



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.29

(51) Int. Cl. **C12N 15/82** (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(21) Номер заявки
201892288

(22) Дата подачи заявки
2017.04.12

(54) ЯДЕРНО-КОДИРУЕМАЯ МУЖСКАЯ СТЕРИЛЬНОСТЬ КАК РЕЗУЛЬТАТ МУТАЦИИ ЦИТОХРОМ P450 ОКСИДАЗЫ

(31) **10 2016 106 656.7**

(32) **2016.04.12**

(33) **DE**

(43) **2019.04.30**

(86) **PCT/EP2017/058815**

(87) **WO 2017/178541 2017.10.19**

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

(72) Изобретатель:
**Борхардт Дитрих, Чарнецки Олаф,
Мехелке Вольфганг (DE)**

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

(56) VESNA DJUKANOVIC ET AL.: "Male-sterile maize plants produced by targeted mutagenesis of the cytochrome P450-like gene (MS26) using a re-designed I- Cre I homing endonuclease", THE PLANT JOURNAL, vol. 76, № 5, 5 December 2013 (2013-12-05), pages 888-899, XP055218454, GB, ISSN: 0960-7412, DOI: 10.1111/tpj.12335, the whole document

A. MARK CIGAN ET AL.: "Targeted mutagenesis of a conserved anther-expressed P450 gene confers male sterility in monocots", PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 15, № 3, 1 March 2017 (2017-03-01), pages 379-389,

XP055401700, GB, ISSN: 1467-7644, DOI: 10.1111/pbi.12633, abstract

H. LI ET AL.: "Cytochrome P450 Family Member CYP704B2 Catalyzes the -Hydroxylation of Fatty Acids and Is Required for Anther Cutin Biosynthesis and Pollen Exine Formation in Rice", THE PLANT CELL, vol. 22, № 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 173-190, XP055401749, US, ISSN: 1040-4651, DOI: 10.1105/tpc.109.070326, abstract

DATABASE UniProt [Online] 14 October 2015 (2015-10-14), "SubName: Full=Uncharacterized protein {ECO:0000313|EMBL:KMT20292.1}", XP002773258, retrieved from EBI accession № UNIPROT:A0A0J8D3D0, database accession № A0A0J8D3D0, sequence

M. MORANT ET AL.: "CYP703 Is an Ancient Cytochrome P450 in Land Plants Catalyzing in-Chain Hydroxylation of Lauric Acid to Provide Building Blocks for Sporopollenin Synthesis in Pollen", THE PLANT CELL, vol. 19, № 5, 1 May 2007 (2007-05-01), pages 1473-1487, XP055401645, US, ISSN: 1040-4651, DOI: 10.1105/tpc.106.045948, cited in the application, abstract

KIM SUNG SOO ET AL.: "Sporopollenin monomer biosynthesis in arabidopsis", JOURNAL OF PLANT BIOLOGY, BOTANICAL SOCIETY OF KOREA, SEOUL, KR, vol. 56, № 1, 8 February 2013 (2013-02-08), pages 1-6, XP035344579, ISSN: 1226-9239, DOI: 10.1007/S12374-012-0385-3 [retrieved on 2013-02-08], page 2, right-hand column, paragraph 2 - page 3, left-hand column, paragraph 1

(57) Изобретение касается растений, имеющих рецессивный ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип, и коррелирующего с ним локуса гена (gst), включая ген, который ответственен за фертильный/стерильный фенотип и который мутирован в стерильном фенотипе. Изобретение также обеспечивает способы идентификации генотипа, коррелирующего с экспрессией признаков, указанных выше, и соответствующие генетические инструменты, такие как зонды для гибридизации и олигонуклеотиды. Описано также использование растений, получаемых по данному изобретению, в селекции гибридов и производстве продуктов из возобновляемых сырьевых материалов, таких как биоэтанол, биогаз и продукты на основе сахара.

Область техники

Настоящее изобретение относится к области упрощения трудоемких селекционных программ с помощью методов молекулярной биологии, генной инженерии и маркерных технологий. В частности, изобретение обеспечивает растения, проявляющие гомозиготный ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип в результате спонтанной мутации участка гена в ядерном геноме, причем в отличие от ЦМС (цитоплазматической мужской стерильности) мутация достигается посредством экспрессии рецессивного признака, что исключает необходимость получения стерильных и фертильных генотипов в селекционной программе. В этой связи настоящее изобретение обеспечивает растения, в частности растения сахарной свеклы и картофеля, в которых мутация, являющаяся результатом вышеупомянутой экспрессии признака, детектируется в гене цитохром Р450 оксидазы (CYPgst) при помощи маркерных технологий, а также соответствующий способ идентификации данной мутации. Кроме того, изобретение обеспечивает белок CYPgst, молекулу ДНК, содержащую не мутировавший ген, обеспечивающий вышеупомянутую экспрессию признака, рекомбинантную молекулу ДНК, обеспечивающую получение гена дикого типа, промотор для специфических экспрессий такого гена или гетерологичный ген в цветках и/или плодах растений, и/или нуклеотидную последовательность, кодирующую ингибиторы гена CYPgst, а также соответствующие векторы и клетки-хозяева.

Настоящее изобретение также касается растений, модифицированных посредством генной инженерии, которые имеют рецессивный ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип в результате ингибирования экспрессии гена CYPgst, соответствующих ингибиторов, а также способов ингибирования гена и способов восстановления фертильности. Изобретение также касается использования таких растений в селекции гибридов, селекции на устойчивость и/или производстве семян. Также изобретение включает семена или потомков, органы, растительные части, ткани или клетки растений по данному изобретению, а также их применение.

Предпосылки создания изобретения

Для контролируемого получения изменения генетики растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*), а также всех других культивируемых растений, осуществляется скрещивание. У еще закрытых цветков родительской формы вручную удаляются пыльники, несущие пыльцу. Опыление также проводится вручную путем нанесения пыльцы донора на рыльца родительской формы. Как альтернативный вариант опыление может также осуществляться после удаления пыльников у цветков родительской формы путем помещения пыльцы донора в пространственной близости от родительской формы для цветения и доставки пыльцы. В любом случае это связано с процессом ведения трудоемких протоколов, который весьма предрасположен к ошибкам, так как если удаляется только часть пыльников цветка, то может иметь место самоопыление.

В настоящее время (коммерческие) гибридные семена часто получают путем скрещивания между компонентами родительской формы генотипов, проявляющих ЦМС (цитоплазматическую мужскую стерильность), и последующего возвратного скрещивания, чтобы увеличить генетическую часть компонентов родительской формы. Получаемые в результате мужские стерильные компоненты родительской формы можно затем выращивать в большом количестве, при этом опыление происходит вследствие того, что доноры пыльцы растут рядом (топкроссный метод). Поскольку доминантный ген ЦМС наследуется по материнской линии, то для использования линий с ЦМС одновременно должны обеспечиваться фертильные линии-закрепители стерильности (не являющиеся линиями О-типов из ЦМС), чтобы могло иметь место опыление ЦМС-линий. Это требует большого объема работ по планированию и значительных производственных усилий, а также сложной логистики. Например, для получения семян достаточно высокого качества коммерчески значимые сорта сахарной свеклы в настоящее время являются тройными гибридами. Создание гибридов в селекционных программах также является дорогостоящим и трудозатратным и пока связано с наличием преград на этом пути.

Отмечены линии или генотипы многочисленных растений, проявляющие естественно встречающуюся ядерно-кодируемую мужскую стерильность (мс: мужская стерильность). Она обычно вызывается спонтанной мутацией гена в ядерном геноме, которая происходит в результате экспрессии рецессивного признака. Использование генотипов, являющихся ядерно-кодируемыми мужскими стерильными по фенотипу, подходит для упрощения процессов селекции и/или применения этих процессов для получения гибридных семян. Таким образом, фенотипы с мужской стерильностью обладают тем преимуществом, что их использование не требует ручного удаления пыльников, а также исключает необходимость одновременного получения фертильных и стерильных генотипов, поскольку, в свою очередь, гетерозиготные генотипы в каждом репродуктивном цикле расщепляются на фертильные и стерильные индивиды посредством самоопыления.

Исходя из вышеизложенного целью настоящего изобретения является обеспечение средств и способов для использования ядерно-кодируемой мужской стерильности у культурных растений, в частности у растений сахарной свеклы и картофеля. Данная цель достигается посредством вариантов осуществления изобретения, указанных в описании и формуле изобретения.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к области упрощения трудоемких селекционных программ, мар-

керной технологии и генной инженерии. Изобретение обеспечивает растения, проявляющие рецессивный ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип в результате мутации сегмента ДНК, содержащего цитохром P450 оксидазы (CYPgst). Ген CYPgst и мутация идентифицируются путем использования маркерных технологий и методов молекулярной биологии. Поскольку мутация остается интактной вследствие экспрессии рецессивного признака, и гетерозиготные генотипы в результате самоопыления в ходе каждого репродуктивного цикла затем расщепляются на фертильные и стерильные генотипы, то не требуется одновременное получение фертильных линий-закрепителей стерильности. Полученные данные можно использовать для создания трансгенных растений, имеющих рецессивный ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип, а также для восстановления фертильности.

Таким образом, настоящее изобретение касается вариантов осуществления, представленных в следующих параграфах 1-37 и иллюстрируемых примерами.

1. Растение, в частности культурное растение, проявляющее рецессивный ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип, при этом фенотип обуславливается мутацией гена эндогенной цитохром P450 оксидазы (CYPgst) или отсутствием, пониженным содержанием или пониженной активностью функционального белка CYPgst, кодируемого геном дикого типа CYPgst, по сравнению с соответствующим (мужским фертильным) растением дикого типа, причем не мутировавший ген CYPgst представляет собой

a) ген BvCYPgst *Beta vulgaris*, который предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2 или кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, либо его гомолог, аналог или ортолог;

b) ген StCYPgst *Solarium tuberosum*, который предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12 или 13 или кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, либо его гомолог, аналог или ортолог;

c) ген ZmCYPgst *Zea mays*, который предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9 или 10 или кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, либо его гомолог, аналог или ортолог.

2. Растение согласно параграфу 1, являющееся гетерозиготным по мутации и мужским фертильным или гомозиготным по мутации и мужским стерильным, в котором развитие функциональной пыльцы супрессируется, предпочтительно супрессируется полностью, у стерильных растений.

3. Растение согласно параграфу 1 или 2, в котором ген CYPgst экспрессируется по меньшей мере в закрытых цветках и плодах.

4. Растение согласно любому из параграфов 1-3, в котором мутация предотвращает транскрипцию и/или трансляцию функционального белка, при этом предпочтительно мутация касается делеции, присоединения, инсерции или замещения в кодирующей нуклеотидной последовательности гена CYPgst, последовательности сигнала для сплайсинга или регуляторной последовательности, предпочтительно в последовательности промотора гена CYPgst. В предпочтительном варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты имеет мутацию, которую можно также встретить в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8, в отличие от гена дикого типа согласно SEQ ID NO: 1. В частности, мутация может представлять собой делецию между нуклеотидными позициями 1560 и 2095 SEQ ID NO: 1 или соответствующими позициями SEQ ID NO: 12 или 9. Делеция может содержать по меньшей мере 20, 30 или 50 последовательных пар оснований, предпочтительно по меньшей мере 100, 150, 200 или 250 последовательных пар оснований и наиболее предпочтительно по меньшей мере 300, 400 или 500 последовательных пар оснований. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 8. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты имеет точечную мутацию в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 (см. таблицу) предпочтительно между нуклеотидными позициями 1560 и 2095 SEQ ID NO: 1.

5. Растение согласно параграфу 4, являющееся растением *Beta vulgaris*, предпочтительно растением *Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*, в котором делецию можно детектировать посредством определения отсутствия одного или обоих маркерных локусов sle5983d14 (продукт амплификации праймера, имеющего последовательности SEQ ID NO: 4 и 5) и sle5983d17 (продукт амплификации праймера, имеющего последовательности SEQ ID NO: 6 и 7), а также посредством определения присутствия убиквитарного маркера.

6. Растение согласно любому из параграфов 1-5, в котором ген локализуется в *Beta vulgaris*, предпочтительно *Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*, в сегменте хромосомы 1 между маркерными локусами sxn215s01 и sle3305s02, при этом последовательность маркера sxn215s01, показанная в SEQ ID NO: 24, и последовательность маркера sle3305s02, показанная в SEQ ID NO: 26, указывают на присутствие локуса *gst*, и последовательность маркера sxn215s01, показанная в SEQ ID NO: 25, и последовательность маркера sle3305s02, показанная в SEQ ID NO: 27, указывают на референсную последовательность.

7. Растение согласно параграфу 6, в котором длина последовательности составляет приблизительно от 50 до 5000 kbp, от 100 до 1000 kbp, более предпочтительно от 100 до 500 kbp и наиболее предпочтительно от 200 до 250 kbp.

8. Растение согласно любому из параграфов 1-7, в котором не мутировавший ген представляет собой функциональный ген BvCYPgst *Beta vulgaris*, предпочтительно *Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*, или

функциональный гомологичный, аналогичный или ортологичный ген другого культивируемого (CYPgst) или культурного растения.

9. Растение согласно параграфу 8, в котором гомологичный, аналогичный или ортологичный ген представляет собой ген *Zea mays*, который предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9 или 10 или кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, ген *Solarium tuberosum*, который предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12 или 13 или кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, ген *Triticum aestivum*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, ген *Helianthus annuus*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, ген *Hordeum vulgare*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, ген *Brassica napus*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, ген *Brassica oleracea*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, ген *Brassica rapa*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, ген *Glycine max*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, ген *Gossypium*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, или ген *Sorghum bicolor*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23.

10. Растение согласно любому из параграфов 1-9, в котором не мутировавший ген (ген дикого типа) имеет нуклеотидную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из

(a) нуклеотидной последовательности, представленной нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, либо ее функционального фрагмента (см. фиг. 4A и 4B);

(b) нуклеотидной последовательности, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3;

(c) нуклеотидной последовательности, способной гибридизоваться в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности согласно (a) или (b);

(d) нуклеотидной последовательности, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую различия с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, проявляющиеся в форме аминокислотных делеций, замещений, присоединений и/или инсерций в аминокислотной последовательности, и которая предпочтительно идентична по меньшей мере на 60% аминокислотной последовательности по всей ее длине;

(e) нуклеотидной последовательности, которая кодирует белок, обладающий одной и той же ферментативной активностью, что и белок, кодируемый нуклеотидной последовательностью согласно любой из нуклеотидных последовательностей (a)-(d); и

(f) нуклеотидной последовательности, содержащей по меньшей мере 200 или 400, предпочтительно по меньшей мере 600 или 800, наиболее предпочтительно по меньшей мере 1000 последовательных нуклеотидов промотора последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 с нуклеотидными позициями от 1 до 1518, предпочтительно от 518 до 1518, наиболее предпочтительно от 1318 до 1518, или последовательности, которая гибридизуется в этом участке, причем нуклеотидная последовательность способна контролировать экспрессию гена, и гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты оперативно связана с нуклеотидной последовательностью, особенно в закрытых цветках или плодах.

Нуклеотидная последовательность согласно (c), (d) или (e) представляет собой, например, нуклеотидную последовательность, которая имеет последовательность нуклеотидов, представленную в SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13, или ее функциональный фрагмент, либо которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14. Также нуклеотидная последовательность согласно (c), (d) или (e) представляет собой, например, нуклеотидную последовательность, которая имеет последовательность нуклеотидов, представленную в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или ее функциональный фрагмент, либо которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11. Кроме того, нуклеотидная последовательность согласно (c), (d) или (e) представляет собой, например, нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 15-23.

11. Растение согласно любому из параграфов 1-10, характеризующееся тем, что оно является инбредным или гибридным растением.

12. Растение согласно любому из параграфов 1-11, характеризующееся тем, что оно является растением рода *Zea*, *Solanum*, *Triticum*, *Triticale*, *Helianthus*, *Secale*, *Hordeum*, *Brassica*, *Brachypodium*, *Glycine*, *Gossypium*, *Sorghum*, *Saccharum*, *Setaria*, *Aegilops*, *Oryza*, *Daucus*, *Eucalyptus*, *Erythranthe*, *Genlisea*, *Musa*, *Avena*, *Nicotiana*, *Coffea*, *Vitis*, *Cucumis*, *Morus*, *Crucihimalaya*, *Cardamine*, *Lepidium*, *Capsella*, *Olimarabidopsis*, *Arabis*, *Raphanus*, *Eruca*, *Citrus*, *Jatropha*. *Populus* или *Beta*, предпочтительно растение вида *Zea mays*, *Solarium tuberosum*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum spelta*, *Helianthus annuus*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Glycine max*, *Gossypium* sp., *Sorghum bicolor*, *Triticale*, *Saccharum officinarum*, *Setaria italica*,

14. Рекомбинантная молекула ДНК согласно параграфу 13, содержащая

(ii) кодирующую нуклеотидную последовательность, представленную в параграфе 10 (a)-(e), кооперативно связана с гетерологичным промотором, и предпочтительно способная управлять экспрессией нуклеотидной последовательности, особенно в закрытых цветках или плодах.

16. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в параграфе 10, с мутацией в форме делеции, присоединения, инсерции или замещения, в которой данная мутация не приводит к синтезу функциональных белков CYPgst. Предпочтительно мутация происходит в кодирующей нуклеотидной последовательности гена CYPgst, локализуемой в сигнале для сплайсинга, или в регуляторной последовательности гена CYPgst, предпочтительно в промоторе гена CYPgst. В предпочтительном варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты имеет мутацию, которая можно также обнаружить в нуклеотидной последовательности согласно SEQ ID NO: 8. В частности, мутация может представлять собой делецию между нуклеотидными позициями 1560 и 2095 SEQ ID NO: 1 или между соответствующими позициями в SEQ ID NO: 12 или 9. Делеция может иметь длину по меньшей мере в 20, 30 или 50 последовательных пар оснований, более предпочтительно по меньшей мере в 100, 150, 200 или 250 последовательных пар оснований и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 300, 400 или 500 последовательных пар оснований. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 8. В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты имеет точечную мутацию в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 согласно таблице, предпочтительно между нуклеотидными позициями 1560 и 2095 SEQ ID NO: 1.

- 4 -

ния изобретения длина молекулы нуклеиновой кислоты превышает размер по меньшей мере одного интрона SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 12, т.е. молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательно расположенные

i) по меньшей мере один нуклеотид с 3'-конца экзона 1 SEQ ID NO: 1 (предпочтительно последний нуклеотид экзона 1 SEQ ID NO: 1 в направлении 5'-3', соответствующий нуклеотиду в позиции 583 SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере один нуклеотид с 5'-конца экзона 2 SEQ ID NO: 1 (предпочтительно первый нуклеотид экзона 2 SEQ ID NO: 1 в направлении 5'-3', соответствующий нуклеотиду в позиции 584 SEQ ID NO: 2),

ii) по меньшей мере один нуклеотид с 3'-конца экзона 1 SEQ ID NO: 12 (предпочтительно последний нуклеотид экзона 1 SEQ ID NO: 12 в направлении 5'-3', соответствующий нуклеотиду в позиции 271 SEQ ID NO: 13) и по меньшей мере один нуклеотид с 5'-конца экзона 2 SEQ ID NO: 12 (предпочтительно первый нуклеотид экзона 2 SEQ ID NO: 12 в направлении 5'-3', соответствующий нуклеотиду в позиции 272 SEQ ID NO: 13);

iii) по меньшей мере один нуклеотид с 3'-конца экзона 2 SEQ ID NO: 12 (предпочтительно последний нуклеотид экзона 2 SEQ ID NO: 12 в направлении 5'-3', соответствующий нуклеотиду в позиции 984 SEQ ID NO: 13) и по меньшей мере один нуклеотид экзона 3 SEQ ID NO: 12 в направлении 5'-3', соответствующий нуклеотиду в позиции 985 SEQ ID NO: 13); либо

iv) по меньшей мере один нуклеотид с 3'-конца экзона 1 SEQ ID NO: 9 (предпочтительно последний нуклеотид экзона 1 SEQ ID NO: 9 в направлении 5'-3', соответствующий нуклеотиду в позиции 987 SEQ ID NO: 10) и по меньшей мере один нуклеотид с 5'-конца экзона 2 SEQ ID NO: 9 (предпочтительно первый нуклеотид экзона 2 SEQ ID NO: 9 в направлении 5'-3', соответствующий нуклеотиду в позиции 928 SEQ ID NO: 10). В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность состоит по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19 или 20, предпочтительно по меньшей мере из 21, 22, 23, 24 или 25, более предпочтительно по меньшей мере из 30, 35, 40, 45 или 50 и наиболее предпочтительно по меньшей мере из 100, 200, 300, 500 или 1000 последовательных нуклеотидов, и способна специфически гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью, представленной в 10 или 16.

18. Олигонуклеотид длиной предпочтительно не более 50 нуклеотидов, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно параграфу 17 или молекулу нуклеиновой кислоты, способную специфически гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью согласно SEQ ID NO: 8, и/или предпочтительно имеющий одну из следующих нуклеотидных последовательностей:

i) SEQ ID NO: 4, 6 или их комплемент; либо

ii) SEQ ID NO: 5, 7 или их комплемент.

19. Вектор, предпочтительно растительный вектор, содержащий молекулу ДНК или молекулу нуклеиновой кислоты согласно любому из параграфов 13-16 или молекулу нуклеиновой кислоты согласно параграфу 17.

20. Вектор согласно параграфу 19, в котором молекула ДНК или молекула нуклеиновой кислоты в виде трансгена способна экспрессировать функциональный CYPgst и предпочтительно генетически связана с другим трансгеном, предотвращающим перенос молекулы ДНК или молекулы нуклеиновой кислоты через пыльцу, при этом предпочтительно вектор или трансген также содержит экспрессионную кассету, которая маркирует семена, предпочтительно флуоресцентными метками.

21. Клетка-хозяин, предпочтительно растительная клетка, содержащая рекомбинантную молекулу ДНК или молекулу нуклеиновой кислоты согласно любому из параграфов 13-16, или вектор согласно параграфу 19 или 20.

22. Белок CYPgst, кодируемый нуклеотидной последовательностью, представленной в параграфе 10, или его функциональный и/или иммунологически активный фрагмент. Белок CYPgst предпочтительно представляет собой

a) аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 14-23; или

b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 82, 84, 86 или 88%, предпочтительно по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94 или 95%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 99,5% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, предпочтительно по всей ее длине.

23. Антитело, которое специфически связывается с белком CYPgst или его фрагментом согласно параграфу 22.

24. Набор, содержащий молекулу ДНК или молекулу нуклеиновой кислоты согласно любому из параграфов 13-16, нуклеиновую кислоту согласно параграфу 17, олигонуклеотид согласно параграфу 18, вектор согласно параграфу 19 или 20, белок CYPgst или его фрагмент согласно параграфу 22 и/или антитело согласно параграфу 23, а также потенциально реагенты, предназначенные для процедур, основанных на детекции нуклеиновых кислот, или для иммунологической детекции.

25. Способ получения растения, в частности культурного растения, проявляющего гомозиготный рецессивный ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип, при котором ингибируется экспрессия гена CYPgst.

26. Способ согласно параграфу 25, характеризующийся тем, что он включает в себя этап введения рекомбинантной молекулы ДНК согласно параграфу 15, молекулы нуклеиновой кислоты согласно параграфу 16 или 17 или вектора согласно параграфу 19 или 20, например, посредством агробактериальной трансформации, Т-ДНК мечения, гомологичной рекомбинации, мутагенеза, такого как TILLING, и направленного мутагенеза, например, с использованием нуклеаз "цинковые пальцы", TALE-нуклеаз (эффektorные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции) и системы CRISPR/Cas, приводящий к ингибированию экспрессии гена, например, посредством iРНК, косупрессии, либо вследствие введенной мутации.

27. Способ восстановления фертильности растения согласно любому из параграфов 1-12 или растения, которое можно получать посредством способа согласно параграфу 25 или 26, включающий введение в растение функционального гена CYPgst.

28. Способ согласно параграфу 27, при котором ген CYPgst вводится с помощью рекомбинантной ДНК согласно параграфу 13 или 14, вектора согласно параграфу 19 или 20, либо посредством скрещивания растения, несущего ген CYPgst дикого типа или функциональный ген CYPgst, предпочтительно в гомозиготном состоянии. Как вариант, отбор по присутствию гена CYPgst дикого типа или функционального гена CYPgst можно проводить в следующем поколении.

29. Растение, содержащее растительные клетки согласно параграфу 21 и/или которое можно получать способом согласно любому из параграфов 25-28.

30. Орган, растительная часть, ткань или клетка растения согласно любому из параграфов 1-12 или 19.

31. Семена или потомки растения согласно любому из параграфов 1-12 или 29, характеризующиеся тем, что семена или потомки содержат мутацию, представленную в любом из параграфов 1-12, и/или рекомбинантную молекулу ДНК или молекулу нуклеиновой кислоты согласно любому из параграфов 13-16 или вектор согласно параграфу 19 или 20.

32. Способ идентификации растения согласно любому из параграфов 1-12 или 29 путем детекции мутации гена CYPgst или маркера, связанного с мутацией.

33. Использование молекулы ДНК или молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из параграфов 13-16, молекулы нуклеиновой кислоты согласно параграфу 17, олигонуклеотида согласно параграфу 18, вектора согласно параграфу 19 или 20, белка CYPgst или его фрагмента согласно параграфу 22, антитела согласно параграфу 23 и/или наборов согласно параграфу 24, предназначенных для получения растения согласно любому из параграфов 1-12 или 29, получения рецессивного ядерно-кодируемого мужского стерильного растения, растения с восстановленной фертильностью, гибридного растения, в селекционных программах на устойчивость или для производства семян.

34. Использование молекулы ДНК согласно параграфу 14 или промотора, представленного в параграфе 14, для специфической экспрессии гетерологичных молекул нуклеиновой кислоты в цветках и/или плодах растений.

35. Использование растения согласно любому из параграфов 1-12 или 29, органа, растительной части, ткани или клетки согласно параграфу 30, семян или потомков согласно параграфу 31 или растения, которое можно идентифицировать согласно параграфу 32 или получать посредством осуществления использования согласно параграфу 33 или 34 или тканей, клеток, потомков или семян для производства пищевых продуктов, активных веществ, лекарственных средств и их прекурсоров, диагностических продуктов, косметики, чистых химикатов, сахара, патоки, биоэтанола или биогаза.

36. Пищевые продукты, корма или активные вещества, содержащиеся в растении согласно любому из параграфов 1-12 или 29, органе, растительной части, ткани или клетке согласно параграфу 30, семенах или потомках согласно параграфу 31 или в растении, которое идентифицируется при помощи способа согласно параграфу 32 или которое можно получать посредством осуществления использования согласно параграфу 33 или 34, либо его тканей, клеток, потомков или семян.

37. Использование растения согласно любому из параграфов 1-12 или 29 для селекции или получения растения-потомка, при которых для рекуррентного отбора используется ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип.

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

Выражения "сегмент хромосомы", "хромосомный сегмент", а также их вариации, используются взаимозаменяемо, если не указано иное, и означают конкретный хромосомный сегмент ДНК конкретной хромосомы, содержащий по меньшей мере один ген.

"Ген CYPgst" или "ген CYPgst дикого типа", кодируемый "белком CYPgst", играет роль в образовании жизнеспособной пыльцы, причем мутация CYPgst вызывает мужскую стерильность у растений вследствие супрессии образования функциональной пыльцы. Это было экспериментально показано на примере сахарной свеклы (*Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*). Сравнение гомологий позволило установить сходство с геном CYP703 *Arabidopsis thaliana*, который, как следует из существующего уровня техники (Morant et al., *The Plant Cell*, 19 (2007), 1473-1487), выполняет основную функцию в синтезе спорополленина и предпочтительно катализирует преобразование среднецепочечных насыщенных жирных кислот в соответствующие простые гидроксированные жирные кислоты, предпочтительно в процессе гидроксирования лауриновой кислоты в позиции С-7. Элиминация гена CYP703 в *Arabidopsis thaliana* при-

водит к частичной мужской стерильности. Количество пыльцы действительно сокращалось, однако функциональная пыльца все еще могла образовываться. В связи с этим ген *Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*, по-видимому, выполняет иную функцию, так как его элиминация приводит к мужской стерильности растения. Безотносительно какой-либо теории, можно предположить, что ген *CYPgst* должен быть отнесен к другой классификации генов *CYP*, либо что у культивируемых растений, в частности у культурных растений, таких как сахарная свекла, он выполняет иную функцию или имеет иное значение в отличие от низшего модельного растения *Arabidopsis thaliana*; см. обсуждение в примере 1. Специалист в данной области техники может получить информацию о других белках *CYPgst* из баз данных, используя другие поисковые параметры и компьютерные программы для скрининга гомологичных последовательностей или сравнения последовательностей. Возможную оценку того, выполняет ли идентифицированный ген ту же функцию, что и ген *CYPgst Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*, можно проводить путем восстановления функции *CYPgst* в мужском стерильном растении сахарной свеклы посредством гетерологичной экспрессии идентифицированного гена, т.е. путем восстановления фертильности с помощью трансгена.

Безотносительно какой-либо теории, представляется также возможным, что ген *CYPgst Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*, и ген *CYP703 Arabidopsis thaliana* относятся к одному и тому же семейству *CYP* и, таким образом, выполняют ту же или по меньшей мере сходную функцию в синтезе спорополленина, однако у культивируемых растений, которые годами направленной селекции и скрещивания оптимизировались относительно урожайности, устойчивости к вредителям и абиотическим стрессовым факторам и т.п., а также содержания растительных веществ, способность компенсировать потерю спорополленина утрачена и поэтому в результате отсутствия спорополленина образование пыльцы супрессируется, что делает растения мужскими стерильными.

Согласно изобретению термин "локус *gst*" относится к геномной ДНК растения, в частности культурного растения, где мутация обуславливается рецессивно-наследуемой ядерно-кодируемой мужской стерильностью, причем мутация затрагивает ген цитохром P450 оксидазы (*CYPgst*) и содержится в локусе *gst* растения, подвергнувшегося мутации. В частности, при возникновении мутации у гомозиготных растений содержание или активность функционального белка *CYPgst* оказывается ниже, чем у соответствующего (мужского фертильного) растения, содержащего локус дикого типа (растение дикого типа), либо он вообще отсутствует. Обычно мутация гена *CYPgst* предотвращает транскрипцию и/или трансляцию функционального белка *CYPgst*.

Термин "тесно сцепленный" следует понимать, как означающий, что расстояние между двумя фланкирующими локусами (например, двумя маркерами (маркерными локусами)) на генетической карте составляет менее 15 сМ, менее 12 сМ, менее 10 сМ, менее 8 сМ, менее 7 сМ, менее 6 сМ, менее 5 сМ, менее 4 сМ, менее 3 сМ, менее 2 сМ, менее 1 сМ, менее 0,5 сМ, менее 0,2 сМ, менее 0,1 сМ, менее 0,05 сМ.

Термин "гибридизировать" или "гибридизация" означает процесс, при котором одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты соединяется с несколько возможно комплементарной цепочкой нуклеиновой кислоты, т.е. при этом образуются пары оснований. Стандартные методы гибриризации описаны, например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

Предпочтительно это означает, что по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 65, 70, 75, 80 или 85%, наиболее предпочтительно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% оснований молекулы нуклеиновой кислоты образуют пары оснований с несколько возможно комплементарной цепочкой нуклеиновой кислоты. Возможность такого соединения зависит от жесткости условий гибриризации. Термин "жесткость" относится к условиям гибриризации. Условия высокой жесткости означают условия, при которых образование пар оснований затруднено; условия низкой жесткости означают условия, при которых образование пар оснований проходит легче. Жесткость условий гибриризации зависит, например, от концентрации соли, ионной силы и температуры. Как правило, жесткость условий можно повышать путем повышения температуры и/или снижения содержания соли. Термин "жесткие условия гибриризации" означает условия, при которых гибриризация происходит только между гомологичными молекулами нуклеиновой кислоты и гомологичными генами. Термин "условия гибриризации", таким образом, относится не только к условиям, превалирующим непосредственно при соединении цепей нуклеиновых кислот, но также к условиям, превалирующим во время последующих этапов развития. Примерами жестких условий гибриризации являются условия, при которых, прежде всего, гибриризуются те молекулы нуклеиновой кислоты, которые обладают по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью. К условиям жесткой гибриризации относится, например, гибриризация в 4×SSC при 65°C и последующая многократная отмывка в 0,1×SSC при 65°C приблизительно в течение 1 ч. Используемый здесь термин "условия жесткой гибриризации" может также означать гибриризацию при 68°C в 0,25 М фосфат натрия, pH 7,2, 7% SDS, 1 mM EDTA и 1% BSA в течение 16 ч и последующую двукратную отмывку в 2×SSC и 0,1% SDS при 68°C. Предпочтительно, чтобы гибриризация осуществлялась в жестких условиях.

Термин "комплементарная" нуклеотидная последовательность применительно к нуклеиновой ки-

ные "части" также означают комбинацию нескольких органов, например, цветка и семени, либо часть органа, например, поперечный разрез стебля растения. Примерами растительных "тканей" являются каллусные ткани, запасающие ткани, меристематические ткани, ткани листьев, ткани побегов, ткани корней, ткани растительных центров или репродуктивные ткани, а также образовательные ткани, основные ткани (называемые паренхимой), проводящие ткани, механические ткани и покровные ткани (называемые эпидермис). Этот перечень, однако, не является исчерпывающим. Термин растительные "клетки" следует понимать как означающий, например, выделенные клетки с наличием клеточной стенки, либо их агрегаты или протопласты.

В контексте настоящего изобретения термин "регуляторная последовательность" означает нуклеотидную последовательность, которая влияет на специфичность и/или уровень экспрессии, например, регуляторная последовательность может придавать специфическую тканеспецифичность. Такая регуляторная последовательность может локализоваться как вверх по течению от точки инициации транскрипции минимального промотора, так и вниз по течению от нее, например, как в лидерной последовательности, которая транскрибирована, но не транслирована, или внутри интрона.

"Промотор" - это нетранслируемый сегмент ДНК обычно вверх по течению от кодирующего участка, который содержит сайт связывания РНК-полимеразы и иницирует транскрипцию ДНК. Промотор также содержит другие элементы, которые функционируют в качестве регуляторов экспрессии генов (например, *cis*-регуляторные элементы). "Ядерный или минимальный промотор" - это промотор, который содержит по меньшей мере основные элементы, необходимые для инициации транскрипции (например, ТАТА-бокс или инициатор).

"Трансгенное растение" означает растение, в геном которого интегрирован по меньшей мере один полинуклеотид, предпочтительно гетерологичный полинуклеотид. Предпочтительно интеграция полинуклеотида является стабильной, что означает, что полинуклеотид остается стабильным в растении, экспрессируется и может также стабильно наследоваться потомками. Стабильное введение полинуклеотида в геном растения также включает его интеграцию в геноме растения предшествующего поколения, причем полинуклеотид может далее стабильно передаваться последующим поколениям. Термин "гетерологичный" означает, что введенный полинуклеотид происходит, например, от клетки или организма иного генетического фона того же вида или другого вида, либо является гомологичным по отношению к прокариотической или эукариотической клетке-хозяину, и в таком случае локализуется в иной генетической среде и поэтому отличается от потенциально естественно встречающегося соответствующего полинуклеотида. Гетерологичный полинуклеотид может присутствовать в добавление к соответствующему эндогенному гену.

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

На фиг. 1 показаны (А), (С) цветки фертильных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*); и (В), (D) цветки мужских стерильных растений сахарной свеклы, фенотипы которых происходят от Донора С311 [2043_K5]. (А), (В) Закрытые цветки, чашелистики и лепестки которых удалены вручную. Четко видны жизнеспособные пыльники фертильного генотипа (А), обозначенные светлым (желтым) цветом. Пыльники стерильных генотипов четко обозначены темным (коричневым) цветом. Во время стадии цветения пыльники фертильных генотипов раскрываются и выделяется пыльца (С), а пыльники стерильных генотипов не продолжают развиваться и не содержат пыльцы.

На фиг. 2 показана модель гена, аннотированного в RefBeet 1.2, тип BvCYPgst (g6845.tl), в референсном генотипе KWS2320. Белок длиной 517 аминокислот кодируется экзонами, общая длина которых составляет 1554 bp. Генотипы, выраженные в мужском стерильном фенотипе, содержат делецию протяженностью 533 bp, часть, включающую 5'-UTR и первый экзон гена. В таком случае правильная транскрипция мРНК и трансляция функционального белка является невозможной.

На фиг. 3 показано выравнивание фрагмента геномной ДНК протяженностью 4721 bp, кодирующей модель гена сахарной свеклы BvCYPgstf (g6845.tl) из стерильных и фертильных генотипов. Последовательность стерильных генотипов содержит делецию протяженностью 533 bp.

На фиг. 4 показан анализ последовательности фрагмента геномной ДНК протяженностью 4721 bp, кодирующей модель гена сахарной свеклы BvCYPgst (g6845.tl) из стерильных и фертильных генотипов. (А) Последовательность геномной ДНК гена CYPgst *Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*, включающая участок предполагаемого промотора, а также 5'-UTR и 3'-UTR. Участок предполагаемого промотора отмечен "жирным", 5'-UTR и 3'-UTR подчеркнуты, экзон 1 отмечен "жирным" и подчеркнут, экзон 2 обозначен курсивом и подчеркнут, и интрон обозначен курсивом. Представленная последовательность соответствует последовательности SEQ ID NO: 1. Функциональные участки гена располагаются следующим образом: предполагаемый промотор - 1...518; 5'-UTR - 1519...1761; транскрибированный участок - 1519...4275; экзон - 1762...2679; интрон - 2680...3506; экзон - 3507...4142; 3'-UTR - 4143...4275. (В) Последовательность сДНК гена CYPgst *Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*, включающая 5'-UTR и 3'-UTR. 5'-UTR и 3'-UTR подчеркнуты, экзон 1 отмечен "жирным" и подчеркнут, и экзон 2 обозначен курсивом и подчеркнут. Представленная последовательность соответствует последовательности SEQ ID NO: 2. Функциональные участки сДНК располагаются следующим образом: 5'-UTR - 1...243; экзон - 244...1161; экзон - 1162...1787;

3'-UTR - 1798...1930. (C) Аминокислотная последовательность гена CYPgst Beta vulgaris, подвид vulgaris. Представленная последовательность соответствует последовательности SEQ ID NO: 3. (D) Последовательность геномной ДНК мутировавшего гена CYPgst Beta vulgaris, подвид vulgaris, включающая участок предполагаемого промотора и 3'-UTR. Участок предполагаемого промотора отмечен "жирным", 3'-UTR подчеркнут, процессированный экзон 1 отмечен "жирным" и подчеркнут, экзон 2 обозначен курсивом и подчеркнут, и интрон обозначен курсивом. Представленная последовательность соответствует последовательности SEQ ID NO: 8. Функциональные участки мутировавшего гена CYPgst располагаются следующим образом: предполагаемый промотор - 1...1353; 5'-UTR - 1519...1761; транскрибированный участок - 1354...3542; процессированный экзон - 1354...1938; интрон - 1939...2755; экзон - 2756...3394; 3'-UTR=3395...3542.

На фиг. 5 показан анализ экспрессии гена BvCYPgst (GST, g6845.tl) при помощи ПЦР в реальном времени. РНК получена из различных тканей фертильных растений. Экспрессия гена GST установлена путем сравнения с экспрессией гена g4645.tl; n.d. означает, что экспрессия не была детектирована. В представленном эксперименте GST более сильно экспрессировался в закрытых цветках. При сравнении экспрессия гена GST не была детектирована в закрытых цветках стерильных генотипов.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает получение растения в результате мутации в сегменте ДНК ядерного генома, содержащего ген цитохром P450 оксидазы (CYPgst), которое проявляет ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип. Оно отличается тем, что мутация вызывается экспрессией рецессивного признака. Получаемое таким образом растение можно использовать для упрощения трудоемких селекционных программ. Для идентификации гена, отвечающего за данную экспрессию признака, используется сахарная свекла (Beta vulgaris, подвид vulgaris), как показано в примерах 1 и 2 и на фиг. 1-5. Упомянутый ген классифицируется как член семейства цитохром P450 оксидаз (CYP) по его структурным признакам, выявленным на основе анализа последовательности, и имеет суффикс "gst", характеризующий фенотип, наблюдаемый в его мутантах с ядерной мужской стерильностью. Поскольку ген идентифицируется в сахарной свекле, то также используется префикс "Bv" в тех случаях, когда в примерах дается ссылка на конкретный ген.

В общем настоящее изобретение касается растения, в частности культивируемого или культурного растения, проявляющего рецессивный ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип, которое отличается тем, что фенотип обуславливается мутацией гена эндогенной цитохром P450 оксидазы (CYPgst) или отсутствием, пониженным содержанием или пониженной активностью функционального белка CYPgst, кодируемого геном дикого типа CYPgst, по сравнению с соответствующим (мужским фертильным) растением дикого типа, при этом не мутировавший ген CYPgst представляет собой ген BvCYPgst Beta vulgaris, который предпочтительно содержит одну из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 или 2 или кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, либо его гомолог, аналог или ортолог. Как показано выше и объяснено на примерах, у растений можно идентифицировать другие белки CYPgst или кодирующие их гены, т.е. гомологи, аналоги и ортологи, посредством традиционных подходов биоинформатики (поиски по базам данных и компьютерные программы для скрининга гомологичных последовательностей), при этом можно предположить, что инициируется мутация того же фенотипа, что и у растений сахарной свеклы. Растение по данному изобретению также отличается тем, что не мутировавший ген CYPgst представляет собой ген StCYPgst Solarium tuberosum, который предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12 или 13 или кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или его гомолог, аналог или ортолог, и не мутировавший ген CYPgst представляет собой ген ZmCYPgst Zea mays, который предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9 или 10 или кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или его гомолог, аналог или ортолог.

В контексте изобретения термин "гомолог(и)" означает, что релевантные гены (из двух различных видов растений) по существу выполняют ту же самую функцию и имеют общего предка, и что их нуклеиновые кислоты и кодирующие аминокислотные последовательности по существу идентичны. Имеется, однако, много генов, гомологичных друг другу, однако выравнивание последовательностей белков не приводит к получению полезного спаривания. Напротив, термин "аналогичные" гены или белки указывает на то, что они выполняют идентичные или сходные функции, но имеют различную структуру, т.е. не имеют общего предка. В таком случае их нуклеиновые кислоты или кодирующие аминокислотные последовательности не совсем идентичны друг другу либо в лучшем случае идентичны только в определенных функциональных доменах.

В контексте секвенирования генома для аннотации термин "гомолог" определяется более конкретно. Термины "ортолог" и "паралог" также сюда относятся. Ортологи - это гены, которые возникают в результате видообразования. Паралоги - это гены, которые возникают в результате дупликации.

Согласно данному изобретению ген, как правило, представляет собой гомолог, аналог или ортолог, если он способен комплементировать мужской стерильный фенотип, который встречается в референсном гене CYPgst у растений сахарной свеклы (BvCYPgst) и/или обеспечивает инициацию направленной мутации в релевантном гене, либо вызывает изменения биологической активности генетических продуктов

фенотипа у растения с мужской стерильностью, кодируемом гомологом или аналогом, от которого ген был получен. Соответственно релевантный гомолог или аналог гена CYPgst по данному изобретению, показанный на этом примере, предпочтительно отличается тем, что он способен комплементировать мужской стерильный фенотип, наблюдаемый у мутантов CYPgst сахарной свеклы, т.е. он способен восстанавливать фертильность фенотипа. Дополнительно или как вариант, гомолог или аналог CYPgst предпочтительно отличается тем, что растение с мужским стерильным фенотипом получают путем ингибирования их экспрессии или биологической активности генетического продукта, кодируемого гомологом или аналогом. Мужской стерильный фенотип предпочтительно обладает признаками, характерными, например, для мутантов CYPgst у растений сахарной свеклы, в частности признаками, описанными в примерах; см. варианты осуществления изобретения выше.

Соответствующие методы и технологии комплементации в генетике известны специалисту в данной области; см., например, Napoli et al., *Plant Physiology*, 120 (1999), 615-622, где описана мутация в инбредных штаммах петунии, которые также имеют мужской стерильный фенотип, который можно элиминировать посредством трансгенной комплементации с помощью функциональной халкон-синтазы A cДНК, что позволяет заключить, что ген A халкон-синтазы по существу ответственен за мужской стерильный фенотип или что фенотип с мужской стерильностью вызывается мутацией этого гена.

У Jeong et al., *J. Exp. Bot.*, 65 (2014), 6693-6709 мужская стерильность у так называемых томатов-мутантов ms10³⁵ комплементируется и элиминируется посредством комплементации и трансгенной экспрессии различных генов-кандидатов. Способы получения мужской стерильности у трансгенных растений путем ингибирования целевого гена, в данном случае CYPgst, также известны специалисту в данной области из предшествующего уровня техники, см., например, международную заявку WO 1996/017945 и следующие варианты осуществления изобретения.

Таким образом, согласно варианту осуществления настоящего изобретения растение, проявляющее рецессивный ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип, отличается тем, что данный фенотип обусловлен мутацией гена эндогенной цитохром P450 оксидазы (CYPgst). Растение согласно изобретению также отличается отсутствием, пониженным содержанием или пониженной активностью функционального белка CYPgst, кодируемого геном дикого типа CYPgst, по сравнению с соответствующим мужским фертильным растением дикого типа. Геномная последовательность мутировавшего гена, которая больше не способна транслироваться, представлена в SEQ ID NO: 8, но является только примером, и настоящее изобретение не ограничивается этим. В частности, изобретение касается растения, относящегося к культивируемым и культурным растениям.

Инактивация гена CYP703 *Arabidopsis thaliana* (CYP703A2), чтобы уменьшить количество образуемой пыльцы и, таким образом, вызвать частичную мужскую стерильность известна из предшествующего уровня техники (Morant et al., *The Plant Cell*, 19 (2007), 1473-1487). Это можно объяснить тем, что спорополленин, являющийся основным компонентом внешних стенок пыльцы, отсутствует или структурно изменен. Хотя и представляется возможным, что ген CYPgst выполняет иную функцию, так как мутация вызывает рецессивную ядерно-кодируемую мужскую стерильность, и пыльца не образуется, вероятность того, что ген CYPgst и ген CYP703 *Arabidopsis thaliana* принадлежат к тому же семейству генов и, таким образом, выполняют ту же или по меньшей мере сходную функцию в синтезе спорополленина, нельзя исключать. Безотносительно какой-либо теории, можно предположить, что способность компенсировать потерю спорополленина утрачена у культивируемых растений, которые годами направленной селекции и скрещивания оптимизировались относительно урожайности, устойчивости к вредителям, устойчивости к абиотическим стрессовым факторам, а также содержания растительных веществ, и, таким образом, отсутствие спорополленина супрессирует образование пыльцы, что делает растение мужским стерильным.

Поскольку Morant et al. (2007) показали, что ген CYP703A2 или соответствующие нокаут-линии *Arabidopsis* проявляют только частичную мужскую стерильность, и что такой фенотип не пригоден для гибридизации, то согласно варианту осуществления изобретения ген CYP703 A2 *Arabidopsis thaliana* и мутанты, описанные Morant et al., и соавт., особенно те, чьи последовательности представлены на фиг. 1, не являются предметом настоящего изобретения. Соответственно согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения культивируемые и/или культурные растения вида *Arabidopsis thaliana* предпочтительно исключены из объема настоящего изобретения.

Растения обладают двумя или более копиями генетической информации в каждой клетке в форме эукариот. Каждый ген обычно представлен двумя аллелями, которые могут быть идентичными в гомозиготном состоянии и различными в гетерозиготном состоянии.

Фенотип растения по данному изобретению обуславливается мутацией в ядерном геноме, которая вызывается экспрессией рецессивного признака. Таким образом, согласно варианту осуществления изобретения растение является мужским фертильным, если мутация проявляется в гетерозиготном состоянии, и мужским стерильным, если мутация проявляется в гомозиготном состоянии.

Образование функциональной пыльцы супрессируется, предпочтительно полностью супрессируется у стерильного растения. В контексте настоящего изобретения термин "супрессированный" означает, что у растения, являющегося гомозиготным по мутации гена CYPgst и мужским стерильным, 95%, пред-

почтительно 96%, более предпочтительно 97% и наиболее предпочтительно 98 или 99% пыльцы не образуется, термин "полностью супрессированный" означает, что образование пыльцы супрессируется на более 99%, предпочтительно 100%. В данном контексте "супрессированный" предпочтительно означает, что в опытах по скрещиванию такого растения, служащего в качестве мужского родителя, с соответствующим растением дикого типа по существу не образуются семена и/или растения-потомки.

Это четко видно на фиг. 1 в отношении *Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*. У закрытых цветков, у которых чашелистики и лепестки удалены вручную, наблюдаются жизнеспособные пыльники фертильного генотипа (А), имеющие светлую (желтую) окраску. Наоборот, пыльники стерильных генотипов имеют темную (коричневую) окраску (В). Во время цветения пыльники фертильных генотипов раскрываются и выделяется пыльца (С), а пыльники стерильных генотипов не созревают и пыльца не выделяется (D).

У *Arabidopsis thaliana* белок CYP703 катализирует преобразование среднецепочечных насыщенных жирных кислот в простые гидроксигликолированные жирные кислоты предпочтительно в процессе гидроксигликолирования лауриновой кислоты в позиции С-7. Безотносительно какой-либо теории, представляется возможным, что белок CYPgst не выполняет ту же самую функцию, что и белок CYP703 *Arabidopsis thaliana*, но сходную функцию, потому что инактивация обоих генов влияет на образование пыльцы. Таким образом, можно констатировать, что CYPgst выполняет функцию синтеза спорополленина - основного компонента внешних стенок жизнеспособной пыльцы.

Согласно варианту осуществления изобретения белок CYPgst участвует в синтезе спорополленина и катализирует преобразование среднецепочечных насыщенных жирных кислот с образованием простых гидроксигликолированных жирных кислот предпочтительно в процессе гидроксигликолирования лауриновой кислоты в позиции С7.

Транскрипционный анализ (пример 2) фертильных генотипов *Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*, показывает, что ген CYPgst экспрессируется в закрытых цветках и плодах, но не экспрессируется в корнях и листьях (фиг. 5). Таким образом, согласно варианту осуществления изобретения растение по изобретению представляет собой растение, описанное выше, отличающееся тем, что ген CYPgst экспрессируется по меньшей мере в закрытых цветках и плодах, предпочтительно специфически в закрытых цветках и плодах.

Согласно варианту осуществления изобретения мутация предотвращает транскрипцию и/или трансляцию функционального белка у растения по данному изобретению, при этом мутация предпочтительно представляет собой делецию, присоединение, инсерцию или замещение в кодирующей нуклеотидной последовательности гена CYPgst, последовательности сигнала для сплайсинга или регуляторной последовательности, предпочтительно в последовательности промотора гена CYPgst.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения делеция представляет собой удаление по меньшей мере 500-600 bp из кодирующего участка или промоторного участка гена CYPgst. Делеция может также иметь длину по меньшей мере в 20, 30 или 50 последовательных пар оснований, по меньшей мере в 100, 150, 200 или 250 последовательных пар оснований и предпочтительно по меньшей мере в 300, 400 или 500 последовательных пар оснований. Присоединение предпочтительно представляет собой добавление нуклеотида или нескольких нуклеотидов в геномную последовательность, предпочтительно в кодирующую последовательность гена, приводящее к сдвигу рамки считывания. Замещение предпочтительно представляет собой точечную мутацию в геномной последовательности, предпочтительно в кодирующей последовательности, в результате которой образуются стоп-кодона или происходят ошибки сплайсинга.

Сравнительное секвенирование фрагментов геномной ДНК, содержащих ген CYPgst и предполагаемый участок промотора из мужских стерильных и мужских фертильных растений *Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*, показало, что делеция 533 bp ответственна за мужской стерильный фенотип (см. пример 2 и фиг. 3) и что участок делеции находится между нуклеотидными позициями 1560 и 2095 SEQ ID NO: 1.

Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления изобретения делеция представляет собой удаление 533 bp и содержит части 5'-UTR и первый экзон гена CYPgst *Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*; см. фиг. 3. Функциональный ген BvCYPgst содержит два экзона общей длиной 1554 bp. Модель гена, аннотированная в RefBeet 1.2, показана на фиг. 2, и последовательность геномной ДНК CYPgst с делецией, приводящей к образованию усеченного экзона 1, представлена в SEQ ID NO: 8. Возможные точечные мутации, в результате которых может происходить преждевременное прекращение транскрипции гена CYPgst *Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*, либо которые могут вызывать нарушение сплайсинга, перечислены в таблице и предпочтительно находятся между нуклеотидными позициями 1560 и 2095 SEQ ID NO: 1.

Как показано на примере 1 настоящего изобретения, тонкое картирование позволяет идентифицировать тесно сцепленные фланкирующие маркеры гена CYPgst и, таким образом, определить позицию гена CYPgst в геноме *Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*. В свою очередь, это создает основу для разработки маркеров мужского родителя, с помощью которых можно детектировать делецию гена CYPgst.

Согласно варианту осуществления настоящего изобретения растение отличается тем, что делецию у растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*) можно детектировать посредством определения отсутствия одного или обоих маркерных локусов *sle5983d14* (продукт амплификации праймера, имеющего последовательности SEQ ID NO: 4 и 5) и *sle5983d17* (продукт амплификации праймера, имеющего

последовательности SEQ ID NO: 6 и 7) и присутствия убиквиторного маркера. Убиквиторный маркер подтверждает удовлетворительную экстракцию ДНК.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения ген *Beta vulgaris*, подвид *vulgaris* (сахарная свекла), локализуется в сегменте хромосомы 1 между маркерными локусами *sxn215s01* и *sle3305s02*. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанные маркерные локусы находятся на расстоянии 33,42 или 35, 15 сМ в хромосоме 1 (основана на генетической карте ZR INT 1202) и основываются на физической карте генома (Physmapv2). Этот участок имеет физический размер 215,4 kbp и располагается между позициями 3185718 bp и 3401120 bp. Были разработаны KASP-маркеры (KASP™ - технология SNP генотипирования от LGC Limited), при помощи которых можно идентифицировать SNP или соответствующую референсную последовательность, подлежащую детекции. Последовательность маркера *sxn215s01*, представленная в SEQ ID NO: 24, и последовательность маркера *sle3305s02*, представленная в SEQ ID NO: 26, указывают на присутствие локуса *gst*; последовательность маркера *sxn215ls01*, представленная в SEQ ID NO: 25, и последовательность маркера *sle3305s02*, представленная в SEQ ID NO: 27, указывают на присутствие референсной последовательности, причем последовательности каждого из маркеров отличаются друг от друга в нуклеотидной позиции 21, и в генотипе, несущем локус *gst*, в этой позиции присутствует "G", а в референсном генотипе KWS2320 в этой позиции присутствует "A".

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения длина сегмента составляет приблизительно от 50 до 5000 kbp, предпочтительно от 100 до 1000 kbp, более предпочтительно от 100 до 500 kbp и наиболее предпочтительно от 200 до 250 kbp, при этом сегмент содержит другие гены, кодирующие белки, предпочтительно 21 ген.

Согласно варианту осуществления настоящего изобретения не мутировавший ген представляет собой функциональный ген *BvCYPgst Beta vulgaris*, предпочтительно *Beta vulgaris*, подвид *vulgaris*, либо функциональный гомологичный, аналогичный или ортологичный ген другого культурного или культивируемого растения.

Специалист в данной области техники может получать информацию о других белках CYPgst из соответствующих публикаций, а также из баз данных, используя подходящие параметры поиска и компьютерные программы для скрининга гомологичных последовательностей или сравнения последовательностей. Кроме того, специалист в данной области техники может определить другие последовательности ДНК, кодирующие белок CYPgst, при помощи традиционных технологий молекулярной биологии и применять их в рамках настоящего изобретения. Таким образом из последовательности гена CYPgst могут быть получены, например, подходящие зонды для гибридизации и использованы для скрининга баз данных геномных ДНК и/или сДНК для поиска желаемого организма. Специалист в данной области техники может, например, получить сведения о стандартных методах гибридизации, клонирования и секвенирования из публикации Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001. Специалист в данной области техники может также синтезировать и использовать олигонуклеотиды (праймеры) для амплификации последовательностей CYPgst на основе известных последовательностей.

В частности, согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения гомологичный, аналогичный или ортологичный ген представляет собой ген *Zea mays*, который предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9 или 10 или кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, ген *Solarium tuberosum*, который предпочтительно содержит одну из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 12 или 13 или кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, ген *Triticum aestivum*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, ген *Helianthus annuus*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, ген *Hordeum vulgare*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, ген *Brassica napus*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, ген *Brassica oleracea*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, ген *Brassica rapa*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, ген *Glycine max*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, ген *Gossypium*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, а также ген *Sorghum bicolor*, который предпочтительно кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23. Указанные растения можно классифицировать как культурные растения и предпочтительно как культивируемые растения.

Согласно варианту осуществления растение по данному изобретению является растением, описанным выше, которое отличается тем, что не мутировавший ген (ген дикого типа) имеет одну из нуклеотидных последовательностей, выбираемых из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1, 2, 9, 10, 12 и 13.

Согласно варианту осуществления изобретения не мутировавший ген (ген дикого типа) имеет нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, представлен-

ную в SEQ ID NO: 3, 11 или 14.

Нуклеотидную последовательность можно вводить в ген, используя традиционные методы, известные из предшествующего уровня техники, например, посредством сайт-направленного мутагенеза, ПЦР-индуцированного мутагенеза, транспозонного мутагенеза, геномного редактирования и т.п., замещений, делеций, инсерций, присоединений и/или любой иной модификации, как в отдельности, так и в любой их комбинации, которые модифицируют нуклеотидную последовательность с сохранением той же функции стартовой последовательности.

Изобретение также охватывает растение, описанное выше, отличающееся тем, что нуклеотидная последовательность может содержать функциональный фрагмент нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 9, 10, 12 и 13. Термин "фрагмент" включает гены, нуклеотидная последовательность которых в значительной степени сходная с вышеупомянутой нуклеотидной последовательностью. Термин "в значительной степени сходный" означает, что последовательность первого нуклеотида или первой аминокислоты содержит достаточное или минимальное количество нуклеотидов или аминокислотных остатков, идентичных или эквивалентных последовательности второго нуклеотида или второй аминокислоты. Что касается аминокислотных последовательностей, то после модификации с помощью одного из вышеуказанных методов они также имеют общую доменную структуру и/или общую функциональную активность. В значительной степени сходными являются нуклеотидные последовательности или аминокислотные последовательности, которые обладают по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или по меньшей мере около 100% идентичностью. Функциональные фрагменты предпочтительно являются в значительной степени сходными, если они обладают теми же общими свойствами, что и вышеупомянутые нуклеотидные или аминокислотные последовательности по данному изобретению.

Согласно варианту осуществления изобретения не мутировавший ген (ген дикого типа), содержащийся в растении, имеет нуклеотидную последовательность, способную гибридизоваться в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, которая комплементарна одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 9, 10, 12 и 13 либо которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 11 или 14. Согласно другому варианту осуществления изобретения не мутировавший ген (ген дикого типа) содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую различия по сравнению с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, 11 или 14, в форме аминокислотных делеций, замещений, присоединений и/или инсерций в аминокислотной последовательности, предпочтительно не превышающие 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1% относительно всей длины аминокислотной последовательности.

Согласно еще одному или дополнительному варианту осуществления изобретения нуклеотидная последовательность не мутировавшего гена (гена дикого типа) кодирует белок, обладающий той же ферментативной активностью, что и белок, кодируемый ДНК по предыдущему варианту осуществления.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения не мутировавший ген (ген дикого типа), содержащийся в растении, имеет ДНК, содержащую по меньшей мере 200 или 400, предпочтительно по меньшей мере 600 или 800, наиболее предпочтительно по меньшей мере 1000 последовательных нуклеотидов из промотора нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 с нуклеотидными позициями от 1 до 1518, предпочтительно от 518 до 1518, наиболее предпочтительно от 1318 до 1518, либо последовательности, являющейся гибридной в данном участке, причем нуклеотидная последовательность способна контролировать экспрессию гена или гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты, оперативно связанной с ДНК, особенно в закрытых цветках и/или плодах.

Согласно варианту осуществления изобретения растение может быть инбредным или гибридным растением. Инбредное растение можно использовать в качестве родительского растения для получения гибридов. Преимуществом использования рецессивного ядерно-кодируемого мужского стерильного гетерозиготного инбредного растения в отношении признака является то, что оно расщепляется на фертильные и стерильные индивиды на каждом репродуктивном этапе. Индивид с мужской стерильностью можно использовать для получения гибридов, при этом исключается ручное удаление пыльников и не требуется иметь линию-закрепитель стерильности.

Согласно варианту осуществления изобретения растение по данному изобретению является растением рода *Zea*, *Solarium*, *Triticum*, *Triticale*, *Helianthus*, *Secale*, *Hordeum*, *Brassica*, *Brachypodium*, *Glycine*, *Gossypium*, *Sorghum*, *Saccharum*, *Setaria*, *Aegilops*, *Oryza*, *Daucus*, *Eucalyptus*, *Erythranthe*, *Genlisea*, *Musa*, *Avena*, *Nicotiana*, *Coffea*, *Vitis*, *Cucumis*, *Morus*, *Crucihimalaya*, *Cardamine*, *Lepidium*, *Capsella*, *Olimarabidopsis*, *Arabis*, *Raphanus*, *Eruca*, *Citrus*, *Jatropha*. *Populus* или *Beta*, предпочтительно растение вида *Zea mays*, *Solarium tuberosum*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum spelta*, *Helianthus annuus*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Glycine max*, *Gossypium sp.*, *Sorghum bicolor*, *Triticale*, *Saccharum officinarum*, *Setaria italica*, *Oryza sativa*, *Oryza minuta*, *Oryza australiensis*, *Oryza alta*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum marinum*, *Ae-*

тивный фрагмент, а также антитело, которое специфически связывается с описываемым здесь белком или его фрагментом. Получение рекомбинантных белков и фрагментов известно специалисту в данной области техники; см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; или Wingfield, P.T. 2008, *Production of Recombinant Proteins*, *Current Protocols in Protein Science*, 52:5.0.a5.0.1-5.0.5. Поликлональные или моноклональные антитела к белку по данному изобретению могут быть получены специалистом в данной области техники согласно методам, известным у E. Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988). Моноклональные антитела и фрагменты Fab и F(ab')₂, которые можно также использовать для детекции белка, можно получать с помощью различных традиционных методов, таких как у Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, p. 98-118, New York, Academic Press (1983). Антитела можно затем использовать для иммунологического скрининга экспрессионных библиотек cДНК с целью идентификации идентичных, гомологичных или гетерологичных генов (Sambrook et al., *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; или Ausubel et al., 1994, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons).

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения белок CYPgst относится к аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 3, Пили 14-23, либо аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 82, 84, 86 или 88%, предпочтительно на 90, 91, 92, 93, 94 или 95%, наиболее предпочтительно на 96, 97, 98, 99 или 99,5% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, предпочтительно по всей ее длине.

Изобретение также касается рекомбинантной молекулы ДНК, которая содержит не мутировавший ген CYPgst (ген дикого типа) и обладает вышеуказанными свойствами нуклеотидной последовательности, содержащейся в растении по данному изобретению. Рекомбинантная молекула ДНК предпочтительно содержит промотор и/или иной элемент управления транскрипцией или трансляцией, либо связана с ним. Используемые промоторы являются, в основном, промоторами со специфической активностью в клетках, обеспечивающими транскрипцию ДНК только в заранее определенных клетках. Кроме промоторов, имеются, но не ограничиваются ими, другие элементы управления транскрипцией, например, энхансеры, операторы, репрессоры, а также сигналы терминации транскрипции, которые функционально связаны с ДНК для обеспечения направленной клеточноспецифической транскрипции. Промоторы и другие элементы регуляции транскрипции в общем известны и доступны специалисту в данной области техники; см., например, WO 00/75359, строчки 5-17, с. 24. Данную рекомбинантную молекулу ДНК можно использовать для восстановления фертильности у растений, являющихся рецессивными ядерно-кодируемыми мужскую стерильными по фенотипу.

Поскольку, как показано выше, ген CYPgst экспрессируется в закрытых цветках и плодах и не экспрессируется в корнях или листьях, то в предпочтительном варианте осуществления изобретения рекомбинантная молекула ДНК содержит промотор, который имеет нуклеотидную последовательность, описанную выше, и оперативно связан с гетерологичной нуклеотидной последовательностью, или кодирующую нуклеотидную последовательность, как описано выше, которая содержит ген CYPgst дикого типа и оперативно связана с гетерологичным промотором. Данный промотор предпочтительно способен контролировать экспрессию нуклеотидной последовательности, особенно в закрытых цветках и/или плодах. Рекомбинантная молекула ДНК более предпочтительно содержит естественный промотор не мутировавшего гена CYPgst *Beta vulgaris*, подвид *vulgaris* (SEQ ID NO: 1).

Соответственно настоящее изобретение также касается использования описанных здесь молекулы ДНК или промотора для специфической экспрессии гетерологичных молекул нуклеиновой кислоты в цветках и/или плодах растения. Для этого требуется, чтобы гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты была оперативно связана с соответствующим промотором, и чтобы такая рекомбинантная молекула ДНК была введена в целевую клетку, предпочтительно растительную клетку. Методы гетерологичной экспрессии рекомбинантных молекул ДНК будут рассмотрены более подробно ниже.

Еще одним предметом настоящего изобретения является рекомбинантная молекула ДНК, имеющая нуклеотидную последовательность по данному изобретению, которая кодирует shРНК (малую РНК, образующую шпильки), siРНК (малую интерферирующую РНК), отрицательно полярную РНК, положительно полярную РНК или двухцепочечную РНК. Они ингибируют трансляцию mРНК гена CYPgst или разрушают mРНК гена CYPgst в клетках посредством пар оснований. Соответственно введение и/или экспрессия рекомбинантной молекулы ДНК в растении приводит к ингибированию экспрессии функционального (не мутировавшего) гена CYPgst. В предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность проявляет свойства, подробно описанные в параграфе 15.

Еще одним предметом настоящего изобретения являются векторы, содержащие рекомбинантные молекулы ДНК, последовательности нуклеиновой кислоты или молекулы нуклеиновой кислоты по данному изобретению. Вектор по данному изобретению может содержать не мутировавший ген CYPgst (ген дикого типа) с вышеупомянутыми свойствами нуклеотидной последовательности и предпочтительно один из описанных выше промоторов. Другой вектор может содержать рекомбинантную молекулу ДНК, которая содержит не мутировавший ген CYPgst дикого типа, связанный с гетерологичной молекулой нуклеиновой кислоты, или рекомбинантную молекулу ДНК, которая содержит описанную выше нуклео-

тидную последовательность, оперативно связанную с гетерологичным промотором, причем в любом случае промотор предпочтительно способен специфически контролировать экспрессию нуклеотидной последовательности в закрытых цветках и/или плодах. Помимо этого, вектор может содержать рекомбинантную молекулу ДНК, имеющую нуклеотидную последовательность, которая кодирует shРНК, siРНК, отрицательно полярную РНК, положительно полярную РНК или двухцепочечную РНК, что приводит к ингибированию экспрессии гена CYPgst после экспрессии в растительной клетке.

Более того, вектор может содержать молекулу ДНК, имеющую одну из описанных выше мутаций или описанную выше молекулу нуклеиновой кислоты, которая специфически связывается с нуклеотидной последовательностью не мутировавшего гена CYPgst (дикого типа) или с нуклеотидной последовательностью мутировавшего гена CYPgst.

Описанный вектор может представлять собой плазмиду, космиду, фаг или экспрессионный вектор, трансформационный вектор, челночный вектор или клонирующий вектор; он может быть одно- или двухцепочечным, линейным или кольцевым, и он способен трансформировать прокариотического или эукариотического хозяина посредством интеграции в его геном или экстрахромосомно. Молекула ДНК или молекула нуклеиновой кислоты по данному изобретению оперативно связана с одной или несколькими регуляторными последовательностями в экспрессионном векторе, которые обеспечивают транскрипцию и, как вариант, экспрессию в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине; см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 2001 и международную патентную заявку WO 00/75359, с. 21, строчка 20, с. 22, строчка 32. Данные регуляторные последовательности предпочтительно представляют собой промоторы или терминаторы, в частности относительно стартовой точки для инициации транскрипции, сайт связывания рибосомы, сигнал процессинга РНК, сайт терминации транскрипции и/или сигнал к полиаденилированию. Как правило, векторы также содержат индикаторные/репортерные гены или гены устойчивости для детекции переноса желаемого вектора, а также молекулы ДНК/молекулы нуклеиновой кислоты для отбора содержащих их индивидов, поскольку прямая детекция посредством экспрессии гена обычно весьма затруднена. Примерами индикаторных/репортерных генов являются ген люциферазы и ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP). Они также позволяют тестировать активность и/или регуляцию промотора гена. Примерами генов устойчивости, особенно для трансформации растений, являются ген неомицин-фосфотрансферазы, ген гигромицин-фосфотрансферазы или ген, который кодирует фосфинотрицин ацетилтрансферазу. Это не исключает другие индикаторные/репортерные гены или гены устойчивости, известные специалисту в данной области техники. В предпочтительном варианте осуществления изобретения вектор является растительным вектором.

Еще одним объектом изобретения является описанный выше вектор, отличающийся тем, что молекула ДНК в качестве трансгена способна экспрессировать функциональный ген CYPgst и предпочтительно генетически связана с другим трансгеном, который предотвращает перенос молекулы ДНК через пыльцу. Фертильность можно восстанавливать путем введения данного вектора в мутант, являющийся мужским стерильным вследствие мутации в гене CYPgst. Поскольку перенос трансгенного функционального CYPgst через пыльцу невозможен, то образуются только гемизиготные семена путем самоопыления трансгенной линии.

Вектор или трансген, соответственно, предпочтительно также содержит экспрессионную кассету, маркирующую семена, предпочтительно при помощи флуоресцентных меток. Используя данный метод, можно легко дифференцировать трансгенные и нетрансгенные семена. Эта система использования ядерно-кодируемой мужской стерильности была разработана компанией Pioneer. Система под названием SEED PRODUCTION TECHNOLOGY (SPT) (US 2006288440 A1), разработанная для кукурузы, основывается на том факте, что стерильный мутант, имеющий мутацию в известном ядерно-кодируемом гене, может быть восстановлен путем введения трансгена. Трансген содержит не мутировавший аллель гена стерильности, благодаря чему трансген выполняет функцию аллеля дикого типа. Трансген восстановления фертильности генетически связан с другим трансгеном, который предотвращает перенос трансгена через пыльцу (убийца пыльцы). В результате образуются только гемизиготные семена путем самоопыления трансгенной линии, что играет основную роль в обеспечении эффективности системы.

Трансген также содержит экспрессионную кассету, маркирующую семена с использованием красного флуоресцентного красителя. В результате можно легко дифференцировать трансгенные и нетрансгенные семена. Поскольку трансгенные семена являются фертильными, растения автоматически разделяются на фертильные и стерильные растения. Материнские формы растений, необходимые для создания гибридов, получают путем высевания нетрансгенных семян, а трансгенные семена можно использовать в качестве отцовской линии для последующей репродукции материнской линии (линии-закрепителя), а также репродуцировать путем простого самовоспроизводства (см. фиг. 5). Теоретически систему SPT можно использовать в отношении всех видов растений. Для этого требуются наличие линии с генетической мужской стерильностью и сведения о гене, который ответственен за фенотип с генетической мужской стерильностью. В результате, теоретически, систему SPT можно также использовать для разработки системы гибридизации в отношении каждого вида культивируемого растения, например, такого как сахарная свекла или картофель.

Настоящее изобретение также касается клеток-хозяев, содержащих описанные векторы, рекомбинантные молекулы ДНК и/или молекулы нуклеиновой кислоты. Клетка-хозяин по данному изобретению может быть прокариотической (например, бактериальной) или эукариотической клеткой (например, растительной клеткой или дрожжевой клеткой). Предпочтительно клетка-хозяин представляет собой агробактерию или растительную клетку. Настоящее изобретение предпочтительно относится к трансгенной растительной клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по данному изобретению в качестве трансгена или вектор по данному изобретению. Такая трансгенная растительная клетка представляет собой, например, растительную клетку, трансформированную, предпочтительно стабильно трансформированную, молекулой нуклеиновой кислоты по данному изобретению. В предпочтительном варианте трансгенной растительной клетки молекула нуклеиновой кислоты оперативно связана с одной или несколькими регуляторными последовательностями, которые обеспечивают транскрипцию и, как вариант, экспрессию в растительной клетке. Общая структура, включающая молекулу нуклеиновой кислоты и регуляторные последовательности, представляет собой, таким образом, трансген. Как пример, такие регуляторные последовательности могут содержать промотор или терминатор. Специалисту в данной области техники известны многочисленные функциональные промоторы и терминаторы, которые могут использоваться в растениях.

Изобретение также относится к идентификации гена *CYPgt*, ответственного за экспрессию признака рецессивной ядерно-кодируемой мужской стерильности, для получения трансгенных растений с такой экспрессией признака и, таким образом, восстановления фертильности.

Согласно варианту осуществления изобретения обеспечивается набор, содержащий описанные выше рекомбинантные молекулы ДНК или молекулы нуклеиновой кислоты и векторы соответственно, которые необходимы для получения растений с рецессивной ядерно-кодируемой мужской стерильностью, а также для восстановления фертильности растений, имеющих этот фенотип. Данный набор также содержит рекомбинантную молекулу ДНК, содержащую промотор с заранее определенной нуклеотидной последовательностью или гетерологичный промотор, при этом первый связан с гетерологичной молекулой нуклеиновой кислоты, а второй связан с заранее определенной нуклеотидной последовательностью, кодирующей не мутировавший (дикого типа) ген *CYPgt*. Кроме того, набор может содержать вектор, причем молекула ДНК в качестве трансгена способна экспрессировать функциональный ген *CYPgt* и предпочтительно связана с другим трансгеном, который предотвращает перенос молекулы ДНК через пыльцу, а также экспрессионную кассету, маркирующую семена. Набор может содержать заранее определенную молекулу нуклеиновой кислоты для идентификации мутации в гене *CYPgt*, которая гибридизуется с заранее определенной нуклеотидной последовательностью, содержащей не мутировавший (дикого типа) ген *CYPgt*, или с соответствующим геном с заранее определенной мутацией, либо описанный выше олигонуклеотид. Набор может также содержать описанный выше ген *CYPgt* или его фрагмент, а также описанные выше антитела. Предпочтительно, чтобы набор также содержал реагенты предназначенные для процедур, основанных на детекции нуклеиновых кислот, или для иммунологической детекции.

Трансгенное растение является, например, растением, которое содержит растительные клетки, трансформированные молекулой ДНК/молекулой нуклеиновой кислоты по данному изобретению или вектором по данному изобретению. В предпочтительном варианте трансгенного растения молекула ДНК/молекула нуклеиновой кислоты оперативно связана с одной или несколькими регуляторными последовательностями, обеспечивающими транскрипцию и, как вариант, экспрессию в растении. Общая структура, включающая молекулу нуклеиновой кислоты по данному изобретению и регуляторные последовательности представляет собой, таким образом, трансген. Термин "трансген" также означает рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид.

Олигонуклеотиды, нуклеиновые кислоты, молекулы ДНК и векторы, которые были описаны выше, можно также использовать для получения трансгенного растения. Таким образом, настоящее изобретение также касается использования данных олигонуклеотидов, нуклеиновых кислот, молекул ДНК и векторов для получения трансгенного растения, проявляющего гомозиготный рецессивный ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип, отличающегося тем, что во время получения растения с восстановленной фертильностью по данному изобретению или трансгенной клетки-хозяина, предпочтительно растительной клетки, экспрессия гена *CYPgt* ингибируется. Кроме того, описанные выше олигонуклеотиды, нуклеиновые кислоты, молекулы ДНК и векторы можно также использовать в соответствующих способах получения таких трансгенных растений или растительных клеток. Трансгенное растение предпочтительно представляет собой культурное растение или более предпочтительно культивируемое растение.

Из предшествующего уровня техники известны различные способы получения, идентификации или отбора трансгенных растений, при которых супрессируется транскрипция/трансляция белка или вводится признак восстановления. Специалисту в данной области техники известны способы получения трансгенных культивируемых растений и их идентификации с использованием методов молекулярной биологии; относительно трансгенных растений сахарной свеклы, устойчивых к глифосату; см., например, международные патентные заявки WO 99/023232 и WO 2004/074492, или относительно общей трансформации растений - WO 2000/018939 и WO 2013/138309.

Соответственно согласно варианту осуществления изобретения обеспечен способ получения растения, проявляющего гомозиготный рецессивный ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип, отличающийся тем, что экспрессия гена CYPgst ингибируется, причем данное растение предпочтительно является культурным растением и более предпочтительно культивируемым растением. Рекомбинантная молекула ДНК, экспрессирующая полинуклеотид, вводится в растительную клетку путем трансформации, например, с использованием вектора, в результате чего экспрессия полинуклеотида приводит к ингибированию белка CYPgst.

Как пример, описанная выше мутация, приводящая к ингибированию экспрессии CYPgst, может вызываться посредством генетической рекомбинации в процессе скрещивания растений между собой, при этом одно из растений несет мутировавший аллель CYPgst.

Помимо использования традиционных селекционных программ для генерирования генетической рекомбинации, современная биотехнология предоставляет специалисту в данной области техники много других инструментов точной генетической инженерии. Как пример, T-ДНК мечение можно использовать для разрушения гена CYPgst посредством инсерционного мутагенеза. Кроме того, весь ген CYPgst или его часть можно deletировать посредством генетической мутации с использованием TALE-нуклеаз (TALEN) или нуклеаз "цинковые пальцы" (ZFN) и систем CRISPR/Cas, которые описаны в WO 2014/144155 A1 (Engineering Plant Genomes Using CRISPR/Cas Systems) и у Osakabe & Osakabe, Plant Cell Physiol., 56 (2015), 389-400, так, что предотвращается экспрессия гена CYPgst. Это может также достигаться путем использования метода, называемого TILLING (целенаправленные индуцированные локальные нарушения в геномах), при котором в гене дикого типа вызывается точечная мутация, как показано в немецкой патентной заявке DE 102013101617, и затем отбираются растения, проявляющие подходящий, т.е. обеспечивающий устойчивость, ген, например, ячмень, который, проявляет устойчивость к вирусу желтой мозаики; см., например, DE 102013101617, с. 4, 8 и 12 в параграфах [0014], [0026] и [0038]. Метод TILLING также подробно рассматривается в публикации Henikoff et al. (Henikoff et al, Plant Physiol., 135, 2004, 630-636). Точечные мутации в гене CYPgst Beta vulgaris, подвид vulgaris, способные приводить к стоп-кодонам или ошибкам сплайсинга, приводятся в таблице.

Ингибирование экспрессии также возможно с помощью подходов iРНК и косупрессии. Они заключаются во введении рекомбинантной молекулы ДНК или молекулы нуклеиновой кислоты, описанных выше, или соответствующего вектора в растение, при этом в результате экспрессия кодируемых молекул shРНК, отрицательно полярной РНК или положительно полярной РНК приводит к ингибированию экспрессии гена CYPgst. Такие методы, основанные на iРНК и косупрессии, являются стандартными методами для ингибирования экспрессии генов и известны специалисту в данной области техники. Подход положительной полярности, включающий использование молекулы мишень-специфической неполиадезинированной РНК, может приводить к ингибированию экспрессии гена CYPgst. Данный метод описывается, как пример, в международной патентной заявке WO 2001/012824.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретение касается способа восстановления фертильности растения по данному изобретению, включающего введение в растение функционального гена CYPgst. Ген CYPgst можно вводить путем использования методов генетической инженерии, с помощью рекомбинантной ДНК по данному изобретению, предпочтительно содержащей элементы контроля транскрипции, предпочтительно промотор для специфической экспрессии гена в закрытых цветках и/или плодах, либо посредством векторов по данному изобретению. Ген CYPgst можно также вводить путем скрещивания с растением, несущим ген CYPgst дикого типа или функциональный ген CYPgst, предпочтительно в гомозиготном состоянии. Как вариант, отбор по признаку присутствия гена CYPgst дикого типа или функционального гена CYPgst можно проводить в поколениях после скрещивания.

Объектом настоящего изобретения является растение, которое содержит заранее определенную растительную клетку и/или которое получают описанным выше способом. Это означает растение, имеющее рецессивный ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип, а также растение с восстановленной фертильностью, полученное либо посредством генетической рекомбинации с использованием традиционных селекционных методов, либо являющееся трансгенным растением, в котором экспрессия гена CYPgst ингибируется вследствие различных методов, упомянутых выше, в результате которых получается растение с рецессивным ядерно-кодируемым мужским стерильным фенотипом или восстанавливается фертильность растения посредством введения рекомбинантных молекул ДНК. Такое растение предпочтительно является культивируемым растением, наиболее предпочтительно культурным растением, предпочтительно имеющим запасающие органы, которые потенциально могут функционировать как репродуктивные органы, такие как корни или клубни растений сахарной свеклы или картофеля, зерно пшеницы, овса, проса и кукурузы, плоды, например, томаты и т.п. Согласно варианту осуществления изобретения низшие растения и резушка *Thaliana Arabidopsis thaliana* непосредственно не являются предметом настоящего изобретения.

Помимо растений, проявляющих рецессивный ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип в результате спонтанной мутации в гене CYPgst, растений, которым данный фенотип придается путем генетической рекомбинации с использованием традиционных селекционных методов, или растений, которым данный фенотип был придан посредством генной инженерии с использованием современной био-

технологии, а также растений, у которых фертильность восстановлена посредством соответствующих методов, изобретение также касается органов, растительных частей, тканей, клеток, а также семян или потомков таких растений. Согласно варианту осуществления изобретения семена или потомки имеют одну или несколько описанных выше мутаций, которые приводят к ингибированию экспрессии гена CYPgst, и/или семена или потомки проявляют рекомбинантную молекулу ДНК, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, описанные выше.

Согласно варианту осуществления изобретения обеспечен способ идентификации растения по данному изобретению. Данный способ идентификации можно использовать в отношении растения, имеющего рецессивный ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип в результате спонтанной мутации в гене CYPgst, а также растения, которому данный фенотип был придан путем генетической рекомбинации с использованием традиционных селекционных методов, или растения, которому данный фенотип был придан путем генной инженерии с использованием современной биотехнологии. Кроме того, при помощи данного способа можно идентифицировать растение, у которого посредством соответствующего метода была восстановлена фертильность. Для идентификации растения по данному изобретению в качестве зонда для гибридизации можно использовать ранее определенную молекулу нуклеиновой кислоты, которая имеет минимальную длину 15 нуклеотидов и специфически связывается с ранее определенной нуклеотидной последовательностью, содержащей не мутировавший (дикого типа) ген CYPgst и ген CYPgst с ранее определенной мутацией, приводящей к ингибированию экспрессии гена. Более того, для идентификации можно использовать вышеописанные олигонуклеотид, белок CYPgst или его фрагмент, а также антитела и компоненты набора, описанные выше.

Настоящее изобретение также касается использования рекомбинантных молекул ДНК или молекул нуклеиновой кислоты, векторов по данному изобретению и компонентов набора по данному изобретению для получения рецессивного ядерно-кодируемого мужского стерильного растения, растения с восстановленной фертильностью, гибридного растения в программах селекции на устойчивость или для производства семян.

Способ получения обратимой мужской стерильности у растения, в котором можно использовать ген CYPgst, описан, как пример, в международной патентной заявке WO 96017945 и состоит из этапов

(a) введения первой рекомбинантной молекулы ДНК в геном пыльцы для получения растения, которое может быть генетически трансформировано, причем первая рекомбинантная молекула ДНК содержит

(i) нуклеотидную последовательность, кодирующую генетический продукт, который ингибирует образование или функцию пыльцы, в зависимости от экспрессии в растении, в данном случае гена CYPgst по данному изобретению, или генетического продукта, например, посредством экспрессии последовательности iPHK;

(ii) оператор, контролирующий экспрессию нуклеотидной последовательности; и

(iii) промотор со специфической активностью в клетках, критически важных для образования пыльцы или ее функционирования, при этом промотор функционально связан с нуклеотидной последовательностью, кодирующей генетический продукт;

(b) как вариант селекции растения, полученного на этапе (a), в условиях, обуславливающих возникновение мужской стерильности в результате экспрессии нуклеотидной последовательности;

(c) скрещивания мужских стерильных растений, полученных на этапах (a) или (b), с пыльцой мужской фертильной линии для получения гибридного растения, являющегося мужским фертильным, при этом пыльца другой рекомбинантной молекулы ДНК содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует ДНК-связывающий белок и подавляет транскрипцию, и промотор, который контролирует экспрессию нуклеотидной последовательности, причем ДНК-связывающий белок способен связываться с оператором рекомбинантной ДНК мужского стерильного растения и подавлять транскрипцию.

Еще одна система получения растений со стерильной пыльцой, где в ядерный геном вводится чужеродная ДНК, которую можно использовать по данному изобретению, описана в европейской патентной заявке EP 0344029.

Настоящее изобретение также касается использования растений по данному изобретению для селекции или получения потомков, отличающегося тем, что для рекуррентной селекции используется ядерно-кодируемый мужски-стерильный фенотип. Кроме того, помимо растения по данному изобретению, предметом настоящего изобретения также являются семена или потомки, органы, растительные части, ткани или их клетки, используемые для производства продуктов, обычно изготавливаемых из возобновляемых сырьевых материалов, таких как пищевые продукты и корма, предпочтительно сахар или патока (меласса), причем меласса также применяется в промышленном производстве, например, для ферментации спирта или как питательное вещество для производства продуктов биотехнологии, при производстве сырьевых материалов или субстанций для химической промышленности, например, тонких химикатов, лекарственных средств или их ингредиентов, диагностических продуктов, косметики, биоэтанола или биогаза. Пример использования растений сахарной свеклы в качестве биогенетического сырьевого материала для получения биогаза описан в патентной заявке DE 102012022178 A1, см. параграф 10.

Настоящее изобретение также относится к продуктам, получаемым из растений, органов, расти-

тельных частей, тканей, клеток, семян и потомков по данному изобретению, таким как пищевые продукты, корма и сырьевые материалы, содержащиеся в растении, семенах, потомках, органах, растительных частях, тканях или клетках, а также их компонентах.

Следующие примеры осуществления изобретения приводятся только с целью его иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие его объем. Если не установлено иное, то применялись стандартные микробиологические методы; см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Fritsch et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Mayer et al., *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology*, eds. Academic Press, London, 1987; и Weir et al., *Handbook of Experimental Immunology*, vol. I-IV, Blackwell, eds., 1986.

Примеры

1. Идентификация локуса, вызывающего ядерно-кодируемую мужскую стерильность.

Для идентификации локуса (рабочее название *gst*), вызывающего ядерно-кодируемую мужскую стерильность у растений сахарной свеклы, в качестве исходного растения, проявляющего ядерно-кодируемый рецессивный мужской стерильный фенотип, использовали донор с внутренней меткой C311 [2043_K5]. Провести заранее (т.е. до цветения) основное определение присутствия и степени зиготности локуса *gst*, связанного с экспрессией признака в данном доноре, однако, оказалось невозможным в тестируемом материале. Вместо этого большое количество растений с предполагаемой стерильностью доводилось до стадии цветения в поле или блоке самоопыления (S-блок). Цветущие растения затем вручную проверялись на фертильность и стерильность, соответственно (фиг. 1). Фертильные индивидуумы удалялись, и собирались семена стерильных индивидуумов.

Для генетического и физического ограничения локуса *gst*, вызывающего ядерно-кодируемую мужскую стерильность, в отношении данного признака создавали отдельные карты популяции сахарной свеклы. Целевой участок на хромосоме 1 был уже известен из предварительной информации широко геномного картирования. Индивидуумы с мужской стерильностью *gst* донора C311[2043_K5] скрещивали с однолетней линией, и полученные в результате индивидуумы F1 размножали путем самоопыления. Потомков поколения S1 затем фенотипировали для целей картирования и помечали маркером класса KASP-DNA (технология KASP™ для генотипирования компании LGC Limited). Были разработаны два маркера класса KASP-DNA, *sxn2151s01* и *sle3305s02*, при помощи которых из референсного генотипа KWS2320 идентификацией SNP выделяли генотип, несущий *gst*.

Последовательность маркера *sxn2151s01*, представленная в SEQ ID NO: 24, и последовательность маркера *sle3305s02*, представленная в SEQ ID NO: 26, указывают на присутствие локуса *gst*; последовательность маркера *sxn2151s01*, представленная в SEQ ID NO: 25, и последовательность маркера *sle3305s02*, представленная в SEQ ID NO: 27, указывают на референсную последовательность, причем каждая из маркерных последовательностей отличается друг от друга в позиции 2, и в генотипе, несущем локус *gst*, в этом месте присутствует "G", а в референсном генотипе KWS2320 в этом месте присутствует "A". В результате такого тонкого картирования участок на хромосоме 1 сахарной свеклы, фланкируемый маркерами класса KASP-DNA *sxn2151s01* на расстоянии 33,42 cM и *sle3305s02* на расстоянии 35,15 cM (на основании генетической карты ZR INT 1202) и несущий локус *gst*, четко выделялся. Исходя из физической карты генома (PhySmapv2), данный участок имел физический размер 215.4 kbp и находился между позициями 3185718 bp и 3401120 bp. С учетом идентифицированной позиции и общедоступного представления генома RefBeet 1.2 (<http://bvseq.molgen.mpg.de/>) в этом сегменте генома был идентифицирован 21 ген, кодирующий белок.

Гомологичные гены у модельных растений (например, *Arabidopsis thaliana* и *Oryza sativa*) для всех 21 модели генов изучали с использованием биоинформатических подходов. Широкий анализ и оценку проводили на основании идентифицированных гомологичных генов у модельных растений. Ген, кодируемый в локусе *gst*, идентифицировали как член семейства цитохром P450-зависимых монооксигеназ (CYP) на основании широкого анализа последовательностей и предсказанных структур. Несмотря на значительное разнообразие последовательностей в цитохром P450-зависимых монооксигеназах, все CYP имеют общие структурные признаки, которые высоко сохранялись на участке активного центра (см., например, Fischer et al., *Bioinformatics*, 23 (2007), 2015-2017) и также обнаруживались в отношении предполагаемого гена *gst*. В связи с этим ген получил название CYP_{gst}.

Путем более специфической характеристики этого гена был идентифицирован ген CYP *Arabidopsis thaliana*, т.е. CYP703A2, имеющий более высокую идентичность последовательности с этим геном из локуса *gst*. Мутант *Arabidopsis thaliana*, в котором этот ген инактивировался посредством инсерции Т-ДНК, проявлял фенотип с частичной мужской стерильностью (Morant et al., *Plant Cell*, 19 (2007), 1473-1487). Возможно это объясняется механическими причинами, как результат функции CYP703A2 в синтезе спорополленина, являющегося основным компонентом внешних стенок жизнеспособной пыльцы. Отсутствие внешней стенки препятствует созреванию пыльцы, либо подвергает ее воздействию окружающей среды. Между фенотипом *gst* фенотипа сахарной свеклы и фенотипом мутанта *Arabidopsis thaliana* имеется, однако, существенное различие:

(i) в отличие от *Arabidopsis* нокаут гена из растений сахарной свеклы приводит к полной мужской

стерильности;

(ii) в то время как стерильная пыльца в основном образуется у мутантов *Arabidopsis*, и пыльца не образуется у *gst* растений сахарной свеклы, как следует из анализа текущего состояния.

Таким образом, нельзя исключать вероятность того, что они принадлежат к разным членам семейства СУР, и/или что функции обоих белков разные у *Arabidopsis* и растений сахарной свеклы. Известно, что *Arabidopsis* - это дикорастущее травянистое растение семейства крестоцветных, имеющее небольшой компактный геном, в то время как сахарная свекла является культивируемым растением, т.е. растением, высаживаемым, возделываемым и размножаемым человеком и используемым как культурное растение. Таким образом, исследования на основе *Arabidopsis* и их результаты не могут быть непосредственно применены к культивируемым растениям. Более того, для культурных растений характерны важные агропроцессы, которые никогда не имеют места в отношении *Arabidopsis*. Это включает, например, в отличие от *Arabidopsis*, образование корней свеклы, клубней и зерна, которые функционируют как запасные органы и как вегетативные и репродуктивные органы, а также их связь с симбиотическими микоризными грибами или патогенами.

2. Характеристика гена СУР_{gst}.

После идентификации потенциального гена, приводящего к фенотипу *gst*, проводили сравнительное секвенирование фрагмента геномной ДНК размером приблизительно 5 kbp. Были секвенированы фертильный референсный генотип KWS2320 сахарной свеклы, стерильный *gst* донор С311, три индивидуума вышеупомянутой популяции тонкого картирования, классифицированные согласно фенотипам и маркерным данным как стерильные, и три их индивидуума, классифицированные согласно фенотипам и маркерным данным как фертильные гомозиготные. Секвенированный участок генома содержит модель гена *BvCYP_{gst}* (GST, g6845.tl), показанный на фиг. 2, и приблизительно 1,5 kbp участка предполагаемого промотора. Сравнительное секвенирование показало, помимо серии одиночных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) между стерильными и фертильными индивидуумами, делецию размером 533 bp у стерильных генотипов, содержащую 5'-UTR и первый экзон модели гена (фиг. 2 и 3).

Анализ всех идентифицированных полиморфизмов показал, что некоторые из делеций повлияли на кодируемый белок, а все остальные мутации либо находились в нетранслируемых областях, либо генерировали синонимичные кодоны. Наоборот, эти мутации препятствовали конкретной транскрипции мРНК, и трансляция функционального белка была поэтому невозможной. Последующие анализы транскрипции подтвердили эти данные (фиг. 5). *BvCYP_{gst}* (GST, g6845.tl) весьма специфически экспрессировался в закрытых цветках и плодах у фертильных генотипов. Его экспрессия не детектировалась в корнях и листьях. В противоположность этому ген GST не детектировался в закрытых цветках у стерильных генотипов. Это позволяет сделать вывод о том, что ген стерильных генотипов полностью инактивируется.

Были разработаны ДНК-маркеры, позволяющие проводить различие между стерильными и фертильными генотипами. Для этого разрабатывали KASP-маркеры, имеющие фертильный аллель (инсерция) в качестве доминантного признака (*sle5983d14*, *sle5983d17*).

Маркер	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>sle5983d14</i>	SEQ ID NO: 4: ACCAAAATTTTATACCAATGGCTCA AG	SEQ ID NO: 5: GGCCGGGAGGGAGTTTGTATGTT
<i>sle5983d17</i>	SEQ ID NO: 6: AGAAATCATACGTGAGATCTTAGTT CG	SEQ ID NO: 7: GGTATGTGGACGAGACGCAAATAC AT

В результате, что касается данной гомозиготной делеции, можно сделать косвенный вывод, что оба маркера (*sle5983d14*, *sle5983d17*) проявляют нулевой аллель, а третий убиквитарный маркер подтверждает экстракцию достаточного количества ДНК. Потенциальные точечные мутации в гене *BvCYP_{gst}*, приводящие к преждевременному прекращению транскрипции гена *CYP_{gst}*, или вызывающие разрушение сплайсинга, которые можно тестировать, используя традиционные методы для детекции точечных мутаций ДНК (SNP-анализ), приводятся в таблице.

Потенциальные точечные мутации в гене CYPgst Beta vulgaris, подвид vulgaris, приводящие к преждевременному прекращению транскрипции гена CYPgst или вызывающие разрушение сплайсинга

Позиция	Нуклеотид	Мутация	
SEQ ID NO: 1			Действие мутации

1771	G	T	стоп-кодон
1778	T	A или G	стоп-кодон
1788	T	A или G	стоп-кодон
1790	T	A или G	стоп-кодон
1797	T	A	стоп-кодон
1813	A	T	стоп-кодон
1820	T	A или G	стоп-кодон
1824	C	A или G	стоп-кодон
1825	C	T	стоп-кодон
1829	G	A	стоп-кодон
1830	G	A	стоп-кодон
1834	A	T	стоп-кодон
1842	C	A или G	стоп-кодон
1844	T	A или G	стоп-кодон
1848	C	A или G	стоп-кодон
1857	C	A или G	стоп-кодон
1858	A	T	стоп-кодон
1883	G	A	стоп-кодон
1884	G	A	стоп-кодон
1889	T	A или G	стоп-кодон
1894	G	T	стоп-кодон

1906	C	T	стоп-кодон
1940	C	A или G	стоп-кодон
1947	T	A	стоп-кодон
1948	G	T	стоп-кодон
1951	A	T	стоп-кодон
1956	T	A или G	стоп-кодон
1964	T	A или G	стоп-кодон
1971	C	A или G	стоп-кодон
2014	G	T	стоп-кодон
2026	G	T	стоп-кодон
2033	T	A или G	стоп-кодон
2038	C	T	стоп-кодон
2041	C	T	стоп-кодон
2075	T	A или G	стоп-кодон
2090	T	A	стоп-кодон
2097	C	A или G	стоп-кодон
2117	T	A	стоп-кодон
2128	G	T	стоп-кодон
2138	G	A	стоп-кодон
2139	G	A	стоп-кодон
2140	A	T	стоп-кодон
2143	A	T	стоп-кодон
2149	A	T	стоп-кодон
2160	C	A	стоп-кодон
2164	G	T	стоп-кодон
2171	T	A	стоп-кодон
2182	A	T	стоп-кодон
2185	C	T	стоп-кодон
2191	G	T	стоп-кодон

045492

2218	G	T	СТОП-КОДОН
2224	C	T	СТОП-КОДОН
2231	T	A	СТОП-КОДОН
2236	C	T	СТОП-КОДОН
2246	T	A или G	СТОП-КОДОН
2260	A	T	СТОП-КОДОН
2266	A	T	СТОП-КОДОН
2279	T	A	СТОП-КОДОН
2284	G	T	СТОП-КОДОН
2291	T	A или G	СТОП-КОДОН
2320	A	T	СТОП-КОДОН
2327	T	A	СТОП-КОДОН
2335	A	T	СТОП-КОДОН
2338	C	T	СТОП-КОДОН
2343	C	A или G	СТОП-КОДОН
2368	C	T	СТОП-КОДОН
2380	G	T	СТОП-КОДОН
2401	G	T	СТОП-КОДОН
2405	T	A	СТОП-КОДОН
2411	G	A	СТОП-КОДОН
2412	G	A	СТОП-КОДОН
2414	T	A или G	СТОП-КОДОН
2423	T	A	СТОП-КОДОН
2430	C	A или G	СТОП-КОДОН
2432	T	A	СТОП-КОДОН
2442	T	A или G	СТОП-КОДОН
2444	T	A	СТОП-КОДОН
2453	G	A	СТОП-КОДОН
2454	G	A	СТОП-КОДОН

045492

2459	G	A	СТОП-КОДОН
2460	G	A	СТОП-КОДОН
2472	T	A или G	СТОП-КОДОН
2473	G	T	СТОП-КОДОН
2478	T	A	СТОП-КОДОН
2479	G	T	СТОП-КОДОН
2482	A	T	СТОП-КОДОН
2485	A	T	СТОП-КОДОН
2494	G	T	СТОП-КОДОН
2500	G	T	СТОП-КОДОН
2503	A	T	СТОП-КОДОН
2527	A	T	СТОП-КОДОН
2536	G	T	СТОП-КОДОН
2539	G	T	СТОП-КОДОН
2548	A	T	СТОП-КОДОН
2551	G	T	СТОП-КОДОН
2554	A	T	СТОП-КОДОН
2557	A	T	СТОП-КОДОН
2563	A	T	СТОП-КОДОН
2566	G	T	СТОП-КОДОН
2569	G	T	СТОП-КОДОН
2575	G	T	СТОП-КОДОН
2584	G	T	СТОП-КОДОН
2590	G	T	СТОП-КОДОН
2612	T	A	СТОП-КОДОН
2615	T	A	СТОП-КОДОН
2621	T	A	СТОП-КОДОН
2629	G	T	СТОП-КОДОН
2635	G	T	СТОП-КОДОН

2641	G	T	стоп-кодон
2665	A	T	стоп-кодон
2677	C	T	стоп-кодон
2679	G	A	расщепление мутации
2680	G	A	расщепление мутации
2681	T	A	расщепление мутации
3505	A	С или G или T	расщепление мутации
3506	G	A или С или T	расщепление мутации
3535	C	A или G	стоп-кодон
3549	G	T	стоп-кодон
3553	G	A	стоп-кодон
3554	G	A	стоп-кодон
3564	G	T	стоп-кодон
3573	A	T	стоп-кодон
3594	A	T	стоп-кодон
3600	C	T	стоп-кодон
3603	C	T	стоп-кодон
3606	G	T	стоп-кодон
3624	G	T	стоп-кодон
3633	C	T	стоп-кодон
3645	G	T	стоп-кодон
3649	C	A или G	стоп-кодон
3671	C	A или G	стоп-кодон
3680	T	A	стоп-кодон
3690	G	T	стоп-кодон
3699	C	T	стоп-кодон
3724	T	A или G	стоп-кодон
3735	G	T	стоп-кодон
3739	C	A или G	стоп-кодон

3767	T	A или G	стоп-кодон
3811	T	A или G	стоп-кодон
3813	G	T	стоп-кодон
3825	A	T	стоп-кодон
3832	G	A	стоп-кодон
3833	G	A	стоп-кодон
3843	G	T	стоп-кодон
3854	C	A или G	стоп-кодон
3858	G	T	стоп-кодон
3861	A	T	стоп-кодон
3868	G	A	стоп-кодон
3869	G	A	стоп-кодон
3874	T	A	стоп-кодон
3879	G	T	стоп-кодон
3885	A	T	стоп-кодон
3891	G	T	стоп-кодон
3903	G	T	стоп-кодон
3915	A	T	стоп-кодон
3922	T	A или G	стоп-кодон
3939	A	T	стоп-кодон
3942	A	T	стоп-кодон
3945	A	T	стоп-кодон
3950	T	A	стоп-кодон
3982	T	A	стоп-кодон
3987	G	T	стоп-кодон
3991	T	A	стоп-кодон
4018	G	A	стоп-кодон
4019	G	A	стоп-кодон
4021	T	A или G	стоп-кодон

4032	G	T	стоп-кодон
4038	A	T	стоп-кодон
4044	G	T	стоп-кодон
4047	G	T	стоп-кодон
4059	A	T	стоп-кодон
4062	G	T	стоп-кодон
4070	T	A или G	стоп-кодон
4086	A	T	стоп-кодон
4092	C	T	стоп-кодон
4099	T	A или G	стоп-кодон
4108	T	A	стоп-кодон
4113	A	T	стоп-кодон
4132	T	A или G	стоп-кодон
4136	T	A или G	стоп-кодон

3. Использование гена или локуса CYTgst в селекции гибридов.

Как было показано ранее, мужской стерильный фенотип, обуславливающий локус *gst*, используется в селекционных программах на устойчивость для простого скрещивания на базе рекуррентного отбора. До начала клонирования гена в рамках настоящего изобретения и связанного с этим создания геномных маркеров требовалось вырастить и убрать в четыре раза больше растений, чем было необходимо, по причине их ожидаемого расщепления 3:1 по фенотипу. Эти растения оценивали на стерильность сразу после цветения, фертильные индивидуумы удаляли, чтобы предотвратить самоопыление. При ежегодном выращивании нескольких тысяч растений такой ручной отбор требует больших трудовых затрат и подвержен ошибкам. Теперь обеспечены геномные маркеры по данному изобретению (см. пример 2 и фиг. 2), позволяющие тестировать 30000 растений и отбирать 75000 мужских стерильных растений для последующего выращивания.

Ведется постоянная работа по упрощению селекционных программ и производства семян растений сахарной свеклы и, таким образом, снижению затрат. В результате коммерческие сорта сахарной свеклы, которые производятся в настоящее время, являются тройными гибридами, что позволяет получать достаточное количество семян. Производство гибридов по селекционным программам, которые не являются коммерческими, также является трудоемким и дорогостоящим и связано с преодолением многих преград. Теперь возможно, используя фенотип с *gst* по данному изобретению и связанные с этим ДНК-маркеры, после инсерции локуса *gst* или после мутации/ингибирования гена *CYPgst* в селекционной программе селекции отбирать мужские стерильные растения до посадки при помощи ДНК-маркеров и, таким образом, упрощать производственный процесс. Параллельно создается большое число многозародышевых форм генотипов-тестеров (MUS-тестеры). В перспективе возможно, что на смену современным ЦМС-технологиям придет альтернативная система, позволяющая делать мужскими стерильными родительские компоненты семян, например, при помощи SPT-системы, указанной выше и показанной на фиг. 5. Соответственно разумно предположить, что системы *CYPgst* по данному изобретению можно использовать и для других культивируемых растений, в частности культурных растений, как в случае коммерческого производства двойных гибридов, таких как кукуруза. Что касается кукурузы (*Zea mays*), важную роль в разработке альтернативных систем получения ее гибридных семян играют *ms*-гены. Анализ последовательностей свидетельствует о предполагаемом существовании *BvCYPgst*(GRMZM5g830329) гомолога кукурузы. В кукурузе также имеется много *ms*-мутантов, из которых только часть была клонирована, *ms*-мутанты, *ms*-мутация которых обусловлена мутацией или ингибированием *BvCYPgst* гомолога кукурузы, теперь можно отбирать при помощи настоящего изобретения и использовать для целенаправленного производства семян. Настоящее изобретение можно также применять для создания гибридного картофеля, например, для введения направленных мутаций в ген-гомолог *BvCYPgst* картофеля и использовать полученную таким образом мужскую стерильность картофеля для создания диплоидного гибридного картофеля, как показано в SPT-системе.

Специфическая экспрессия гена *BvCYPgst* в цветках и тапетуме способствует биотехнологическому использованию промотора, например, для экспрессии положительно полярной/отрицательно полярной РНК или рибозима для ингибирования гена *BvCYPgst* или экспрессии функционального белка *CYPgst*, либо предполагаемого гомолога, аналога или ортолога гена *BvCYPgst* для улучшения мутации и восста-

новления мужского фертильного фенотипа. Предполагается, что обеспечение локуса гена и нуклеиновых и аминокислотных последовательностей гена *BvCYPgst*, в добавление к генетическим маркерам и обусловленным этим вариантам осуществления изобретения, делает селекционные программы более простыми и менее дорогостоящими, так как, помимо прочего, это способствует раннему отбору стерильных индивидуумов. Это также упрощает организацию материального обеспечения и расширение селекционных программ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение *Beta vulgaris*, проявляющее рецессивный ядерно-кодируемый мужской стерильный фенотип, отличающееся тем, что по сравнению с соответствующим (мужским фертильным) растением дикого типа *Beta vulgaris* данный фенотип обуславливается мутацией гена эндогенной цитохром P450 оксидазы либо отсутствием, или низким содержанием, или активностью функционального белка цитохром P450 оксидазы, кодируемого геном дикого типа цитохром P450 оксидазы, при этом ген цитохром P450 оксидазы представляет собой ген, выбираемый из группы, состоящей из

(a) нуклеотидной последовательности, содержащей SEQ ID NO: 1 или 2;

(b) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; или

(c) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, которая идентична по крайней мере на 80% аминокислотной последовательности в SEQ ID NO: 3,

при этом мутация представляет собой делецию в кодирующей нуклеотидной последовательности гена *CYPgst*, сигнале сплайсинга или регуляторной последовательности, представленной, по меньшей мере, последовательностью промотора, гена *CYPgst*, при этом делеция в *Beta vulgaris* может быть обнаружена посредством отсутствия маркерного локуса *sle5983d14*, определяемого посредством продукта амплификации с длиной, ограниченной размерами праймеров к последовательностям SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, или маркерного локуса *sle5983d17*, определяемого посредством продукта амплификации с длиной, ограниченной размерами праймеров к последовательностям SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, или обоих указанных локусов и посредством наличия убиквитинового маркера,

при этом мутация предотвращает транскрипцию и/или трансляцию функционального белка.

2. Растение по п.1, отличающееся тем, что оно является гетерозиготным по мутации и мужским фертильным или гомозиготным по мутации и мужским стерильным, при этом образование пыльцы супрессируется у стерильного растения.

3. Растение по п.1, отличающееся тем, что ген располагается в сегменте на хромосоме 1 между маркерными локусами *snx2151s01* и *sle3305s02*, где маркерная последовательность *snx2151s01* в SEQ ID NO: 24 и маркерная последовательность *sle3305s02* в SEQ ID NO: 26 обозначают присутствие локуса *gst*, а маркер *snx2151s01* в SEQ ID NO: 25 и маркерная последовательность *sle3305s02* в SEQ ID NO: 27 обозначают стандартную последовательность.

4. Растение по п.1, отличающееся тем, что не мутировавший ген (ген дикого типа) имеет нуклеотидную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из

(a) нуклеотидной последовательности, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2;

(b) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3.

5. Молекула нуклеиновой кислоты или рекомбинантная молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из

(a) нуклеотидной последовательности, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2;

(b) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

(c) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, которая содержит как минимум одну аминокислотную делецию, замещение, присоединение и/или инсерцию в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 и которая идентична по меньшей мере на 90% аминокислотной последовательности по всей ее длине,

где нуклеиновая кислота дополнительно содержит мутацию в форме делеции, при этом мутация представляет собой делецию в кодирующей нуклеотидной последовательности гена *CYPgst*, сигнале сплайсинга или регуляторной последовательности, представленной, по меньшей мере, последовательностью промотора, гена *CYPgst*, при этом делеция в *Beta vulgaris* может быть обнаружена посредством отсутствия маркерного локуса *sle5983d14*, определяемого посредством продукта амплификации с длиной, ограниченной размерами праймеров к последовательностям SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, или маркерного локуса *sle5983d17*, определяемого посредством продукта амплификации с длиной, ограниченной размерами праймеров к последовательностям SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, или обоих указанных локусов и посредством наличия убиквитинового маркера,

при этом мутация предотвращает транскрипцию и/или трансляцию функционального белка.

6. Рекомбинантная молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из

группы: нуклеотидная последовательность 1762-2679 из SEQ ID NO: 1; нуклеотидная последовательность 3507-4142 из SEQ ID NO: 1; нуклеотидная последовательность 244-1161 из SEQ ID NO: 2; или нуклеотидная последовательность 1161-1787 в SEQ ID NO: 2, которая кодирует малую шпилечную РНК (shRNA), малую интерферирующую РНК (siRNA) или двуцепочечную РНК, которая после экспрессии или введения в растительную клетку *Beta vulgaris* приводит к ингибированию экспрессии функционального гена цитохром Р450 оксидазы, представленного в растении по п.1.

7. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты либо рекомбинантную молекулу ДНК по п.5.

8. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или рекомбинантную молекулу ДНК по п.5.

9. Способ получения растения, которое проявляет рецессивный, ядерно-кодируемый гомозиготный мужской стерильный фенотип, отличающийся тем, что экспрессия гена цитохром Р450 оксидазы ингибируется, тем, что включает этап введения рекомбинантной молекулы ДНК по п.6.

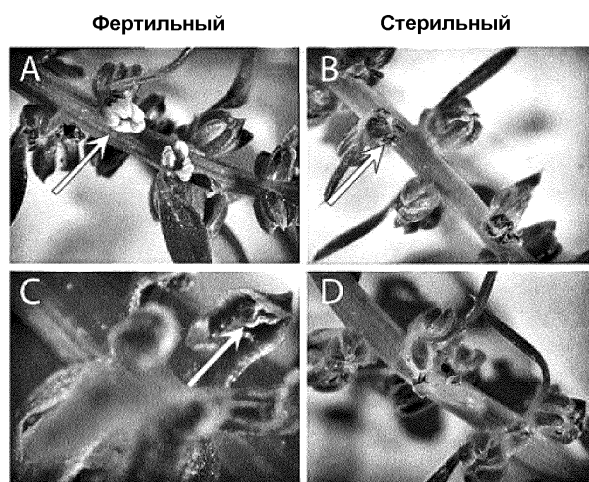
10. Способ восстановления фертильности растения по п.1, отличающийся тем, что включает введение функционального гена цитохром Р450 оксидазы в растение *Beta vulgaris*.

11. Орган, часть растения или ткань растения по п.1.

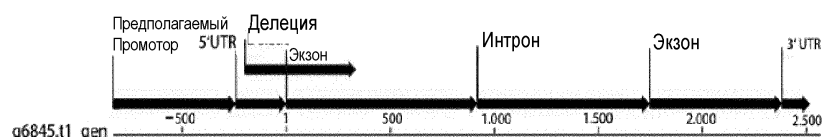
12. Клетка растения по п.1.

13. Способ идентификации растения по п.1, отличающийся тем, что обеспечивает обнаружение мутации гена цитохром Р450 оксидазы или маркера, связанного с мутацией.

14. Вектор по п.7, отличающийся тем, что представляет собой вектор для растений.



Фиг. 1



Фиг. 2

Consensus_Fertil	GTATATCGTT	GCCACATGTG	CGTTGAATTT	TTCCCTTTTC	TATCCTTTTC	ACTGCATATT	CTCCTCAAAA	GTGTGTAATA	ATCCGACACA	90
Consensus_Steril	GTATATCGTT	GCCACATGTG	CGTTGAATTT	TTCCCTTTTC	TATCCTTTTC	ACTGCATATT	CTCCTCAAAA	GTGTGTAATA	ATCCGACACA	90
Consensus_Fertil	CGAGTAGAAT	GGGATTGAAG	TGGGTCAAGA	TCTGAAACCA	ATGGGTCAAT	GCCACAAAAT	AAGGTAAGGT	TTCTCGCAGT	AGCAAAAAAA	180
Consensus_Steril	CGAGTAGAAT	GGGATTGAAG	TGGGTCAAGA	TCTGAAACCA	ATGGGTCAAT	GCCACAAAAT	AAGGTAAGGT	TTCTCGCAGT	AGCAAAAAAA	180
Consensus_Fertil	TAAAGTTAAG	TTGAGAGAAA	AATTATGAAT	AGTTGTTTCT	CGTGAAGAGT	TGTATACAAA	AAAAGTCTAA	TTTGATACAT	TTTCTTTTAC	270
Consensus_Steril	TAAAGTTAAG	TTGAGAGAAA	AATTATGAAT	AGTTGTTTCT	CGTGAAGAGT	TGTATACAAA	AAAAGTCTAA	TTTGATACAT	TTTCTTTTAC	270
Consensus_Fertil	ATTTATAAAG	GATTGACCAA	TCATCCAAAT	TACCAAAAT	TTAGGATATA	AATCTTTTCAG	ATTACAACCC	ATATATGATA	CACATAAATT	360
Consensus_Steril	ATTTATAAAG	GATTGACCAA	TCATCCAAAT	TACCAAAAT	TTAGGATATA	AATCTTTTCAG	ATTACAACCC	ATATATGATA	CACATAAATT	360
Consensus_Fertil	TACATGAGGC	AATGGAGGAT	TTGCATGAAT	ATCGAGGAGA	GAAAAAATTA	GTACAAAAAC	TTGCATAATT	TATCCAAAGC	AAATCAAGTC	450
Consensus_Steril	TACATGAGGC	AATGGAGGAT	TTGCATGAAT	ATCGAGGAGA	GAAAAAATTA	GTACAAAAAC	TTGCATAATT	TATCCAAAGC	AAATCAAGTC	450
Consensus_Fertil	AAGAAACAA	GAACATATTT	ATCATTAGTA	CTATAAGTAT	ATATTATAGG	CTTAGAGCAA	AGCCCTAAGT	ACCACATGCG	ACACAAATGA	540
Consensus_Steril	AAGAAACAA	GAACATATTT	ATCATTAGTA	CTATAAGTAT	ATATTATAGG	CTTAGAGCAA	AGCCCTAAGT	ACCACATGCG	ACACAAATGA	540
Consensus_Fertil	TACATGAGGC	AATGGAGGAT	TTGCATGAAT	ATCGAGGAGA	GAAAAAATTA	GTACAAAAAC	TTGCATAATT	TATCCAAAGC	AAATCAAGTC	630
Consensus_Steril	TACATGAGGC	AATGGAGGAT	TTGCATGAAT	ATCGAGGAGA	GAAAAAATTA	GTACAAAAAC	TTGCATAATT	TATCCAAAGC	AAATCAAGTC	630
Consensus_Fertil	GAACATCAAG	AATGGTATAG	CTGATAAAGG	ACAATTTTAA	CATAAGTGT	AAGCTCCGAC	ATCATCAATT	ATATTCCGAT	ACTACTAGAC	720
Consensus_Steril	GAACATCAAG	AATGGTATAG	CTGATAAAGG	ACAATTTTAA	CATAAGTGT	AAGCTCCGAC	ATCATCAATT	ATATTCCGAT	ACTACTAGAC	720
Consensus_Fertil	CAATCTTTAC	TTAGTACATG	TGTTAGTACA	TGTTGTTACT	CATATCAGAT	GTATTGATTG	TTGCCAATGA	CATATCATGT	TGACTTAATC	810
Consensus_Steril	CAATCTTTAC	TTAGTACATG	TGTTAGTACA	TGTTGTTACT	CATATCAGAT	GTATTGATTG	TTGCCAATGA	CATATCATGT	TGACTTAATC	810
Consensus_Fertil	TTAGGGCCAT	TTAATTATTA	CATGGAGAAT	AATACAACTT	AAAATTATGT	GGTGGCTATC	ATCTCATTTT	CTAGATAAAT	AAACCTTTAT	900
Consensus_Steril	TTAGGGCCAT	TTAATTATTA	CATGGAGAAT	AATACAACTT	AAAATTATGT	GGTGGCTATC	ATCTCATTTT	CTAGATAAAT	AAACCTTTAT	900
Consensus_Fertil	TTTGATATCA	TATATATTGT	CTTTACATAG	CAAAAACATA	TTGAAGGTAT	AACAACCTTT	CCCTTTTCTT	TTACTACATG	TTTATGTTAG	990
Consensus_Steril	TTTGATATCA	TATATATTGT	CTTTACATAG	CAAAAACATA	TTGAAGGTAT	AACAACCTTT	CCCTTTTCTT	TTACTACATG	TTTATGTTAG	990
Consensus_Fertil	AGTTTTTTCGA	TTTACGATTG	TGGTAAATTA	ATTGTAATTG	ATCGGTTGTC	TTGTAGTCAA	GAAATGACGT	ATGAATCAAT	TTAGGGCATG	1080
Consensus_Steril	AGTTTTTTCGA	TTTACGATTG	TGGTAAATTA	ATTGTAATTG	ATCGGTTGTC	TTGTAGTCAA	GAAATGACGT	ATGAATCAAT	TTAGGGCATG	1080
Consensus_Fertil	TTCTCTTCGG	CATAAAACAG	CTGAAGTGAA	TTGAAGTGAA	CTGAAATGAA	TAGTGATATG	TGAGAGTAAA	AGTATTGTCA	AGAGCTGAAC	1170
Consensus_Steril	TTCTCTTCGG	CATAAAACAG	CTGAAGTGAA	TTGAAGTGAA	CTGAAATGAA	TAGTGATATG	TGAGAGTAAA	AGTATTGTCA	AGAGCTGAAC	1170
Consensus_Fertil	TGAGCTGAAC	TGAACGGATC	TGAAGTGAA	TGATCTAATC	TGAAGTAAAT	TGAAGTGAAC	TGAAGTGAAT	TGAAGTGAAT	TGAAGTGAAT	1260
Consensus_Steril	TGAGCTGAAC	TGAACGGATC	TGAAGTGAA	TGATCTAATC	TGAAGTAAAT	TGAAGTGAAC	TGAAGTGAAT	TGAAGTGAAT	TGAAGTGAAT	1260
Consensus_Fertil	GAAAAACAG	CTTACTACT	ATTATATAAC	CTCGTTTAAA	TATTAGGAAA	TTAAAAAAT	AATTATATTT	CTTTTACTT	TATTAACTTA	1350
Consensus_Steril	GAAAAACAG	CTTACTACT	ATTATATAAC	CTCGTTTAAA	TATTAGGAAA	TTAAAAAAT	AATTATATTT	CTTTTACTT	TATTAACTTA	1350
Consensus_Fertil	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	1440
Consensus_Steril	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	1440
Consensus_Fertil	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	1530
Consensus_Steril	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	1530
Consensus_Fertil	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	1620
Consensus_Steril	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	1620
Consensus_Fertil	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	1710
Consensus_Steril	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	1710
Consensus_Fertil	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	1800
Consensus_Steril	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	1800
Consensus_Fertil	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	1890
Consensus_Steril	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	1890
Consensus_Fertil	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	1980
Consensus_Steril	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	1980
Consensus_Fertil	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	2070
Consensus_Steril	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	2070
Consensus_Fertil	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	2160
Consensus_Steril	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	2160
Consensus_Fertil	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	2250
Consensus_Steril	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	2250
Consensus_Fertil	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	2340
Consensus_Steril	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	2340
Consensus_Fertil	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	2430
Consensus_Steril	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	TTTACGTTT	2430

Фиг. 3

		2,380		2,380		2,400		2,400	
Consensus_Fertil	AGGACAAGAA	AAGCAAGCAA	CAATGGCAG	TGAATCAGGG	TCAATGGAT	TTTGTAGATA	TTTTGTGGC	TTTGGCTGGT	GAATTCGAA 2430
Consensus_Steril	AGGAGAAGAA	AAGGAAGCAA	CAATGGGAG	TGAATCAGGG	TCAATGGAT	TTTGTAGATA	TTTTGTGGC	TTTGGCTGGT	GAATTCGAA 1997
		2,440		2,460		2,480		2,500	
Consensus_Fertil	ATGAGCATAT	GGATGATGCA	GATATTAAAG	CTCTAATTCA	GGTAATTCAT	GTATAATTTG	AATGTGAT	TTACAAAGTT	TGATAGAAAA 2520
Consensus_Steril	ATGAGCATAT	GGATGATGCA	GATATTAAAG	CTCTAATTCA	GGTAATTCAT	GTATAATTTG	AATGTGAT	TTACAAAGTT	TGATAGAAAA 1983
		2,540		2,560		2,580		2,600	
Consensus_Fertil	CATATTTCGA	TAAATATATG	GTTCCCTAC	TAGACCCAAT	AAATACATA	ATTATTGGCT	TCTAGTTGA	AAGTTGAAC	AACCTAGCTA 2610
Consensus_Steril	CATATTTCGA	TAAATATATG	GTTCCCTAC	TAGACCCAAT	AAATACATA	ATTATTGGCT	TCTAGTTGA	AAGTTGAAC	AACCTAGCTA 2973
		2,620		2,640		2,660		2,680	
Consensus_Fertil	CCATTTTGT	GTGATTATCA	TTAGCCAAGC	AAAAATATTT	CTTGCAATCA	TATATTAAAT	TTGAGAT	GTCCCATATA	TTTACAATTA 2700
Consensus_Steril	CCATTTTGT	GTGATTATCA	TTAGCCAAGC	AAAAATATTT	CTTGCAATCA	TATATTAAAT	TTGAGAT	GTCCCATATA	TTTACAATTA 2158
		2,720		2,740		2,760		2,780	
Consensus_Fertil	CTTGTAACAT	TTTAGCAAAA	CAAAATTAATA	TATTTTTCGG	CAAGTCCATT	TTATTGAAT	ATACCTATAT	CTTAAATATGA	ATCTTGGT 2790
Consensus_Steril	CTTGTAACAT	TTTAGCAAAA	CAAAATTAATA	TATTTTTCGG	CAAGTCCATT	TTATTGAAT	ATACCTATAT	CTTAAATATGA	ATCTTGGT 2248
		2,820		2,840		2,860		2,880	
Consensus_Fertil	ATGTACACTT	GGCTTTCAAG	GTACCAATAT	TTGACCATAT	GTAAATTAATA	TTAACAATTT	TGATAAAATC	TAATAATATG	TAAATATAC 2890
Consensus_Steril	ATGTACACTT	GGCTTTCAAG	GTACCAATAT	TTGACCATAT	GTAAATTAATA	TTAACAATTT	TGATAAAATC	TAATAATATG	TAAATATAC 2338
		2,900		2,920		2,940		2,960	
Consensus_Fertil	TTTACGGACA	TATTAGAAAC	AAAGATGACA	AATGATAAGT	CAAAATAACT	TATTTGAAC	AATGTTGTGA	AGTTAAATTT	GGAAACAAAG 2970
Consensus_Steril	TTTACGGACA	TATTAGAAAC	AAAGATGACA	AATGATAAGT	CAAAATAACT	TATTTGAAC	AATGTTGTGA	AGTTAAATTT	GGAAACAAAG 2428
		2,980		3,000		3,020		3,040	
Consensus_Fertil	GTATATTGT	ATTGCCGAAT	TTTAAATTTAT	AAATTAACCTA	TAAACAACAA	TCAATATGTA	AAACTGTTAA	GATGGAATGT	GGATAGAAATG 3060
Consensus_Steril	GTATATTGT	ATTGCCGAAT	TTTAAATTTAT	AAATTAACCTA	TAAACAACAA	TCAATATGTA	AAACTGTTAA	GATGGAATGT	GGATAGAAATG 2518
		3,080		3,100		3,120		3,140	
Consensus_Fertil	AGATGASTAT	ACTTTTACTA	GTTACCACTC	GAATTCGAT	TTCTCTCTTT	TTTTATAGTT	GTCTAACTTT	GTATTATCAT	AAATTAATTT 3150
Consensus_Steril	AGATGASTAT	ACTTTTACTA	GTTACCACTC	GAATTCGAT	TTCTCTCTTT	TTTTATAGTT	GTCTAACTTT	GTATTATCAT	AAATTAATTT 2599
		3,160		3,180		3,200		3,220	
Consensus_Fertil	TTGGGCTTAT	TTCAATGTAT	ATTTACAAAG	TTAATTGTTT	AAATTTTAA	AAATACATAA	TGTAACAAG	GATTTTCATGG	TCAATTATAC 3240
Consensus_Steril	TTGGGCTTAT	TTCAATGTAT	ATTTACAAAG	TTAATTGTTT	AAATTTTAA	AAATACATAA	TGTAACAAG	GATTTTCATGG	TCAATTATAC 2597
		3,280		3,300		3,320		3,340	
Consensus_Fertil	ACATTATTA	TATTATCTTA	AAAACTTAA	TAATGCTCAA	TTAGTTCCCA	TAATATAGGA	TATGATAGCA	GCAGCAACAG	ACACATCAGC 3330
Consensus_Steril	ACATTATTA	TATTATCTTA	AAAACTTAA	TAATGCTCAA	TTAGTTCCCA	TAATATAGGA	TATGATAGCA	GCAGCAACAG	ACACATCAGC 2787
		3,360		3,380		3,400		3,420	
Consensus_Fertil	TGTAACCAAC	GAATGGGCCA	TGGCAGAAAT	AATAAAGAC	CCAGGTGTC	TCCACAAGAT	CCACAAGAG	CTTAACACAA	TAGTAGGACC 3420
Consensus_Steril	TGTAACCAAC	GAATGGGCCA	TGGCAGAAAT	AATAAAGAC	CCAGGTGTC	TCCACAAGAT	CCACAAGAG	CTTAACACAA	TAGTAGGACC 2877
		3,440		3,460		3,480		3,500	
Consensus_Fertil	CAATCGAATG	GTACAGAAAT	CAGATCTTCC	CCAGCTTAA	TACCTACGTT	GTGTCGTAGC	TGAACGTT	CGATGCATC	CAGCAGGACC 3510
Consensus_Steril	CAATCGAATG	GTACAGAAAT	CAGATCTTCC	CCAGCTTAA	TACCTACGTT	GTGTCGTAGC	TGAACGTT	CGATGCATC	CAGCAGGACC 2967
		3,520		3,540		3,560		3,580	
Consensus_Fertil	CTTTTAAATG	CCACATGAAT	CAGTACGCCA	TACAACAATC	AACGGCTATG	ATATCCCATG	TGGGACACGT	GTCTTCATCA	ACACACATGG 3600
Consensus_Steril	CTTTTAAATG	CCACATGAAT	CAGTACGCCA	TACAACAATC	AACGGCTATG	ATATCCCATG	TGGGACACGT	GTCTTCATCA	ACACACATGG 3057
		3,620		3,640		3,660		3,680	
Consensus_Fertil	GTTAGGACGT	AACCTTAAAG	TGTGGGACAA	CATAGAGGAT	TTTTACCCTG	AAAGACATTG	GCCGTTGGAT	GGAAGTAGAG	TTGAGATTAG 3690
Consensus_Steril	GTTAGGACGT	AACCTTAAAG	TGTGGGACAA	CATAGAGGAT	TTTTACCCTG	AAAGACATTG	GCCGTTGGAT	GGAAGTAGAG	TTGAGATTAG 3147
		3,700		3,720		3,740		3,760	
Consensus_Fertil	CCATGGATCT	GATTTTAAAA	TATTACCAAT	TAGTGTGGG	AAGAGAAGAT	GTCTGTGGG	CCCACTTGGG	GTGGTGTTFG	TGTTGATGGG 3780
Consensus_Steril	CCATGGATCT	GATTTTAAAA	TATTACCAAT	TAGTGTGGG	AAGAGAAGAT	GTCTGTGGG	CCCACTTGGG	GTGGTGTTFG	TGTTGATGGG 3237
		3,800		3,820		3,840		3,860	
Consensus_Fertil	ATTGGCTACA	CTTTTTCATG	CATTTGATTG	GTTACCACCT	GATGGAATGA	AGGCAGAAAG	AATTGATACT	AAGGAAGTTT	ATGGGATGAC 3870
Consensus_Steril	ATTGGCTACA	CTTTTTCATG	CATTTGATTG	GTTACCACCT	GATGGAATGA	AGGCAGAAAG	AATTGATACT	AAGGAAGTTT	ATGGGATGAC 3327
		3,900		3,920		3,940		3,960	
Consensus_Fertil	TATGCCATAA	GCTCAACCTT	TAATGGCTTT	GGCTAAACCT	AGGCTTGCTC	TTATTATA	TCCTTGATAC	ATGTTTCATAT	TGTGGTGCAC 3957
Consensus_Steril	TATGCCATAA	GCTCAACCTT	TAATGGCTTT	GGCTAAACCT	AGGCTTGCTC	TTATTATA	TCCTTGATAC	ATGTTTCATAT	TGTGGTGCAC 3417
		3,980		4,000		4,020		4,040	
Consensus_Fertil	TTATAAGCAC	ATAGACAAAT	ACAAGTTTG	ATGACTCTA	ACATGTTT	TATTATTAG	ATACTGCAAC	TCTACAA	TTTCAAA 4035
Consensus_Steril	TTATAAGCAC	ATAGACAAAT	ACAAGTTTG	ATGACTCTA	ACATGTTT	TATTATTAG	ATACTGCAAC	TCTACAA	TTTCAAA 3507
		4,060		4,080		4,100		4,120	
Consensus_Fertil	TTCTATGTA	ATTTCTATAA	ATATAAACA	AAAGTCATAA	CGCATTTGT	TTTGAAAAA	AAAGCTTAC	ATTTCTTTAC	ACCTAAAT 4122
Consensus_Steril	TTCTATGTA	ATTTCTATAA	ATATAAACA	AAAGTCATAA	CGCATTTGT	TTTGAAAAA	AAAGCTTAC	ATTTCTTTAC	ACCTAAAT 3595
		4,140		4,160		4,180		4,200	
Consensus_Fertil	GTTTCCTTTC	TATATTITTC	TTGGTTATT	TAGAAATTA	TTTTTCAATT	TTCTATTTA	CTTATAAAC	AAGATAAGAA	AAAGCACTAA 4211
Consensus_Steril	GTTTCCTTTC	TATATTITTC	TTGGTTATT	TAGAAATTA	TTTTTCAATT	TTCTATTTA	CTTATAAAC	AAGATAAGAA	AAAGCACTAA 3585
		4,240		4,260		4,280		4,300	
Consensus_Fertil	CAATATTTC	CAACATTATA	TCCTGATAGT	TCCTTGAAT	TAATAATTTT	CAATAATTTT	AAAACGCCAA	AAGCTTCTTT	GTTCGGATAA 4301
Consensus_Steril	CAATATTTC	CAACATTATA	TCCTGATAGT	TCCTTGAAT	TAATAATTTT	CAATAATTTT	AAAACGCCAA	AAGCTTCTTT	GTTCGGATAA 3775
		4,340		4,360		4,380		4,400	
Consensus_Fertil	ATTCAAGTCA	TTTTCAATAA	AATGCCAAA	TCCTCCCTTG	CGATCAAGGA	ACAAATTTT	CACATCAAAA	CTCTTCTTCC	AAAAAGTATA 4391
Consensus_Steril	ATTCAAGTCA	TTTTCAATAA	AATGCCAAA	TCCTCCCTTG	CGATCAAGGA	ACAAATTTT	CACATCAAAA	CTCTTCTTCC	AAAAAGTATA 3895
		4,420		4,440		4,460		4,480	
Consensus_Fertil	CTTCTCCAT	GATTATGTAA	AAGAGTTTGC	ATGTTCTAAT	CTATTAGTAT	GTATTTTTCG	GATAAGAAAT	TGTATTACAA	GCTTAAATAA 4481
Consensus_Steril	CTTCTCCAT	GATTATGTAA	AAGAGTTTGC	ATGTTCTAAT	CTATTAGTAT	GTATTTTTCG	GATAAGAAAT	TGTATTACAA	GCTTAAATAA 3955
		4,500		4,520		4,540		4,560	
Consensus_Fertil	AGATATAAAC	TTATTTTAAAT	ATCGACCAAT	CCACAATATG	TATCTTCATA	TGTGTCCATC	ACCGCTAAC	CTTGAGATGT	AGATCATCTA 4571
Consensus_Steril	AGATATAAAC	TTATTTTAAAT	ATCGACCAAT	CCACAATATG	TATCTTCATA	TGTGTCCATC	ACCGCTAAC	CTTGAGATGT	AGATCATCTA 4045
		4,600		4,620		4,640		4,660	
Consensus_Fertil	AAGCACATTA	ACATCTCGTA	CTCCTCTGT	TCAATCTGG	GTTGTTTGA	ACCGAAGTTC	TCCAAAATAC	TTCTCAGTA	ATTAAGAA 4656
Consensus_Steril	AAGCACATTA	ACATCTCGTA	CTCCTCTGT	TCAATCTGG	GTTGTTTGA	ACCGAAGTTC	TCCAAAATAC	TTCTCAGTA	ATTAAGAA 4135
		4,700		4,720		4,740		4,760	
Consensus_Fertil	AAACTCACAT	TCTGAAAAAC	ATCAACATTA	TGGTTCTATG	GTCTAGTGGT	TATGACACTG	GACTCTGAAT	CCAGTAACCC	GAGTT 4741
Consensus_Steril	AAACTCACAT	TCTGAAAAAC	ATCAACATTA	TGGTTCTATG	GTCTAGTGGT	TATGACACTG	GACTCTGAAT	CCAGTAACCC	GAGTT 4220

Фиг. 3 (продолжение)

TTATTAAACCTGATTGGAACCTTATTGAACCTTATTAGACCTGATTGGAACCTTATTGCACCTGATTGGAACCTTATT
 GGAACCTTATTAGACCTTATTGGAACCTTATTGCACCTTATTAGACCTTATTGCAACTTATCTGAACCTTATCTGAACA
 AATCTGAACCTTATTGGAACCTTAAATTTTTAAGTTGAACAGAACGCACCCCTTAGTATATCGTTGCCACAT
 GTGCGTTGAATTTTTCTTTTCCCTATCCTTTCCACTCCATATTCTCCTCAAAAGTGTGTAAAAATCCGACACACG
 AGTAGAATGGGATTGAAGTGGGTCAAGATCTGAAACCAATGGGTCAATGCCACAAAATAAGGTAAGGTTTCTCGC
 AGTAGCAAAAAATAAAGTTAAGTTGAGAGAAAAATTATGAATAGTTGTTTCTCGTGAAGAGTTGTATACAAAA
 AAGTCTAATTTGATACATTTTCTTTTACATTTATAAAGGATTGACCAATCATCCAAATTACCAATATTTAGGAT
 ATAAATCTTTGAGATTACAACCCATATATGATACACTAAATTTTACATGAGGCAATGGAGGATTGTCATGAATAT
 CGAGGAGAGAAAAAATTAGTTACAAAACCTTGCTAATTTATCCAAAACCAATCAAGTCAAGAAACAACGAACAAT
 ATTATCATTAGTACTATAAGTATATATTATAGGCTTAGAGCAAAAGCCCTAACTACCACACTGCACACAAATGATA
 ACTAGTAAGAGAGGAAAAATACAAATTTAAGATTCAACATAGCAAAATTATTCATGATTCATGATTCATGATTCATG
 ATTCATGATTCACGAACATCAAGAATGGTATAGCTGATAAAGGACAATTTAAACATAAGTGTAAAGCTCGCACAT
 CATCAATTATATTCGCATACTACTAGACCAATCTTTACTTAGTACATGTGTTAGTACATGTGTTACTTTCATATCA
 GATGTATTGATTGTTGCCAATGACATATCATGTTCACTTAATCTTAGGGCCATTAAATTATAACATGGAGAATAA
 TACAACCTTAAATTTATGTGGTGGCTATCATCTCATTTTCTAGATAATTAAACCTTTATTTTGTATACATATATAT
 TGTCTTTACATAGCAAAACAATATTGAAGGTATAACAACCTTTCCCTTTTCTTTTACTACATGTTTATGTTAGAG
 TTTTTCGATTTACGATTGTGGTAAATTAATTGTAATTGATCGGTTGTCTTGTAGTCAAGAAAAGACGATGAATC
 AATTTAGGGCATGTTCTCTTCGGCATAAAACAGCTGAACTGAATTGAACTGAACTGAAATGAATAGTGATATGTG
 AGAGTAAAGTATTGTCAAGAGCTGAACTGAGCTGAACTGAACGGATCTGAACTGAACTGATCTAATCTGAACCTA
 ATCTGAACTGAACTGAACTGAAATTGAACTGAAATAAGCTAGGGAACACAGACCCCTTACTACTATTATATAACCT
 CGTTTTAAATATTAGGAAATTAATAAAATAAATTATATTTCTTTTACTTTATTAACTTATTGAGGTTTTTATATTG
 ACTCCCAATACTATTTTATAGATCATGCCATGTTAATGAGCAAACTACTTTCTCACATCTTTATAGGAGAAAAA
 GTAGATCACTCACTAGCATATCATGACCAGCGAAACCAACCAACGCTAATAGTTTATTGCTTCCATTAGAGATA
 AGAGTTAACTAATAATACCATCTTTGTGAATTTTGATGGATTGTTGGAACCTTAGCAATATATTTACTGTGTGCA
 CTTTTTGTCTACCAAAATTTTATACCAATGGCTCAAGTCTTACTTATACACAACATACAACTCCCTCCCGGCCCA
 CCAAGGTGGCCCTTATTGGAACCTCCTTCAACTAGGGCCACTTCCCCACCGCGATTTCGCCCTCATTFTGTGAA
 AATATGGGCCCTTTAGTCTACATAAGGCTTGGTAATGTGGATGCCATAACCACTAATGATCCAGAAATCATACGT
 GAGATCTTAGTTCGACAAGATGATGATTTGCGTCTCGTCCACATACCTTAGCCGCAACCCACTTGGCTTACAAT
 AGTGGTGATGTGGCCTTGGCTCCAATGGGACCAAAATGGAAGAATGAGAAGGATATGCATGGAGCACTTGCTC
 ACAACTAGACGACTTGAACCTATTGTGAGTCATAGGGCTGATGAGGCACGACATTTGGTCCAAGACGTATTAACCT
 CGTTCCCAACAAGATAAAGTTGTTAATTTGAGGGAAGTGTAGGTGCATTTTCTATGAATAACGTGACTAGAAATG
 TTGCTAGGGAAGCAATACTTTGGGGCCGGGACGGCGGGCCCAAGAGGCTCTAGAGTTTATGCATATAACACAT
 GAGTTGTTTTGTTTACTAGGCTTGATTACTTTGGGTGATTATTGCTTTTGGAGGTGGGTTGATCCATATGGA
 TGTGAAAAGAAAATGAGGGAAGTTGAAAAAAGGGTAGATGATTCCATCGCAAAATTATAGAGGAACATAGGAAG
 GAGAAGAAAAGGAAAGAAATGGGAGTGAATGAGGGTGAATGGATTGTTAGATATTTTGTGGCTTTGCTC
 GGTGAAAATGAAAATGAGCATATGGATGATGCAGATATTAAAGCTCTAATTCAGGTAATTCATGTATAATTTGAA
 TGTGATCGATACAAAGTTTGATAGAAAACATAATTGCATAAATATATGGTTGGCCTACTAGACCCAATAAAATAC
 ATAATTATTGCCCTTACTAGTTGAAAGTTGAACAACCTAGCTACCATTTTGTGTGATTATCATTAGCCAACCAA
 AATTATTTCTGATCCATATATTAATGTTGAGATCAGAGTCGGCAIATTTACAATTACTTGTAAACATTTTAAAGC
 AAACAAATTAATAATTTTTTGGCAAGTCCATTTATTGAATAATACCTATATCTTAAATGAATTTCTTGGTCAT
 GTACATTTGCCCTTTCAAGGTACCAATATTTGACCATATGTAATTACTATTAACAAATTTGATAAAATCTAAATAAT
 ATGTAATATACATTACGCACATATTAGAAACAAAGATCACAAATGATAATGCAAAATAAATTATTTGAACTAA
 TGTGTGAAGTTAAATTTGGAACAAAAGGTATATTTGTATTGCCGAATTTAAATTTATAAAATTACTTATAACAC
 AACTCAATATGTAACCTGTTAAGATGGAGTGTGGATAGAATGAGATGAGTATACTTTTACTAGTTTACCCTCGA
 AAATGCATTTCTCTCTTTGTTTATAGTTGTTCTAACTTCTATTATCATAAATAATTTTTTGGACTTATTTCAATG
 TATATTTACAACGCTAATTTGTTAAATTTTTTAAAAATACATAATGTAAACAAGGATTTGATGGTCAATTTATACAC
 ATTATAAATAATTATCTTAAAAAATCTTAAATGCTCAATTAGTATCCATAATATAGGATATGATAGCAGCAGCAA
 CAGACACATCAGCTGTAAACCAACGAATGGGCCATGGCAGAAGTAATAAAACCCACGTTCTCTCCACAAGATCC
 AACAAGAGCTTAAACAAATAGTAGGACCCAATCGAATGGTAACAGAATCAGATCTTCCCCACCTTAACTACCTAC
 GTTGTGTGCTAGCTGAAACGTTCCGAAATGCATCCAGCAGGACCCCTTTTAAATCCACATGAATCACTACGCCATA
 CAACAAICACGGCTATGATATCCCATCTGGGACACGTGTCTTCATCAACACACATGGGTTAGGACGTAACCTTA
 AAGTGTGGGACAACATAGAGGATTTTTACCCTGAAAGACATIGGCCGTGGATGGAAGTAGAGTTGAGATTAGCC
 ATGGATCTGATTTTAAATATTTACCATTTAGTCTGGGAAGAGAAGATGTCTGGGGCCCCACTTGGGGTGGTGT
 TTGTGTGATGGGATTGGCTACACTTTTTCATGCAATTTGATTGGTTACCACCTGATGGAAATGAAGGCAGAAGAAA
 TTGATACIAAGGAAGTTTATGGGATGACTATGCCTTAAAGCTCAACCTTTAAATGGCTTTGGCTTAAACCTTAGGCTTG
 CTCATTTATATCTTTGATACATGTTTATATTTGGTGCACCTTATAAGCACAATAGACAAATACAAGTTTGTATCG
 ACTCTAACCATTTGTTTASTATTAGTATACCTGCAACTACCAAGTATGTAATTTCTATAAATATAACACAAGT
 CATAACGCATTTTGTTTTGAAGAAAAAGAGGTTACATTTGTCTTACACCATAAA

Фиг. 4А

TTAATAAATAAATTATATTTCTTTATACTTTTATTAACCTATTGAGGTTTTATATTGACTCCCAAATACTATTTT
 ATAGATCAIGCCATGTTAATGAGCAAACTACTTTCACATCTTTATAGGAGAAAAAGTAGATCACTCACTAGCA
 TATCATGACCAGCGAAACCAACCAACGCTAATAGTTTTATTGCTTCCATTAGAGATAAGAGTTAACTAATAATAC
 CATCTTTGTGAAATTTTGATGGATTTTGGAACTTTAGCAATATATTTACTGTGTGCACCTTTTGTACCAAAATT
 TTATACCAATGGCTCAAGTCTACTTTATACACAACATACAACTCCCTCCCGGCCACCAAGGTGGCCCTTATTT
 GGAAAOCTCCTTCAACTAGGGCCACTTCCCCACCGCGATTTCGCCTCATTTTGTGAAAAATATGGGCCCTTAGTC
 TACATAAGGCTTGGTAATGTGGATGCCATAACCACTAATGATCCAGAAATCATACGTGAGATCTTAGTTCGACAA
 GATGATGATTTGCGTCTCGTCCACATACCTTAGCCGCAACCCACTTGGCTTACAATAGTGGTGATGTGGCCTTG
 GCTCCAATGGGACCAAAATGGAAAAGAATGAGAAGGATATGCATGGAGCACTTGCTCACAACCTAGACGACTTGAA
 CTATTTGTGAGTCATAGGGCTGATGAGGCACGACATTTGGTCCAAGACGTATTAACTCGTTCCCAACAAGATAAA
 GTTGTTAATTTGAGGGAAGTGTAGGTGCATTTTCTATGAATAACGTGACTAGAAATGTGCTAGGGAAGCAATAC
 TTTGGGGCCGGACGGCGGGGCCACAAGAGGCTCTAGAGTTTATGCATATAACACATGAGTTGTTTTGTTACTA
 GGCTTGATTTACTTGGGTGATTATTTGCCTTTTTGGAGGTGGGTGATCCATATGGATGTGAAAAGAAAATGAGG
 GAAGTTGAAAAAAGGGTAGATGATTTCCATCGCAAAATTATAGAGGAACATAGGAAGGAGAAGAAAAGAAAGAA
 GAAATGGGAGTGAATGAGGGTGAAATGGATTTGTAGATATTTTGTGGCTTTGCCTGGTGAAATGGAATGAG
 CATATGGATGATGCAGATATTAAGCTCTAATTCAGGATATGATAGCAGCAGCAACAGACACATCAGCTGTAAAC
 AACGAATGGGCCATGGCAGAAGTAATAAACACCCACGTGTCTCCACAAGATCCAACAAGAGCTTAACACAATA
 GTAGGACCCAAATCGAATGGTAACAGAAATCAGATCTTCCCCACCTTAACTACCTACGTTGTGTGCTACGTGAAACG
 TTCCGAATGCAATCCAGCAGGACCCCTTTTAAATCCACATGAATCACTACGCCATACAACAATCAACGGCTATGAT
 ATCCCATCTGGGACACGTGTCTTCATCAACACACAAGGGTTAGGACGTAACCTTAAAGTGTGGGACAACATAGAG
 GATTTTTACCTGAAAGACATTGGCCGTTGGATGGAAGTAGAGTTGAGATTAGCCATGGATCTGATTTTAAATA
 TTACCATTTAGTGCTGGGAAGAGAAGATGTCTGGGGCCCCACTTGGGGTGGTGTTGTGTTGATGGGATTGGCT
 ACACTTTTTCATGCAATTTGATTTGGTTACCACTGATGGAAATGAAGGCAGAAGAAATTGATACTAAGGAAGTTAT
 GGGATGACTATGCCTAAAGCTCAACCTTTAATGGCTTTGGCTAAACCTAGGCTTGCTCATTTATATCTTTGATAC
 ATGTTTCATATTGTGGTGCACTTATAAGCACAAATAGACAAATACAAGTTTGTATCGACTCTAACATGTTGTTTAGT
 ATTAGTATACTCGAACCTCTACAAGTATGTAATTCTATAAACTATAAACACAAGT

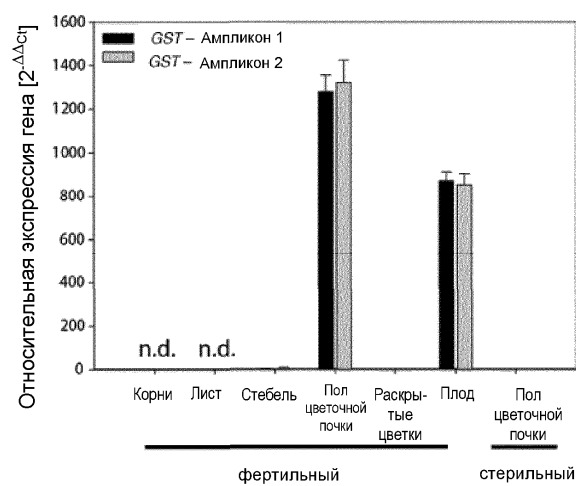
Фиг. 4B

MDFGLAIYLLCALFATKILYQWLKSYLYTTYKLPPGPPRWPLFGNLLQLGLPHRDFASFCEKYGLPVYIRLGN
 VDAITINDPEIIREILVRQDDVFASRPHTLAATHLAYNSGDVALAPMGPKWKRMRRICMEHLLTTRLELFVSHR
 ADEARHLVQDVLTRSHKDKVNVNLEVLGAFSMNVVIRMLLGKQYFGAGTAGPQEALEFMHITHELFWLLGLIYLG
 DYLPFWRWVDPYGCEKKMREVEKRVDDFHRKIEBHRKEKKRKEEMGVNEGEMDFVDILLALPGENGNEHMDAD
 IKALIQDMIAAATDTSAVINEWMAAEVIKHPVRLHKIQEELNTIVGPNRMVTESDLPHLNYLRCVVRETFRMHPA
 GPFLIPHESLRHTTINGYDIPSGTRVFINTHGLGRNLKVWDNIEDFYPERHWPDLGSRVEISHGSDFKILPFSAG
 KRRCPGAPLGVVVFVLMGLATLFHAFDWLPPDGMKAEEIDTKEVYGMTMPKAQPLMALAKPRLANLHL

Фиг. 4C

GTATATCGTTGCCACATGTGCGTTGAATTTTTCCTTTTCCTATCCTTTCCACTCCATATTTCTCCTCAAAAGTGTG
 TAAAAATCCGACACACGAGTAGAATGGGATTGAAGTGGGTCAAGATCTGAAACCAATGGGTCAATGCCACAAAAT
 AAGGTAAGGTTTCTCGCAGTAGCAAAAAATAAAGTTAAGTTGAGAGAAAAATTATGAATAGTTGTTTCTCGTGA
 AGAGTTGTATACAAAAAAGTCTAATTTGATACATTTCTTTTACATTTATAAAGGATTGACCAATCATCCAAAT
 TACCAATATTTAGGATATAAATCTTTCAGATTACAACCCATATATGATACACTAAATTTTACATGAGGCAATGG
 AGGATTTGCATGAATATCGAGGAGAGAAAAATTAGTTACAAAACCTGCATAATTTATCCAAACCAATCAAGTC
 AAGAAACAACGAACATATTTATCATTAGTACTATAAGTATATATTATAGGCTTAGAGCAAAGCCCTAACTACCAC
 ACTGCACACAAATGATAACTAGTAAGAGAGGAAAAATACAAATTTAAGATTCAACATAGCAAATTTATCATGATTC
 ATGATTCATGATTTCATGATTCATGATTCACGAACATCAAGAATGGTATAGCTGATAAAGGACAATTTAAACATAA
 GTGTAAAGCTCGCACATCATCAATTATATTTCGCATACTACTAGACCAATCTTTACTTAGTACATGTGTTAGTACA
 TGTGTTACTTCATATCAGATGTATTGATTGTTGCCAATGACATATCATGTTCACTTAATCTTAGGGCCATTTAAT
 TATAACATGGAGAATAATACAACCTTAAAAATTATGTGGTGGCTATCATCTCATTTTCTAGATAATTAACCTTTAT
 TTTGTATACATATATATTGCTTTACATAGCAAAACAATATTGAAGGTATAACAACCTTTCCCTTTTCTTTTACT
 ACATGTTTATGTAGAGTTTTCGATTACGATTGTGGTAAATTAATTGTAATTGATCGGTTGTCTGTAGTCAA
 GAATGACGATGAATCAATTTAGGGCATGTTCTCTCGGCATAAAACAGCTGAACCTGAATTGAACCTGAACCTGAA
 ATGAATAGTGATATGTGAGAGTAAAGTATTGTCAAGAGCTGAACCTGAGCTGAACCTGAACGGATCTGAACCTGAAC
 TGATCTAATCTGAACCTAATCTGAACCTGAACCTGAACCTGAACCTGAACCTGAACCTGAACCTGAACCTGAACCTGA
 CTACTATTATATAACCTCGTTTAAATATTAGGAAATTAATAAATAATTTATATTTCTTTTACTTTTATTAACCTA
 TTATACAATAGTGGTGATGTGGCCTTGGCTCCAATGGGACCAAAATGGAAAAGAATGAGAAGGATATGCATGGAG
 CACTTGCTCACAACCTAGACGACTTGAACCTTTGTGAGTCAATAGGCTGATGAGGCACGACATTTGGTCCAAAGAC
 GTATTAACCTCGTTCCCAACAAGATAAAGTTGTTAATTTGAGGGAAGTGTTAGGTGCATTTTCTATGAATAACGTG
 ACTAGAATGTTGCTAGGGAAGCAATACTTTGGGGCCGGGACGGCGGGCCCAAGAGGCTCTAGAGTTTATGCAT
 ATAACACATGAGTTGTTTGGTTACTAGGCTTGATTACTTTGGGTGATTATTGCTTTTGGAGGTGGGTGAT
 CCATATGGATGTGAAAAGAAAATGAGGGAAGTTGAAAAAAGGGTAGATGATTTCCATCGCAAAATTTATAGAGGAA
 CATAGGAAGGAGAAGAAAAGGAAAGAAAATGGGAGTGAATGAGGGTGAATGGATTTTGTAGATATTTTGTGTTG
 GCTTTGCTGCTGGAATGGAATGAGCATATGGATGATGCAGATATTAAGCTCTAATTCAGGTAATTCATGTA
 TAATTTGAATGTGATACAAAGTTTGATAGAAAACATATTTGCATAAATACATGGTTACCCCTACTAGACCCAATAA
 AATACATAATTTATGCTTGTAGTTGAAAGTTGAACCAACCTAGCTACCATTTTGTGTGATTATCATTAGCCA
 ACCAAAACCTATTTCTTGATCCATAATTAATGTTGAGAGTCGCCATATTTACAATTACTTGTAACATTTTGAGC
 AAACAAATTAATAATTTTTTGGCAAGTCCATTTTATTGAATGATACCTATATCTTAAATGAATCCTTGGTTAT
 GTACATTTGCCCTTTCAGGTACCAATTTTGACCATATGTAATTACTATTAAACAAATTTGATAAAATCTAATAAT
 ATGTAATATACGTTTACGCACATATTAGAAACAAAGATCACAATGATAATGCAAAATAACCTATTTGAACTAA
 TGTGTGAAGTTAAATTTGGAACAAAGGTATATTTGTATTGCCGAATTTTAAATTTATAAATTAATTTTACCTATAACAC
 AACTCAATATGTAACCTGTTAAGATGGAGTGTGGATAGAAATGAGATGAGTATACCTTTTACTAGTTTACCACCTCGA
 AATTGCATTTCTCCTTTGTTTATAGTTGTTCTAATTTCTATTCATAAAATAATTTTGGACTTATTTCAATGT
 ATATTTACACGTTAAATTTGTTTAAATTTTTTAAAAATACATAATGTAAACAAGGATTTTCATGGTCAATTTATACACA
 TTATAGATATTATCTTAAAAAACTTACTAATGTCTCAATTAGTGTCCATAATATAGGATATGATAGCAGCAGCAAC
 AGACACATCAGCTGTAAACCAACGAATGGGCCATGGCAGAAGTAATAAAACACCCACGCTGCTCTCCACAAGATCCA
 ACAAGAGCTTAACACAATAGTAGGACCCCAATCGAATGGTAACAGAAATCAGATCTTCCCCACCTTAACCTACCTAGC
 TTGTGTGCTAGCGGAAACGTTTCGGATGCATCCAGCAGGACCTTTTAAATCCACATGAATCACTACGCCATAC
 AACAAATCAACGGCTATGATAATCCCATCTGGGACACGTTGCTTCAATCAACACACATGGGTIAGGACGTAACCTTAA
 AGTGTGGGACAACATAGAGGATTTTTACCCTGAAAGACATTTGGCCGTTGGATGGAAGTAGAGTTGAGATTAGCCA
 TGGATCTGATTTTAAATATTACCATTTAGTGCTGGGAAGAGAAGATGCTCTGGGGCCCCACTTGGGGTGGTGT
 TGTGTTGATGGGATTGGCTACACTTTTTCATGCAITTTGATTGGTTACCACCTGATGGAATGAAGGCAGAAGAAAT
 TGATACTAAGGAAGTTTATGGGATGACTATGCTTAAAGCTCAACCTTTAATGGCTTTGGCTAAACCTTAGGCTTGC
 TCTCATTTTATATCTTTGATACATGTTTATATTTGGTGGCTTATAAGCACACTAGCTCAAAATAGACAAATACA
 AGCTTGTATTGACTCTAACATGTTATTTAATATTAGCATACTGCAACTCTACAACCTACAAGTATGTAATCTCTAT
 AAATTATAACATAAGTCATAACGCATCTTGTTTTGAATAAAGCTACACTTTCTTACACCATAAACTGTTC
 GTTACTAAATTTCTTCTGGCTTATTTTAGAATTAATTTTCAATTTTCTTATTTACTTATAACACAAAGATAAGAA
 AATCGACTAACAAATTTTCAACATTATATCTTGATAGTTGTTGAAATTAATAATTTTCAATAATTTCAAAAC
 GCAAAAAGCTTCTTTGTTTCGGATAAATTCAGTCATTTTCAATAAATCGCAAAATCTTCCCTTGCCATCAAGGA
 ACAAAATTTTTCACATCAAACTCTTCTTCCAAAAAGTATACCTTCCATTGATTATGTAAGAGAGTTTGCATGTT
 CTAATCCATTAGTATGTAATTTTTCGGATAAGAAGTTGTATTACAAGCTTAAATAAAGATATAAATCTAGTTAAAT
 ATCGACCAATCCACAATATGATCTTCATATGTGTCATCAGCGCCTAACCTTGAGATGTAGATCATCTAAAGCA
 CATTAACATGGCGTACTCTCTGTTTCAAAATCAGGGTTGTTTGAACCAAACTTCTCCAAATACTTCTCTAGTA
 ATGAAGAGAAAACTCACATTTCTGAAAAACATCAACATCATGTTCTATGGTCTAGTGGTTATGACACTGGACTC
 TGAATCCAGTAACCCGAGTT

Фиг. 4D



Фиг. 5

