, что гормональный гомеостаз в этих линиях поддерживается регулированием других факторов.

Остальные линии TILLING будут охарактеризованы далее.

В дополнение к подходам к TILLING, функциональная валидация ZmAbh4 проводится посредством генетически модифицированных организмов (ГМО).

В этом отношении, зубовидный генотип A188 использовали в качестве фона трансформации для достижения сильной конститутивной сверхэкспрессии гена ZMABH4 путем интеграции кодон-оптимизированного гена ZmAbh4 под контролем промотора убиквитина однодольного растения в геном A188 и отбора растений, являющихся

гомозиготными для интеграции этого гетерологичного нуклеотида. В Таблице 5 представлен обзор количества семян, полученных от трансформантов в поколении T1, которые все еще являются гетерозиготными для интеграции.

Ожидается, что сверхэкспрессия ZmAbh4 снизит уровни ABA в растении и, таким образом, индуцирует более высокую устьичную проводимость из-за расширенного раскрытия устьица в условиях засухи.

Сайленсинг всех членов семейства ZmAbh, включая ZmAbh4, осуществляется путем экспрессии гетерологичной шпилечной конструкции в A188. Генерируют гомозиготные семена Т2, и 11 событий находятся на стадии Т1. Ожидается, что сайленсинг ZmAbh4 повысит уровни ABA и приведет к раннему ответу на засуху с низкой устьичной проводимостью и более низким изотопным составом углерода.

**Таблица 5** Обзор состояния сгенерированных ГМО-ресурсов для ZmAbh4

Идентификатор партии семян	Количество ядер	Генерация
MTR0349-T-005	3	T1
MTR0386-T-004	5	T1
MTR0386-T-009	16	T1
MTR0389-T-001	46	T1
MTR0389-T-002	72	T1
MTR0386-T-031	17	T1
MTR0386-T-035	23	T1
MTR0386-T-040	15	T1
_	ZmAbh4 Fam. RNAi	

Были сгенерированы конструкции для нокаута семейства генов ZmAbh с использованием CRISPR/Cas9. Из них одна конструкция, кодирующая четыре направляющие РНК, две конструкции, нацеленные на ZmAbh4, две конструкции, нацеленные на ZmAbh4 (делеции изменят 67% и 84% аминокислотных

последовательностей, соответственно), были использованы для трансформации инбредной линии кукурузы В104. Трансформация была проведена Центром биологии систем растений VIB (VIB Center for Plant Systems Biology), Гент, Бельгия. Было обнаружено шесть независимых событий с мутациями в ZmAbh4. Из них три события показали дополнительные мутации в ZmAbh1. Растения, происходящие от пяти событий, были генотипированы и фенотипированы. Предварительные результаты фенотипирования поколения Т1 показали увеличение содержания АВА в 2,5 раза в листьях растений, несущих два мутантных аллеля ZmAbh4 (n = 3), по сравнению с растениями, несущими два аллеля дикого типа (n = 4, Фигура 12). Увеличение глюкозида ABA у мутантов и неизмененные уровни продуктов 8'-гидроксилирования АВА (РА, DPA, Фигура 12) указывают на то, что растения используют глюкозид для инактивации АВА вместо гидроксилирования, которое может быть нарушено у мутантов. Однако это контрастирует с сопоставлением NIL B с RP, где были обнаружены различия в уровнях фазовой кислоты и дигидрофазовой кислоты (Фигура 7). Кроме того, измерения газообмена мутантов в этом предварительном фенотипировании показали различия с диким типом только у двойных мутантов zmabh4 zmabh1, а не у одиночных мутантов zmabh4. Однако многие из одиночных мутантов являются гетерозиготными для мутации, все еще несущими аллель дикого типа, в то время как доля гомозиготных мутированных растений выше у двойных мутантов. Тем не менее, это наблюдение может указывать на то, что мутации zmabh4 могут быть компенсированы *ZmAbh1* на фоне В104.

Аллели ZmAbh4 почти изогенных линий, происходящих от скрещивания инбредных линий B73 и Mo17 (Эйхтен и соавт. (2011) Почти изогенные линии B73-Mo17 демонстрируют дисперсную структурную изменчивость в кукурузе. В: Plant Physiol. 156 (4), с. 1679–1690. DOI: 10.1104/стр.111.1748.), оказали влияние на устьичную проводимость (gs) и эффективность мгновенного водопотребления (iWUE) на фоне Mo17 (Фигура 10), но не на фоне B73 (Фигура 11 В, С). Это указывает на то, что Abh4 или, по меньшей мере, область вокруг Abh4, является каузативным для фенотипических различий на фоне Mo17. На фоне B73, сохраненные показатели катаболизма ABA (Фигура 11 A) в NIL объясняют отсутствие фенотипа в данных газообмена.

#### ZmWEB1

Ген (В73: геномная ДНК: SEQ ID NO: 24; сДНК: SEQ ID NO: 25; белок SEQ ID NO: 26; РН207: геномная ДНК: SEQ ID NO: 27; сДНК: SEQ ID NO: 28; белок SEQ ID NO: 29) показывает более высокий уровень экспрессии в DP, чем в RP в контрольных условиях, с

FC, составляющей 4,92. Его локализация на хромосоме 7 в диапазоне от 126,142,402 до 126,145,382 п.о. по координатам AGPv02 (от 130,051,739 до 130,054,355 п.о. по координатам AGPv04; от 126,226,508 до 126,229,120 п.о. по координатам PH207) делает его позиционным геном. Его ближайший гомолог в Arabidopsis thaliana (AT2G26570) известен как белок, подобный ГОЛУБОМУ СВЕТУ, ИНДУЦИРУЮЩЕМУ СЛАБОЕ ДВИЖЕНИЕ ХЛОРОПЛАСТОВ (WEB1). Этот белок кодирует суперспиральный белок, который вместе с другим суперспиральным белком WEB2/PMI2 (At1g66840) поддерживает скорость движения фоторелокации хлоропластов (Кодама и соавт., 2010 PNAS). Хлоропласты движутся по направлению к слабому свету (ответ аккумулирования) и по направлению от сильного света (ответ избегания). Быстрое и точное движение хлоропластов в ответ на условия внешнего света имеет важное значение для эффективного фотосинтеза и предотвращения фотоповреждения в хлоропластах. Аллельные различия в этом гене влияют на фотосинтетический ответ и, следовательно, также влияют на фотосинтетические и устьичные параметры, что снова приводит к измененной дискриминации изотопов углерода. Кроме того, его значительная экспрессия в пыльниках также может играть определенную роль в процессах цветения, последующего формирования ядра и наполнения зерна.

# GRMZM2G397260

Различий в уровне экспрессии между RP и DP для этого гена не наблюдается (В73: геномная ДНК: SEQ ID NO: 32; сДНК: SEQ ID NO: 33; белок SEQ ID NO: 34). Однако оказалось, что этот ген экспрессируется на высоком уровне в зрелых листьях в В73 (Сехон и соавт., 2011). Его локализация на хромосоме 7 в диапазоне от 126,103,570 до 126,104,295 п.о. по координатам AGPv02 (от 130047983 до 130048708 п.о. по координатам AGPv04) делает его позиционным геном. Для этого гена нет функциональной аннотации. Однако, повидимому, этот ген является геном, специфичным для кукурузы, поскольку никаких существенных гомологий с другими моделями генов обнаружить не удалось.

# ZmHsftf21

Различий в уровне экспрессии между RP и DP для этого гена не наблюдается (В73: геномная ДНК: SEQ ID NO: 36; сДНК: SEQ ID NO: 37; белок SEQ ID NO: 38; РН207: геномная ДНК: SEQ ID NO: 39; сДНК: SEQ ID NO: 40; белок SEQ ID NO: 41). Его локализация на хромосоме 7 в диапазоне от 125.861.349 до 125.865.050 п.о. по координатам AGPv02 (от 129,797,898 до 129,801,599 п.о. по координатам AGPv04; от 126,047,960 до

126,052,077 п.о. по координатам РН207) делает его позиционным геном. Он кодирует фактор транскрипции белка теплового шока 21, функция которого относится к ответу на лишение воды, и он экспрессируется в зрелых листьях в В73 (Сехон и соавт., 2011), что также делает его функциональным геном.

Рекомбинанты проанализированы на предмет δ13С, чувствительность роста листьев к засухе, эффективность водопотребления во всем растении (WUEplant), устьичную плотность, содержание ABA в листьях.

# <u>Дальнейшие корреляции маркера/фенотипа в наборе идентифицированных</u> рекомбинантов

Чтобы с генетической точки зрения проанализировать ассоциацию нескольких признаков, относящихся к засухе, с геномным сегментом на хромосоме 7, были проведены два последовательных тепличных эксперимента и один полевой эксперимент. NIL В и девять рекомбинантных NIL (D-L), несущих небольшие перекрывающиеся интрогрессии, охватывающие область-мишень, были фенотипированы вместе с их рекуррентным родителем (RP). В каждом из двух тепличных экспериментов использовали по десять растений на генотип. Во время проведения экспериментов контролировали климатические условия (25-33 °C/19-20 °C d/n, 400 мкмоль m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PAR (PAR - требования обеспечения эксплуатационных показателей), 40% RH (RH - относительная влажность)) и использовали дополнительный свет. Двухнедельные одиночные проростки (стадия развития V3) были посажены в 10-литровые горшки, содержащие одинаковое количество просеянной однородной почвы и одинаковое содержание почвенной воды (SWC), организованные в виде рандомизированной полноблочной конструкции.

В первом эксперименте была оценена эффективность водопотребления во всем растении (WUE<sub>plant</sub>). Растения кукурузы подвергали постепенному стрессу от засухи, путем сдерживания полива в течение 6 недель. Начальное SWC (об/об) составляло, примерно, 85%. Для покрытия поверхности горшков использовали пластиковые пакеты во избежание испарения воды из почвы, и дальнейший полив не применяли до конца эксперимента. Эксперимент был завершен, когда все растения перестали расти (стадия развития V9–V10), начали биологически стареть и потребили всю имеющуюся воду. SWC определяли гравиметрическим методом, взвешивая горшки, а количество воды, потребленное каждым растением, рассчитывали как разницу с первоначальным весом горшка в начале эксперимента. В конце эксперимента надземный материал собирали для определения биомассы после сушки материала в течение 1 недели при температуре 60 °C для достижения

постоянной массы. Поскольку это был эксперимент с разрушением образца, было определено начальное среднее значение сухой биомассы, полученной от растений за дополнительные 2 недели, которое вычли из конечной биомассы для каждого генотипа. WUE<sub>plant</sub> рассчитывали как соотношение сухая биомасса/потребленная вода в конце эксперимента (см. Фигуру 14).

Во втором тепличном эксперименте, измерения газообмена листьев проводили с использованием LI-6800 (LI-COR Biosciences GmbH, США) на листе 5, когда он полностью развился (стадия развития V5), для оценки ассимиляции CO<sub>2</sub> (A), устьичной проводимости (g<sub>s</sub>) (Фигура 16) и для расчета внутреннего WUE (iWUE) (Фигура 15) как соотношение между ними. После этого, с листа 5 были взяты образцы листа для определения устьичной плотности (Фигура 17). Отпечатки лака для ногтей были взяты в трех разных местах на абаксиальной стороне в середине листа, и они были иммобилизованы на поверхности предметного стекла для микроскопа с прозрачной целлофановой лентой. Снимки эпидермиса листа были сделаны под микроскопом. Были подсчитаны устьица и подсчитано их количество на площадь листа. Весь лист 5 был в дальнейшем мгновенно заморожен в жидком азоте и дополнительно измельчен для приготовления образцов для измерения гормонов методом ЖХ-МС/МС (абсцизовая кислота (ABA) (Фигура 18), катаболитов его фазовой кислоты (PA) (Фигура 19) и дигидрофазовой кислоты (DPA) (Фигура 20)). Семена были получены от одних и тех же растений, и 5-10 ядер на растение были измельчены вместе и использованы для измерения изотопного состава углерода (δ13С) (Фигура 21).

Полевые эксперименты проводили во Фрайзинге, Германия. Растения выращивали на регулярно и обильно поливаемом поле (48°24'12,2" с.ш., 11°43'22,3" в.д.) и в условиях укрытия от дождя (48°24'40,9" с.ш., 11°43'22,4" в.д.) с уменьшенным поливом для достижения умеренного стресса от засухи. RP и NIL были частью более масштабных испытаний, которые были представлены в виде рандомизированных полноблочных конструкций с шестью повторениями на посадку экспериментального материала, применяемых как для полевых экспериментов, так и для экспериментов, проводимых при укрытии от дождя. Каждая посадка экспериментального материала была осуществлена в один ряд длиной 1,2 м с расстоянием между рядами 0,75 м и расстоянием между посадками в ряду 0,12 м, с целью обеспечения плотности посадок 11 растений m−2. Применение гербицидов и удобрений соответствовало надлежащей сельскохозяйственной практике. Все початки в ряду были собраны вручную и высушены в течение 2 недель при температуре 30 °C перед шелушением. Зерна измельчали и использовали для анализа δ13С (Фигуры 22 и 23).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1. Способ идентификации растения или части растения кукурузы, содержащий скрининг на присутствие аллеля QTL, расположенного на хромосоме 7, отличающийся тем, что указанный аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем молекулярные маркеры А и/или В, при этом, молекулярные маркеры А и В представляют собой SNP, которые представляют собой, соответственно, С, соответствующий положению 125861690, и А, соответствующий положению 126109267, или которые представляют собой, соответственно, Т, соответствующий положению 125861690, и G, соответствующий положению 126109267, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами А и/или В.
- 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный аллель QTL содержит молекулярные маркеры C, D, E и/или F, при этом, молекулярные маркеры C, D, E и F собой. представляют собой SNP, которые представляют соответственно, соответствующий положению 125976029, А, соответствующий положению 127586792, С, соответствующий положению 129887276, и С, соответствующий положению 130881551, или которые представляют собой, соответственно, G, соответствующий положению 125976029, G, соответствующий положению 127586792, T, соответствующей положению 129887276, и T, соответствующей положению 130881551, см. эталонный геном AGPv2 B73, необязательно, при этом, указанный аллель QTL фланкирован молекулярными маркерами А и/или F.
- 3. Способ по любому из пп. 1-2, отличающийся тем, что скрининг на присутствие указанного аллеля QTL содержит идентификацию любого, по меньшей мере, одного молекулярного маркера A и B, и/или идентификацию любого, по меньшей мере, одного молекулярного маркера A, B, C, D, E и F.
- 4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что скрининг на присутствие указанного аллеля QTL содержит определение уровня экспрессии, активности и/или последовательности, по меньшей мере, одного гена, расположенного в QTL, как определено в любом из пунктов 1-3, необязательно, дополнительно содержащий сравнение уровня экспрессии и/или активности указанного, по меньшей мере, одного гена с заданным пороговым значением.

- 5. Способ идентификации растения или части растения кукурузы, содержащий определение уровня экспрессии, активности и/или последовательности, по меньшей мере, одного гена, расположенного в QTL, как определено в любом из пп. 1-4, необязательно, дополнительно содержащий сравнение уровня экспрессии и/или активности указанного, по меньшей мере, одного гена с заданным пороговым значением.
- 6. Способ по любому из пп. 4-5, дополнительно содержащий сравнение уровня экспрессии и/или активности указанного, по меньшей мере, одного гена в условиях контроля и в условиях стресса от засухи.
- 7. Способ модификации растения кукурузы, содержащий изменение уровня экспрессии и/или активности, по меньшей мере, одного гена, расположенного в QTL, как определено в любом из пп. 1-4.
- 8. Способ по любому из пп. 4-6, в котором указанный, по меньшей мере, один ген выбран из Abh4, CSLE1, WEB1, GRMZM2G397260 и Hsftf21, предпочтительно, из Abh4.
  - 9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что Abh4 выбран из
- (i) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9;
- (ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 11, 14 или 17;
- (iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12 или 15;
- (iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9, 11, 14 или 17;
- (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12 или 15;

- (vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и
- (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты:

# CSLE1 выбран из

- (i) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1;
- (ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 2;
- (iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3;
- (iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или 2;
- (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3;
- (vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и
- (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты;

### WEB1 выбран из

- (i) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24).
- (ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 25;
- (iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26;

- (iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24 или 25;
- (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 26;
- (vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и
- (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты;

# GRMZM2G397260 выбран из

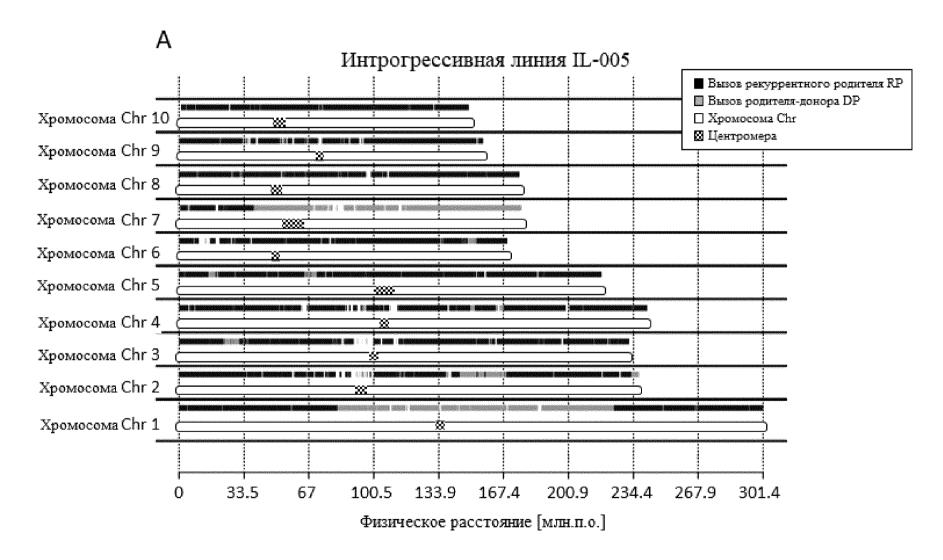
- (i) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32;
- (ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 33;
- (iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34;
- (iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32 или 33;
- (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 34;
- (vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и
- (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью по пунктам (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты; и/или

# Hsftf21 выбран из

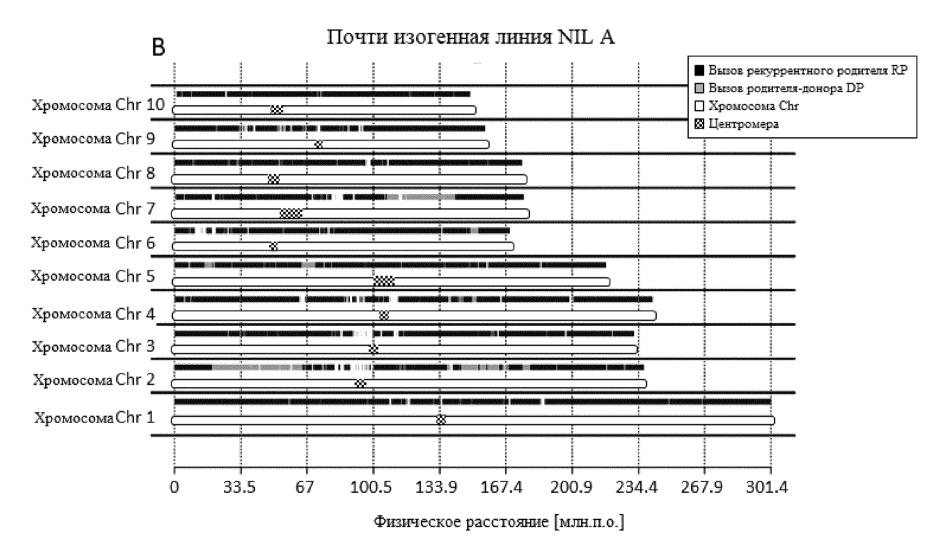
- (i) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36;
- (ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 37;
- (iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38;
- (iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 36 или 37;
- (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 38;
- (vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и
- (vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты.
- 10. Способ генерирования растения кукурузы, содержащий введение в геном растения аллеля QTL, как определено в любом из пп. 1-4.
- 11. Способ получения части растения кукурузы, содержащий (а) предложение первого растения кукурузы, имеющего аллель QTL или, по меньшей мере, один молекулярный маркер, как определено в любом из пп. 1-4, (b) скрещивание указанного первого растения кукурузы со вторым растением кукурузы, (c) отбор потомков растений, имеющих указанный аллель QTL или указанный, по меньшей мере, один молекулярный маркер и (d) сбор указанной части растения от указанного потомства.
- 12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что указанный QTL ассоциирован с засухостойкостью или засухоустойчивостью, и/или с  $\delta^{13}$ C, при этом, указанный аллель QTL отрицательно влияет на устьичные параметры и/или параметры газообмена, и/или, при этом, указанный аллель QTL отрицательно влияет на эффективность

(внутреннего или во всем растении) водопотребления, устьичную проводимость, скорость нетто-ассимиляции CO<sub>2</sub>, транспирацию, устьичную плотность, содержание ABA (в листьях), чувствительность роста (листьев) к засухе, потребность в испарении и/или на состояние почвенной воды, и/или на фотосинтетический ответ.

- 13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанное растение получено из растения, содержащего указанный аллель QTL или маркерные аллели, полученные путем интрогрессии, и/или, при этом, растение является трансгенным или генетически отредактированным.
- 14. Выделенная полинуклеиновая кислота, специфически гибридизующаяся с геномной нуклеотидной последовательностью кукурузы, содержащей любой, меньшей мере, один молекулярный маркер A, B, C, D, E и F, или ее комплемент, или обратный комплемент, необязательно, который представляет собой праймер или зонд, способный специфически обнаруживать аллель QTL или любой, по меньшей мере, один молекулярный маркер, как определено в любом из пп. 1-4.
- 15. Выделенная полинуклеиновая кислота, содержащая и/или фланкированная, по меньшей мере, одним из молекулярных маркеров A, B, C, D, E или F.

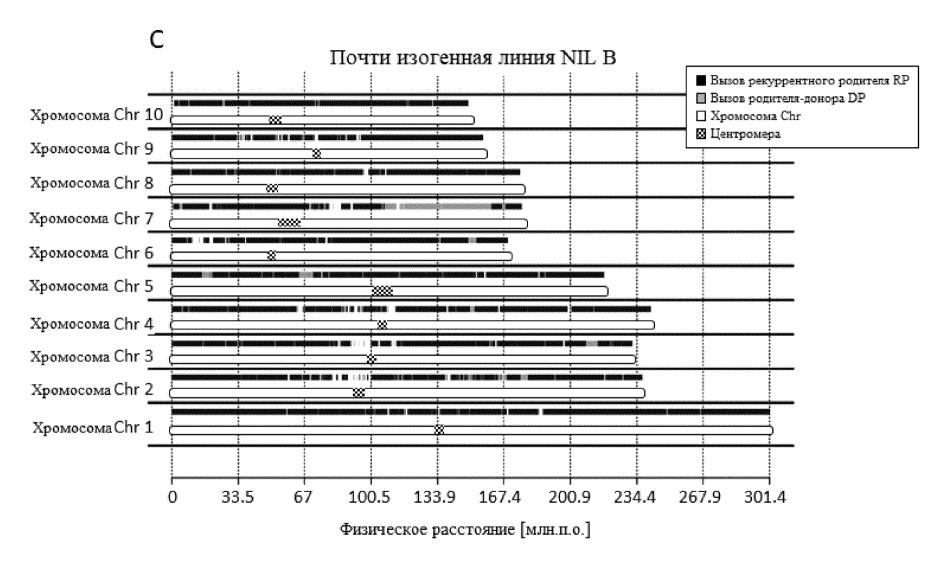


Фиг. 1

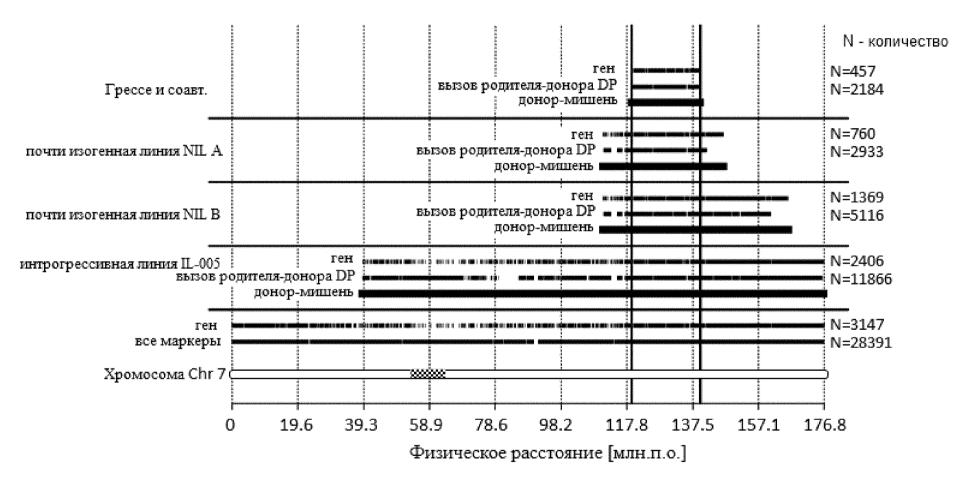


Фиг. 1

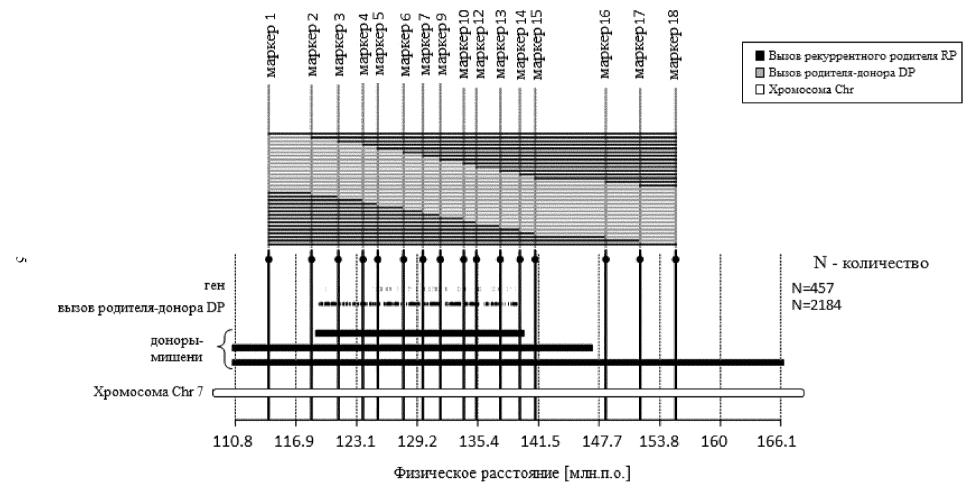




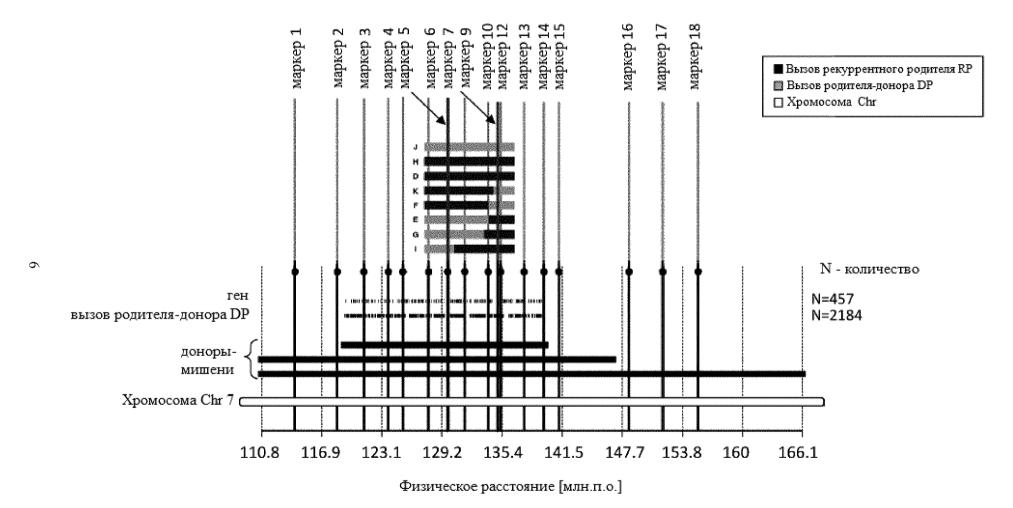
Фиг. 1



Фиг. 2

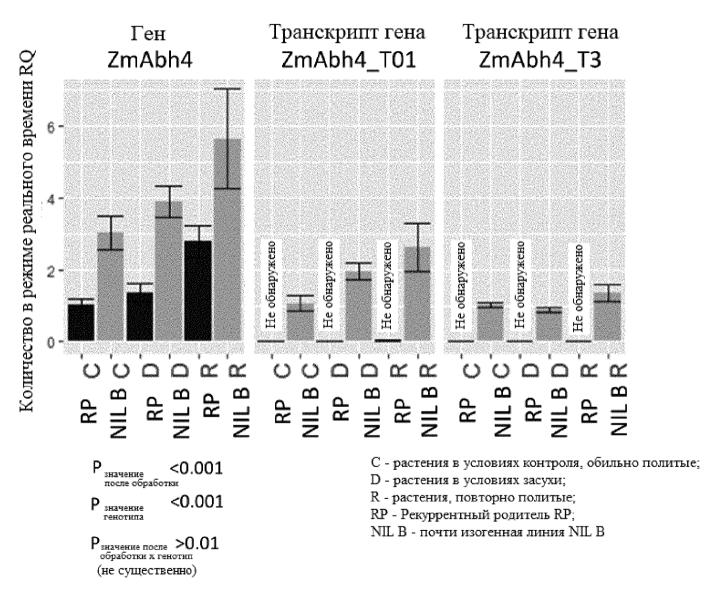


Фиг. 3



Фиг. 4

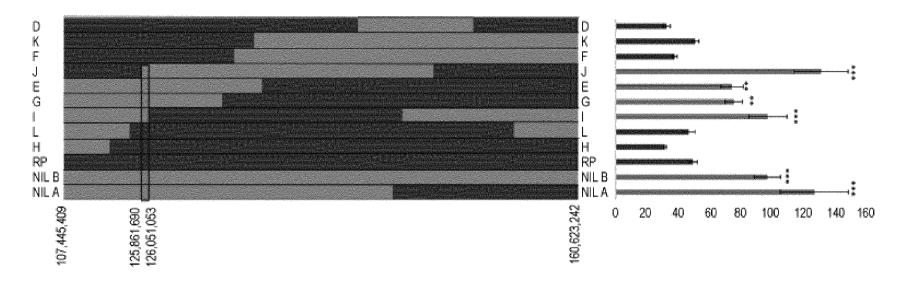




Фиг. 5

$$\infty$$

Фиг. 6

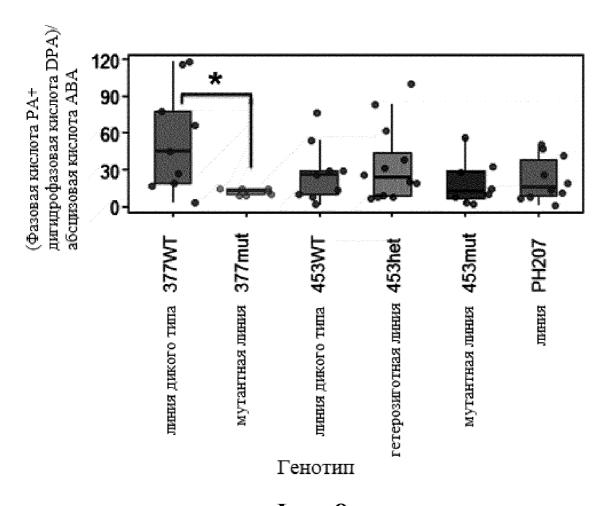


D, K, F, J, E, G, I, L, H - Молекулярные маркеры

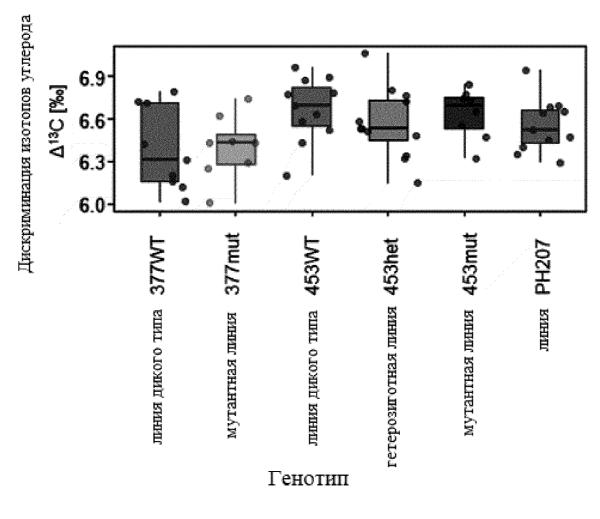
RP - рекуррентный родитель NIL B - почти изогенная линия NIL B

NIL A - почти изогенная линия NIL A

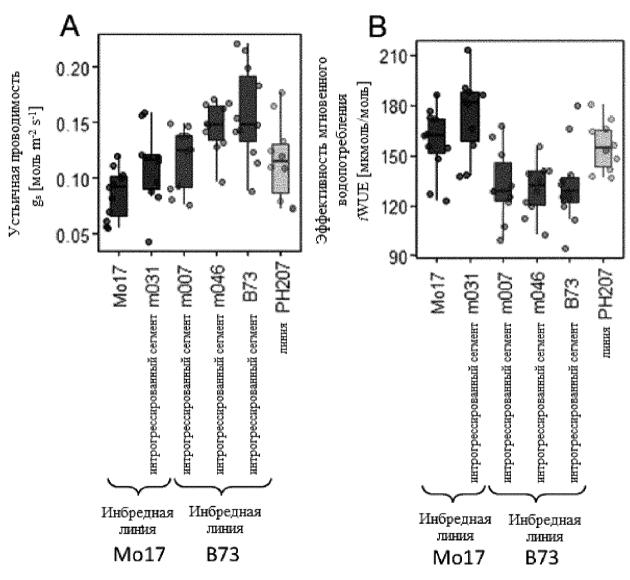
Фиг. 7



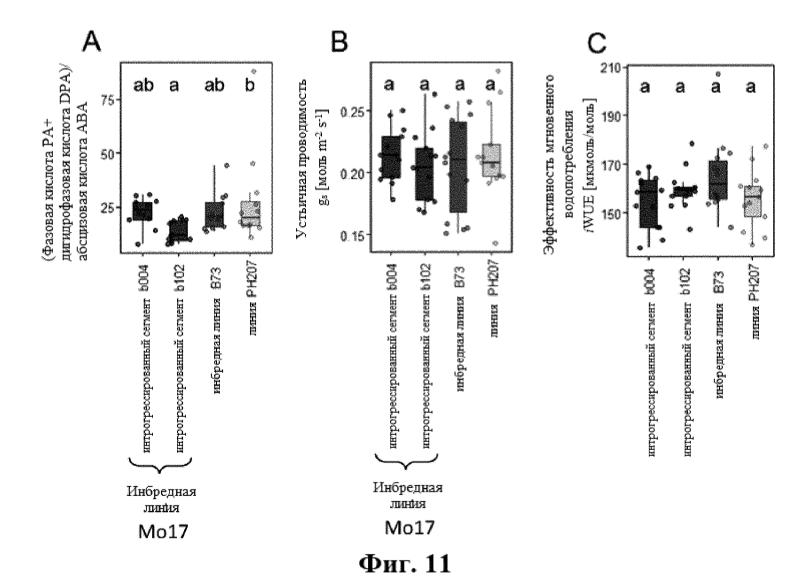
Фиг. 8

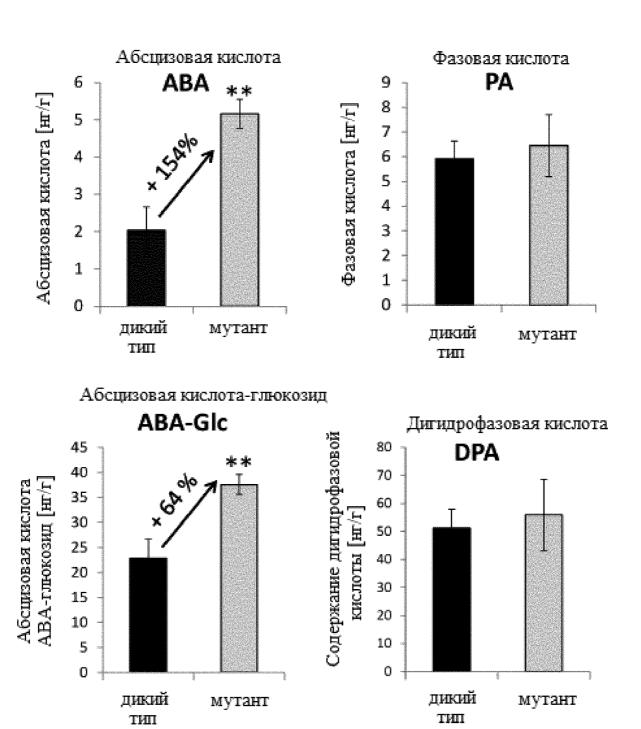


Фиг. 9

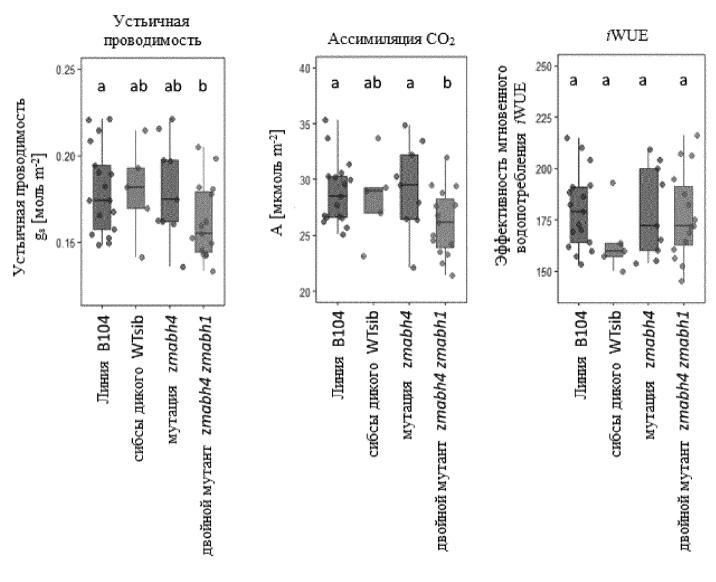


Фиг. 10

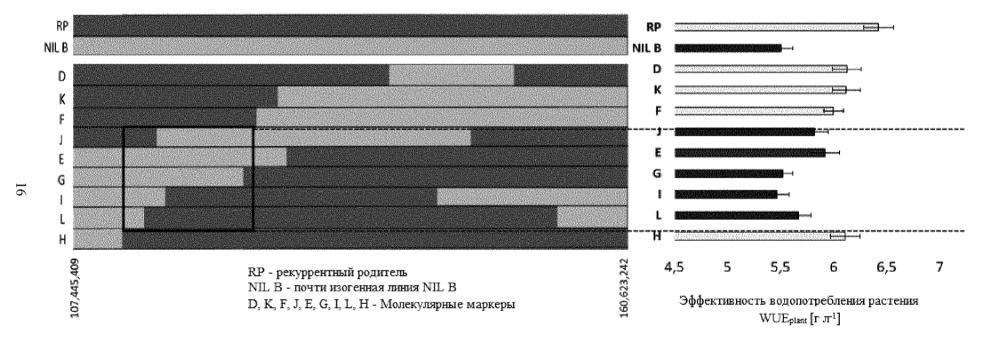




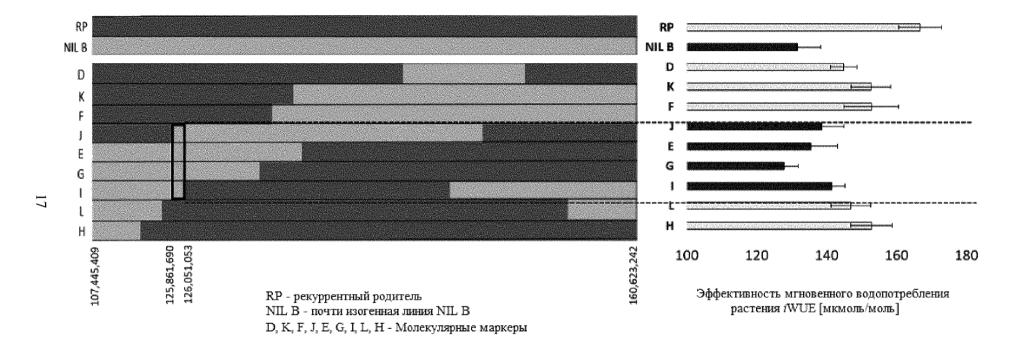
Фиг. 12



Фиг. 13

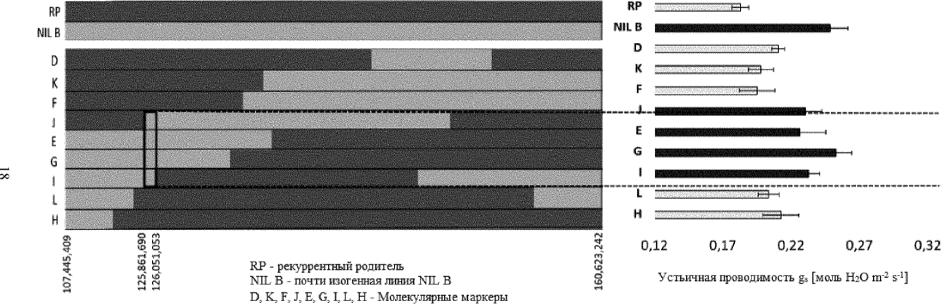


Фиг. 14



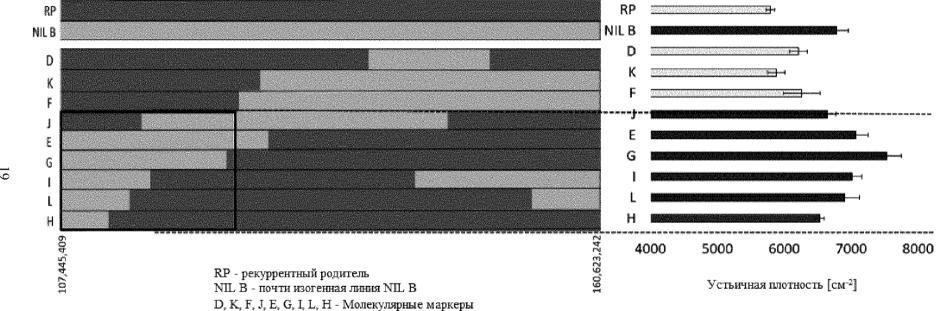
Фиг. 15



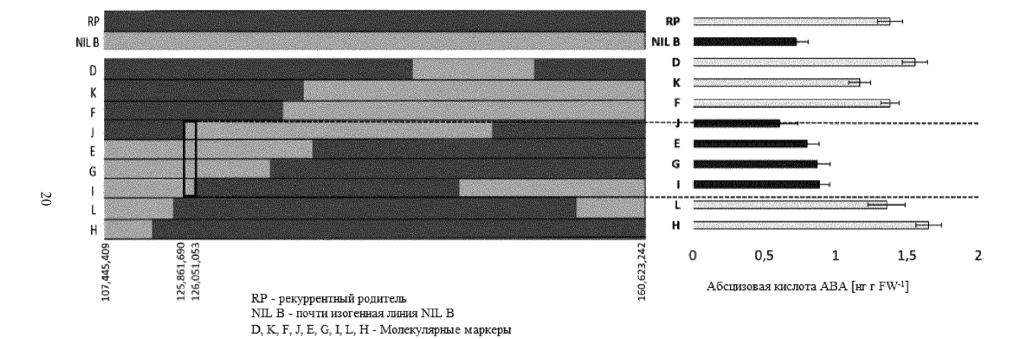


Фиг. 16

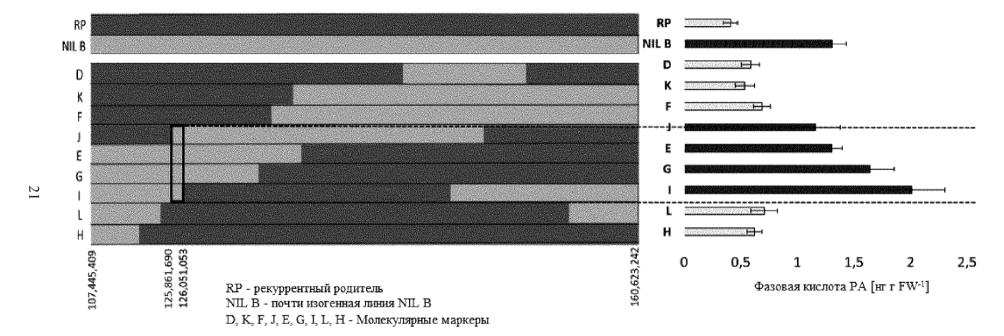




Фиг. 17

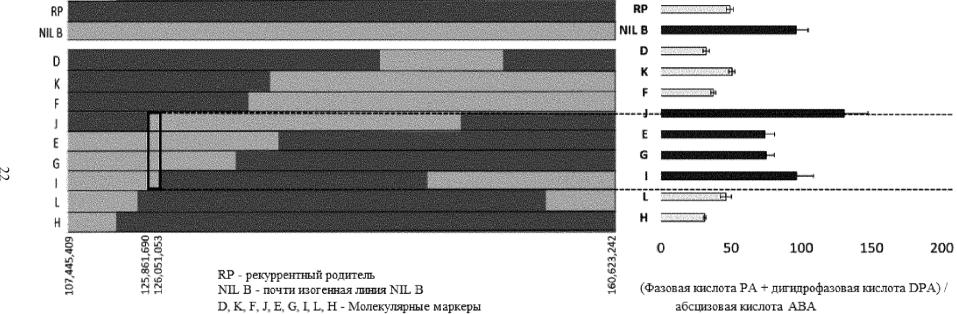


Фиг. 18

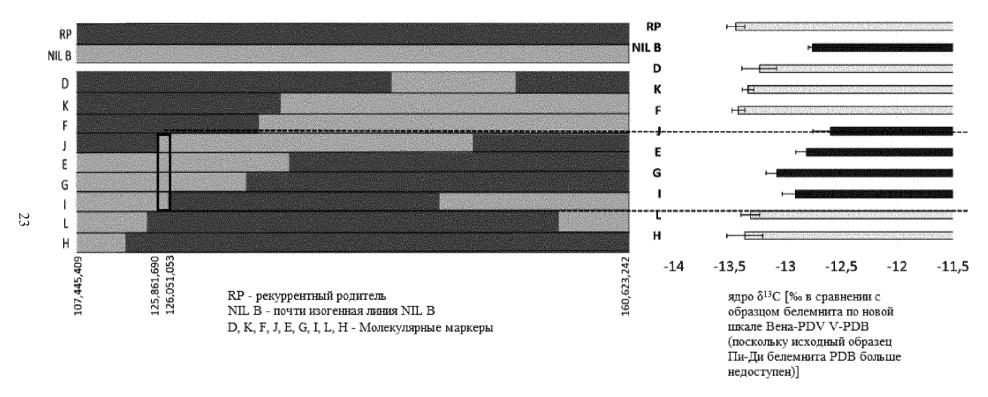


Фиг. 19

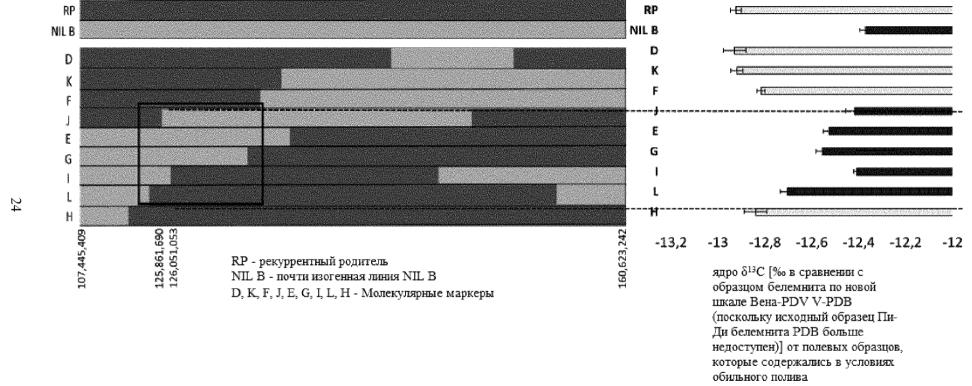




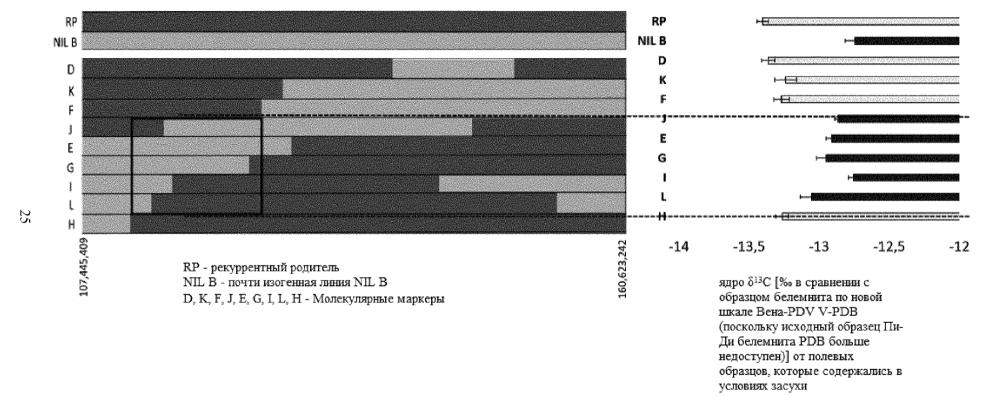
Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23