

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490098 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.20

(51) Int. Cl. A01H 5/10 (2018.01)
A01H 6/46 (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.07.29

(54) РАСТЕНИЯ С УЛУЧШЕННОЙ ПЕРЕВАРИМОСТЬЮ И МАРКЕРНЫМИ
ГАПЛОТИПАМИ

(31) 21188948.0

(32) 2021.07.30

(33) EP

(86) PCT/EP2022/071303

(87) WO 2023/006933 2023.02.02

(71) Заявитель:
КВС ЗААТ SE & KO. КГАА (DE)

(72) Изобретатель:
Клойбер-Майтц Моника, Мейер Нина
(DE)

(74) Представитель:
Зуйков С.А. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к растениям, в частности к кукурузе, с улучшенной переваримостью, в частности с улучшенной переваримостью вегетативной массы. Настоящее изобретение относится к аллелям QTL, связанным с улучшенной переваримостью, и специфическим маркерным аллелям, связанным с аллелями QTL. Настоящее изобретение также относится к таким растениям, у которых ген F35H мутирован или экспрессия F35H снижена или отсутствует. Изобретение также относится к способам идентификации растений с улучшенной переваримостью и способам получения таких растений.

202490098

A1

A1

202490098

РАСТЕНИЯ С УЛУЧШЕННОЙ ПЕРЕВАРИМОСТЬЮ И МАРКЕРНЫМИ ГАПЛОТИПАМИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Изобретение касается локусов количественных признаков (QTL) и связанных с ними маркеров, участвующих в улучшении переваримости и/или связанных с улучшением переваримости таких растений и частей растений, как кукуруза. Изобретение также касается применения таких QTL или маркеров для идентификационных и/или селекционных целей, а также трансгенных или нетрансгенных растений.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Кукуруза (*Zea mays* L.) является наиболее важной однолетней кормовой культурой в мире. Ежегодно, более 3 миллионов гектаров кукурузы подвергаются силосованию, в основном в Северной Европе. Благодаря высокому содержанию обменной энергии и эффективности переваримости корма, кукуруза является важной кормовой культурой для молочного и мясного скота и оказывает значительное влияние на производство молока и мяса. Существует богатая генетическая вариация кормовых характеристик, как всего растения кукурузы, так и ее вегетативной массы (Geiger et al. 1992; Barrière et al. 2003).

Поэтому улучшение переваримости является одной из основных целей программ селекции кормовой кукурузы. Энергия, поступающая с кормом в рацион жвачных или травоядных животных, связана с усвояемостью и переваримостью корма. Переваримость любого компонента корма (сухого вещества, органического вещества или клеточной стенки) измеряется как процентное содержание силоса, переваренного в пищеварительном тракте животного (Barrière et al. 2003). На общую переваримость кормовой кукурузы влияет высокопереваримая фракция зерна и вегетативной массы. Состав и переваримость вегетативной массы – факторы, ограничивающие качество кормовой кукурузы. Основными компонентами вегетативной массы являются гемицеллюлозы, целлюлоза и лигнины. Современные сорта кормовой кукурузы сочетают высокий выход сухого вещества с высокой переваримостью вегетативной массы.

Проводить измерения переваримости, используя животных, слишком дорого, особенно при проведении крупномасштабной оценки зародышевой плазмы в программах

селекции растений. Для определения переваримости кукурузы и других кормовых культур были разработаны биологические и химические методы (Van Soest et al. 1963). Нейтрально-детергентная клетчатка (НДК), остающаяся после удаления растворимого содержимого клеток, является важным индикатором клеточной стенки растений и целлюлозы. Переваримая нейтрально-детергентная клетчатка (ПНДК) кормов *in vitro* (IVNDFD) представляет собой оценку переваримости клеточной стенки, предполагающую, что часть растительного материала, не содержащая нейтрально-детергентной клетчатки, полностью переваривается (Méchín et al. 2000). Кроме того, сообщалось об использовании NIRS (спектроскопии в ближней инфракрасной области) для точного измерения признаков переваримости многих кормовых культур, включая кукурузу (Lübberstedt et al. 1997a, b; Zimmer et al. 1990).

Lübberstedt et al. (1997a, b) впервые в своих публикациях сообщили о QTL (локусе количественных признаков), связанном с агрономическими и качественными признаками кормовой кукурузы, а также о QTL, влияющем на переваримость всего растения. Использование имеющейся генетической вариации для переваримости вегетативной массы с помощью маркерной селекции (MAS) представляется перспективным способом улучшения переваримости кормов. Помимо генетической дисперсии, причиной противоречивых признаков может быть изменение окружающей среды. QTL-анализ кормовых признаков в четырех различных популяциях кукурузы выявил лишь несколько QTL, демонстрирующих эпистатическое взаимодействие или взаимодействие с окружающей средой (Lübberstedt et al. 1998). Семь QTL для ПНДК были обнаружены с помощью 242 РИЛ (рекомбинантных инбредных линий), полученных от скрещивания F838 × F286, которые были оценены в экспериментах *per se* value в шести средах, и выявили два основных QTL (Barrière et al. 2010). Дополнительные QTL-анализы были проведены с использованием потомства РИЛ (рекомбинантной имбредной линии), полученного от скрещивания между старыми Dent и современными Iodent линиями, и впервые были зарегистрированы новые QTL в бинах 2,06 и 5,04 для КДЛ (кислотно-детергентного лигнина)/НДК и ПНДК (Barrière et al. 2012).

В WO 2019/206927 описывается QTL для переваримости растений кукурузы, а также идентификация гена F35H, связанного с QTL и отвечающего за QTL для переваримости растений, а также описывается уникальный маркерный гаплотип для улучшения переваримости. Было установлено, что инсерция приблизительно 187 нуклеотидов в F35H отвечает за снижение активности фермента, что приводит к улучшению

переваримости. Удивительно, но изобретатели, подавшие указанную заявку обнаружили, что инсерция ведет себя как транспозон. Транспозоны, как известно, меняют свое местоположение в геноме, поэтому стабильность этой инсерции ограничена. Таким образом, надежное использование признака полностью не обеспечено.

Поэтому задачей настоящего изобретения является устранение одного или нескольких недостатков предшествующего уровня техники. Существует постоянная потребность в улучшении переваримости кормовых культур, а также в идентификации растений, включая идентификацию определенных частей растений или их производных, обладающих повышенной переваримостью. В частности, целью настоящего изобретения является получение нового и стабильного основного аллеля QTL для переваримости и предоставление маркеров, позволяющих экономично использовать этот QTL при разработке и селекции кукурузы.

РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано на идентификации основного QTL для переваримости растений, а также на идентификации новых аллелей F35H, связанных с QTL и отвечающих за QTL для переваримости растений, и на описании уникального маркерного гаплотипа для улучшения переваримости.

Выявлены молекулярные маркеры, ассоциированные с переваримостью растений, и описаны маркерные аллели, ассоциированные с улучшенной переваримостью.

Настоящие изобретатели обнаружили, что инсерция в аллель, ранее описанная в WO 2019/206927, может вести себя как транспозон и может быть утеряна, а удаление может привести к потере нокаутной мутации, обеспечивающей признак улучшения переваримости. Действительно, согласно исследованиям настоящих изобретателей, основанным на 1720 удвоенных гаплоидных (УГ) линиях из 42 популяций, проанализированных на наличие SILO-09-02, аллеля QTL, улучшающего переваримость, описанного в WO 2019/206927, удаление происходит примерно в 2% всех линий, несущих аллель QTL. Это свидетельствует о неприемлемо высоком риске потери признака.

Настоящие изобретатели разработали еще один QTL с более выгодным типом инсерции (7-8 пар оснований), который гораздо более стабилен, чем первый, исследованный в WO 2019/206927, и, выгодно отличается параллельным отсутствием снижения урожайности.

Были описаны новые инсерции в гене F35H и разработаны маркеры для их обнаружения. Кроме того, для использования указанных новых QTL в пулах dent и flint для селекции кукурузы настоящее изобретение предоставляет полный набор формул, позволяющих преобразовать любой селекционный пул кукурузы с помощью новых разработанных QTL. Таким образом, маркеры настоящего изобретения уникально подходят для выявления фенотипов высокой переваримости во многих различных линиях/пулах/гаплотипах кукурузы.

Изобретение, в частности, относится к способам выявления идентифицированного аллеля QTL, связанного с улучшенной переваримостью, а также выявления любого из описанных маркерных аллелей. Изобретение также относится к описанным маркерным аллелям и полинуклеиновым кислотам, полезным для обнаружения маркерных аллелей, таких как праймеры и зонды, и наборам, включающим их. Изобретение также относится к способам улучшения переваримости растений, в частности, путем естественного или искусственного введения в растения описанных здесь маркерных аллелей и/или отбора растений, включающих описанные здесь маркерные аллели, таким как, в частности, индуцирование мутаций F35H, предпочтительно мутаций, изменяющих экспрессию F35H или ферментативную активность F35H, например, уменьшающих или устраняющих экспрессию F35H или активность F35H или иным путем уменьшающую экспрессию F35H или активность F35H, или увеличивающую активность F35H. Изобретение также относится к растениям с улучшенной переваримостью, а также к частям растений, в частности, к вегетативной массе с улучшенной переваримостью, такой, как семена, переданные на хранение в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43997.

Настоящее изобретение, в частности, охватывается любым одним из нижеперечисленных пунктов [1] - [91] или любой комбинацией одного или нескольких из нижеперечисленных пунктов с любыми другими пунктами и/или вариантами осуществления изобретения.

- [1] Способ идентификации растения или части растения кукурузы, включающий скрининг на наличие полинуклеотида, который включает (молекулярный) маркер (аллель) ma61134d15 и/или ma61134d16 в растении или части растения кукурузы (геноме); где ma61134d15 представляет собой инсерцию 8 нуклеотидов между положениями 134254381 и 134254382 на хромосоме 9, относящейся к линии PH207,

или в положении 76,19 сМ на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, и/или обнаруживается молекулярным маркером SEQ ID №: 125; предпочтительно инсерцию, указанную в SEQ ID №: 1, а ma61134d16 представляет собой инсерцию 7 нуклеотидов между положениями 134254381 и 134254382 на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, или в положении 76,19 сМ на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, и/или обнаруживается молекулярным маркером SEQ ID №: 124; предпочтительно инсерцию, указанную в SEQ ID №: 4.

- [2] Способ согласно пункту [1], где указанный полинуклеотид включает или входит в QTL (аллель), в частности, связанный с улучшенной переваримостью, на хромосоме 9 и включает и/или фланкирован (молекулярным) маркером (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01 или входит в полинуклеотид или QTL (аллель), включающий и/или фланкированный (молекулярным) маркером (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01; где SYN38529 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 56,38 сМ на хромосоме 9, относящейся к линии PH207 и/или обнаруживается молекулярным маркером SEQ ID №: 13; PZE-109103504 - однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 96,06 сМ на хромосоме 9, относящейся к линии PH207 и/или обнаруживается молекулярным маркером SEQ ID №: 195; PZE-109076467 - однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 75,85 сМ на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, где указанный нуклеотид является А или С, и/или обнаруживается молекулярным маркером SEQ ID №: 109; и ma61161s01 - однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 77,04 сМ на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, где указанный нуклеотид является А или G, и/или обнаруживается молекулярным маркером SEQ ID №: 154.
- [3] Способ идентификации растения или части растения кукурузы, включающий скрининг на наличие QTL (аллеля) на хромосоме 9, в частности, связанного с улучшенной переваримостью и включающего и/или фланкированного (молекулярным) маркером (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01 или входящего в полинуклеотид или на наличие QTL (аллеля), включающего и/или фланкированного (молекулярным) маркером (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01; где SYN38529 представляет собой

однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 56,38 сМ на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, и/или обнаруживается молекулярным маркером SEQ ID №: 13; PZE-109103504 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 96,06 сМ на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, и/или обнаруживается молекулярным маркером SEQ ID №: 195; PZE-109076467 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 75,85 сМ на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, где указанный нуклеотид является А или С, и/или обнаруживается молекулярным маркером SEQ ID №: 109; и ma61161s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 77,04 сМ на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, где указанный нуклеотид является А или G, и/или обнаруживается молекулярным маркером SEQ ID №: 154.

- [4] Способ согласно пункту [3], где указанный QTL (аллель) включает (молекулярный) маркер (аллель) ma61134d15 и/или ma61134d16; где ma61134d15 представляет собой инсерцию 8 нуклеотидов между положениями 134254381 и 134254382 на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, или в положении 76,19 сМ на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, и/или обнаруживается молекулярным маркером SEQ ID №: 125; предпочтительно инсерцию, указанную в SEQ ID №: 1, и ma61134d16 представляет собой инсерцию 7 нуклеотидов между положениями 134254381 и 134254382 на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, или в положении 76,19 сМ на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, и/или обнаруживается молекулярным маркером SEQ ID №: 124; предпочтительно инсерцию, указанную в SEQ ID №: 4.
- [5] Способ согласно любому из пунктов [1] - [4], включающий скрининг на наличие одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей), выбранных из таблицы А.
- [6] Способ согласно любому из пунктов [1] - [4], включающий скрининг на наличие одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей), выбранных из таблицы В.
- [7] Способ согласно любому из пунктов [1] - [4], включающий скрининг на наличие одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей), выбранных из таблицы С.

- [8] Способ согласно пункту [1] или [2], где указанный полинуклеотид включает один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей), определенных в любом из пунктов [5] - [7].
- [9] Способ согласно пункту [3] или [4], где указанный QTL (аллель) включает один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей), определенных в любом из пунктов [5] - [7].
- [10] Способ идентификации растения или части растения кукурузы, включающий скрининг или обнаружение наличия одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей), определенных в пункте [5], в растении или части растения кукурузы (геноме).
- [11] Способ согласно пункту [10], где указанный маркер содержится в QTL на хромосоме 9, в частности, связанном с улучшенной переваримостью, который фланкируется и/или включает (молекулярный) маркер (аллель) SYN38529 и PZE-109103504; где SYN38529 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 56,38 сМ на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, и/или обнаруживается молекулярным маркером SEQ ID №: 13; и PZE-109103504 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 96,06 сМ на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, и/или обнаруживается молекулярным маркером SEQ ID №: 195.
- [12] Способ идентификации растения или части растения кукурузы, включающий скрининг в растении или части растения кукурузы (геноме) на наличие полинуклеотида, включающего последовательность, выбранную из группы, состоящей из:
- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;
 - б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;
 - в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 7 или 8;
 - г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 9;
- где нуклеотидная последовательность имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов не кратного трем,

более предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тимином в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8.

[13] Способ согласно пункту [12], в котором инсерция 8 нуклеотидов имеет последовательность gcggttct, или в котором инсерция 7 нуклеотидов имеет последовательность gcggtct.

[14] Способ согласно пункту [12] или [13], в котором нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgtct, предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5, или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgtct, предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

в) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgtct, предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

[15] Способ идентификации растения или части растения кукурузы, включающий скрининг в растении или части растения кукурузы (геноме) на наличие полинуклеотида, включающего последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5, или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

в) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

[16] Способ согласно любому из пунктов [1] - [15], который представляет собой способ идентификации растения или части растения с улучшенной переваримостью.

[17] Способ согласно любому из пунктов [1] - [16], который представляет собой способ идентификации растения или части растения с улучшенной переваримостью вегетативной массы.

[18] Способ согласно пункту [16] или [17], при котором указанная переваримость улучшена по сравнению с переваримостью кукурузы линии PH207 или (близкой) изогенной линии, которая не включает полинуклеотид, QTL (аллель) или один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.

[19] Способ согласно пункту [13], при котором указанная переваримость улучшается по меньшей мере на 5%, предпочтительно по меньшей мере на 10% по сравнению с переваримостью кукурузы линии PH207 или (близкой) изогенной линии, не

включающей полинуклеотид, QTL (аллель) или один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.

[20] Способ согласно любому из пунктов [1] - [19], включающий выделение геномной ДНК из растения или части растения.

[21] Способ согласно любому из пунктов [1] - [20], включающий отбор растения или части растения, содержащей полинуклеотид, один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) или QTL (аллель).

[22] Способ согласно любому из пунктов [1] - [21], при котором указанная часть растения не является материалом для размножения.

[23] Способ согласно любому из пунктов [1] - [22], где указанная часть растения представляет собой вегетативную массу.

[24] Способ согласно любому из пунктов [1] - [23], где указанное растение или часть растения включает полинуклеотид, имеющий последовательность, выбранную из

а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;

б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;

в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 7 или 8;

г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 9;

где нуклеотидная последовательность, указанная в пунктах а) - г) имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов не кратного трем, более предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тиминном в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8.

д) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsagtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению

103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

е) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

ж) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

[25] Способ согласно любому из пунктов [1] - [24], где указанное растение или часть растения идентифицируется как имеющее улучшенную переваримость, если полинуклеотид, один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) или QTL (аллель) присутствуют в геноме указанного растения или части растения.

[26] Способ согласно любому из пунктов [1] - [25], где указанное растение или часть растения идентифицируется как имеющее улучшенную переваримость вегетативной массы, если полинуклеотид, один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) или QTL (аллель) присутствуют в геноме указанного растения или части растения.

[27] Растение или часть растения кукурузы, включающие один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей), определенных в таблице А.

[28] Растение или часть растения кукурузы, включающие один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей), определенных в таблице В.

[29] Растение или часть растения кукурузы, включающие один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей), определенных в таблице С.

- [30] Растение кукурузы или часть растения, включающая полинуклеотид или QTL (аллель), определенные в любом из пунктов [1] - [4], [8], [9] или [12] - [15].
- [31] Растение или часть растения в соответствии с любым из пунктов [27] - [30], где указанное растение или часть растения получены из растения, включающего указанный полинуклеотид, указанный (молекулярный) маркер (аллель) или указанный QTL (аллель), полученные путем интродукции или интрогрессии.
- [32] Растение или часть растения в соответствии с любым из пунктов [27] - [30], где указанное растение или часть растения получены путем мутагенеза, опосредованного транспозоном или транспозируемым элементом.
- [33] Растение или часть растения в соответствии с любым из пунктов [27] - [30], где указанное растение или часть растения является трансгенным или генно-редактированным.
- [34] Способ создания или производства растения или части растения кукурузы и/или улучшения переваримости (вегетативной массы), включающий введение в геном растения или части растения кукурузы полинуклеотида, одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей) или QTL (аллель), определенных в любом из пунктов [1] - [7].
- [35] Способ создания или производства растения или части растения кукурузы и/или улучшения переваримости (вегетативной массы), включающий введение в геном растения или части растения кукурузы полинуклеотида, имеющего последовательность выбранную из:
- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;
 - б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;
 - в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 7 или 8;
 - г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 9;

где нуклеотидная последовательность, указанная в пунктах а) - г) имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов не кратного трем, более предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в

положении, соответствующем положению между тиминном в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8, или

д) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

е) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

ж) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

[36] Способ согласно пункту [34] или [35], где введение в геном включает интрогрессию.

[37] Способ согласно любому из пунктов [34] - [36], включающий (а) получение первого растения кукурузы, имеющего полинуклеотид, один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) или QTL (аллель), определенные в любом из пунктов 1-9, или получение из семян *Zea mays*, переданных на хранение в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43997 (или его потомства), (b) скрещивание указанного первого растения кукурузы со вторым растением кукурузы, и (c) отбор потомства, имеющего полинуклеотид, один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) или QTL (аллель), определенные в любом из пунктов [1] - [9].

- [38] Способ согласно пункту [37], дополнительно включающий (d) сбор части растения от указанного потомства.
- [39] Способ согласно пункту [34] или [35], где введение в геном включает мутагенез, опосредованный транспозоном или транспозируемым элементом.
- [40] Способ согласно пункту [34] или [35], где введение в геном включает трансгенез или редактирование генов.
- [41] Способ согласно любому из пунктов [34] - [40], где указанная часть растения представляет собой растительную клетку, ткань, орган или семя.
- [42] Способ согласно любому из пунктов [34] - [41], где указанная часть растения представляет собой незрелый или зрелый зародыш, соцветие, протопласт, лист, материал вегетативной массы, корневой материал, кочан, семя, зерно или каллус.
- [43] Способ согласно любому из пунктов [34], [35] или [39] - [42], включающий трансформацию растения или части растения, предпочтительно растительной клетки, более предпочтительно незрелого или зрелого зародыша, соцветия, протопласта или каллуса, с указанным полинуклеотидом, указанным одним или несколькими (молекулярными) маркерами (аллелями) или указанным QTL (аллелем), и, необязательно, регенерацию растения из указанной растительной клетки, предпочтительно незрелого или зрелого зародыша, соцветия, протопласта или каллуса.
- [44] Способ согласно любому из пунктов [34] - [43], который представляет собой способ улучшения переваримости растения или части растения.
- [45] Способ согласно любому из пунктов [34] - [44], который представляет собой способ улучшения переваримости вегетативной массы.
- [46] Способ согласно любому из пунктов [34] - [45], где указанная часть растения представляет собой вегетативную массу.
- [47] Растение или часть растения кукурузы, полученные способом согласно любому из пунктов [34] - [46].
- [48] Способ, растение или часть растения согласно любому из пунктов [1] - [47], где указанный полинуклеотид, указанный один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) или указанный QTL (аллель) являются гомозиготными.

- [49] Способ, растение или часть растения согласно любому из пунктов [1] - [47], где указанный полинуклеотид, указанный один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) или указанный QTL (аллель) являются гетерозиготными.
- [50] Применение одного или нескольких молекулярных маркеров, определенных в пункте [5], для идентификации или отбора растения, или части растения кукурузы.
- [51] Применение одного или нескольких молекулярных маркеров, определенных в пункте [6], для идентификации или отбора растения, или части растения кукурузы.
- [52] Применение одного или нескольких молекулярных маркеров, определенных в пункте [7], для идентификации или отбора растения, или части растения кукурузы.
- [53] Применение согласно любому из пунктов [50] - [52] для идентификации или отбора растения, или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью.
- [54] Применение согласно любому из пунктов [50] - [53] для идентификации или отбора растения, или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью вегетативной массы.
- [55] Применение согласно любому из пунктов [50] - [54], где указанная переваримость улучшена по сравнению с переваримостью линии кукурузы PH207 или (близкой) изогенной линии, которая не включает полинуклеотид, QTL (аллель), один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.
- [56] Применение согласно любому из пунктов [50] - [55], где указанная переваримость улучшается по меньшей мере на 5%, предпочтительно по меньшей мере на 10%, по сравнению с переваримостью кукурузы линии PH207 или (близкой) изогенной линии, не включающей полинуклеотид, QTL (аллель), один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.
- [57] Применение согласно любому из пунктов [50] - [56], где указанная часть растения представляет собой вегетативную массу.
- [58] Применение полинуклеотида или QTL (аллеля), определенных в любом из пунктов 1 - 9, для создания или производства растения или части растения кукурузы.
- [59] Применение согласно пункту [58] для получения или производства растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью.

- [60] Применение согласно утверждению [58] или [59] для получения или производства растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью вегетативной массы.
- [61] Применение согласно пункту [59] или [60], где указанная переваримость улучшена по сравнению с переваримостью линии кукурузы PH207 или (близкой) изогенной линии, которая не включает полинуклеотид, QTL (аллель), один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.
- [62] Применение согласно любому из пунктов [59] - [61], где указанная переваримость улучшается по меньшей мере на 5%, предпочтительно по меньшей мере на 10%, по сравнению с переваримостью кукурузы линии PH207 или (близкой) изогенной линии, не включающей полинуклеотид, QTL (аллель), один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.
- [63] Применение согласно любому из пунктов [58] - [62], где указанная часть растения представляет собой семена или вегетативную массу.
- [64] (Выделенный) полинуклеотид, включающий полинуклеиновую кислоту, имеющую последовательность, выбранную из:
- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;
 - б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;
 - в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 7 или 8;
 - г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 9;
- где нуклеотидная последовательность, указанная в пунктах а) - г) имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов не кратного трем, более предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тиминном в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8; или
- д) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%

идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

е) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

ж) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

[65] Применение (выделенного) полинуклеотида согласно пункту [64] для создания или производства растения или части растения кукурузы.

[66] Применение согласно пункту [65] для создания или производства растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью.

[67] Применение согласно пункту [65] или [66] для создания или производства растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью вегетативной массы.

[68] Применение согласно пункту [66] or [67], где указанная переваримость улучшена по сравнению с переваримостью линии кукурузы PH207 или (близкой) изогенной линии, которая не включает полинуклеотид, QTL (аллель), один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.

[69] Применение согласно любому из пунктов [66] - [68], где указанная переваримость улучшена по меньшей мере на 5%, предпочтительно по меньшей мере на 10%, по сравнению с переваримостью кукурузы линии PH207 или (близкой) изогенной линии, не включающей полинуклеотид, QTL (аллель), один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.

- [70] Применение согласно любому из пунктов [65] - [69], где указанная часть растения представляет собой вегетативную массу.
- [71] (Выделенный) полинуклеотид, включающий (молекулярный) маркер (аллель), определенный в пункте [5], его комплемент или обратный комплемент, или его фрагмент.
- [72] (Выделенный) полинуклеотид, включающий (молекулярный) маркер (аллель), определенный в пункте [6], его комплемент или обратный комплемент, или его фрагмент.
- [73] (Выделенный) полинуклеотид, включающий (молекулярный) маркер (аллель), определенный в пункте [7], его комплемент или обратный комплемент, или его фрагмент.
- [74] (Выделенный) полинуклеотид в соответствии с любым из пунктов [71] - [73], который включает от 10 до 500 нуклеотидов, предпочтительно от 15 до 250 нуклеотидов, более предпочтительно от 18 до 250 нуклеотидов, наиболее предпочтительно от 20 до 250 нуклеотидов.
- [75] (Выделенная) полинуклеиновая кислота в соответствии с любым из пунктов [71] - [74], в частности, пригодная выступать в качестве молекулярного маркера, включающая по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 18, более предпочтительно по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов любой SEQ ID №: 13-195, или нуклеотидов комплементарных смежным нуклеотидам любой SEQ ID №: 13-195, или нуклеотидов обратно комплементарных смежным нуклеотидам любой SEQ ID №: 13-195, и предпочтительно включающая по меньшей мере один нуклеотид соответствующего полиморфизма (донорского аллеля), представленного в таблице А.
- [76] (Выделенная) полинуклеиновая кислота в соответствии с любым из пунктов [71] - [74], в частности, пригодная выступать в качестве молекулярного маркера, включающая по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 18, более предпочтительно по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов любой SEQ ID №: 109-154, или нуклеотидов комплементарных смежным нуклеотидам любой SEQ ID №: 109-154, или нуклеотидов обратно комплементарных смежным нуклеотидам любой SEQ ID №: 109-154, и предпочтительно включающая по меньшей мере один

нуклеотид соответствующего полиморфизма (донорского аллеля), представленного в таблице А.

- [77] (Выделенная) полинуклеиновая кислота в соответствии с любым из пунктов [71] - [74], в частности, пригодная выступать в качестве молекулярного маркера, включающая по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 18, более предпочтительно по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов любой SEQ ID №: 124, 125, или нуклеотидов комплементарных смежным нуклеотидам любой SEQ ID №: 124, 125, или нуклеотидов обратно комплементарных смежным нуклеотидам любой SEQ ID №: 124, 125, и предпочтительно включающая по меньшей мере один нуклеотид соответствующего полиморфизма (донорского аллеля), представленного в таблице А.
- [78] (Выделенный) полинуклеотид в соответствии с любым из пунктов [71] - [78], который специфичен для растения или части растения с улучшенной переваримостью вегетативной массы.
- [79] (Выделенная) полинуклеиновая кислота, специфически гибридизующаяся с молекулярным маркером, определенным в пункте [5], его комплементом или обратным комплементом.
- [80] (Выделенная) полинуклеиновая кислота, специфически гибридизующаяся с молекулярным маркером, определенным в пункте [6], его комплементом или обратным комплементом.
- [81] (Выделенная) полинуклеиновая кислота, специфически гибридизующаяся с молекулярным маркером, определенным в пункте [7], его комплементом или обратным комплементом.
- [82] (Выделенная) полинуклеиновая кислота в соответствии с любым из пунктов [71] - [81], которая представляет собой праймер или зонд.
- [83] (Выделенная) полинуклеиновая кислота в соответствии с любым из пунктов [71] - [82], которая представляет собой аллель-специфический праймер.
- [84] (Выделенная) полинуклеиновая кислота в соответствии с любым из пунктов [71] - [83], которая представляет собой KASP-праймер.

- [85] Праймер или зонд, способный специфически обнаруживать полинуклеотид, один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) или QTL (аллель), определенные в любом из пунктов [1] - [9].
- [86] Набор праймеров, способный специфически обнаруживать полинуклеотид, один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) или QTL (аллель), определенные в любом из пунктов [1] - [9].
- [87] Семя *Zea mays*, переданное на хранение в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43997.
- [88] Семя (K0001) *Zea mays*, репрезентативный образец которого был передан на хранение в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43997.
- [89] Растение *Zea mays*, выращенное или полученное из семени согласно пункту 87 или 88, или его потомство.
- [90] Часть растения *Zea mays*, выращенная или полученная из семян согласно пункту [87] или [88], или полученная из растения (или его потомства) согласно пункту [89].
- [91] Часть растения *Zea mays* согласно пункту [90], где указанная часть растения представляет собой вегетативную массу.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1: ПНДК (переваримая нейтрально-детергентная клетчатка) на уровне инбредных линий кукурузы (*Zea mays*). Анализ проведен с использованием БИК-спектроскопии, описанной выше. Левый столбец: дикий тип без инсерции 7 п.о.; правый столбец - инбредная линия с инсерцией 7 п.о. в соответствии с вариантом осуществления изобретения.

Фигура 2: Общий выход сухого вещества (ОВСВ) в dt/ha четырех гибридов кукурузы No-Ins1, No-Ins2, Ins1 и Ins2. No-Ins1 и No-Ins2 не имеют инсерции в гене F35H. Ins1 и Ins2 гетерозиготны по инсерции из 7 пар оснований в гене F35H в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения.

Фигура 3: Общий выход сухого вещества (ОВСВ) относительно контрольного среднего значения (rcm) в процентах у четырех гибридов кукурузы No-Ins1, No-Ins2, Ins1 и Ins2. No-Ins1 и No-Ins2 не имеют инсерции в гене F35H. Ins1 и Ins2 гетерозиготны по инсерции

из 7 пар оснований в гене F35H в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Прежде чем описать настоящую систему и способ изобретения, следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретными описанными системами, способами или их комбинациями, поскольку такие системы, способы и комбинации могут, разумеется, варьироваться. Также, следует понимать, что терминология, используемая в этом документе, не является исчерпывающей, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Использованные в этом документе формы единственного числа включают как единственное, так и множественное число, если из контекста явно не следует иное.

Термины "включающий", "включающий в себя" и "состоящий из", используемые в настоящем документе, являются синонимами слов "содержащий", "содержащий в себе" или "имеющий", "имеющий в своем составе", и являются либо исчерпывающими, либо открытыми и не исключают дополнительные, не указанные члены, элементы или фазы. Следует понимать, что термины "включающий", "включает" и "состоит из", используемые в настоящем документе, включают в себя термины "содержащий", "содержащий в себе" или "имеющий", "имеющий в своем составе", а также термины "содержащий по существу", "включающий по существу" и "имеющий по существу".

Указание числовых диапазонов с конечными точками включает все числа и дроби, входящие в соответствующие диапазоны, а также указанные конечные точки.

Термин "примерно" или "приблизительно", используемый в этом документе при применении к измеряемой величине, такой как параметр, количество, временная продолжительность и тому подобное, подразумевает вариации $\pm 20\%$ или меньше - $\pm 10\%$, или еще меньше - $\pm 5\%$, вплоть до $\pm 1\%$ или еще меньше от указанной величины, в той мере, в какой такие вариации подходят для осуществления раскрытого изобретения. Следует понимать, что значение, к которому относится модификатор "примерно" или "приблизительно" само по себе также конкретно и предпочтительно раскрыто.

В то время, как термины "один или несколько" или "хотя бы один" являются понятными сами по себе в буквальном значении как один или несколько или хотя бы один член

(члены) группы, посредством дальнейшего примера, отметим что этот термин охватывает, среди прочего, и ссылку на любой один из указанных членов или на любые два или несколько указанных членов, например, на ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 или ≥ 7 и т. д. указанных членов, и так, вплоть до всех указанных членов.

Все ссылки, приведенные в настоящем документе, включены в нее в полном объеме. В частности, идеи всех источников, включены в настоящий документ путем отсылки на них.

Если не определено иное, все термины, используемые при раскрытии изобретения, включая технические и научные термины, имеют общепринятое значение для специалистов в области, к которой относится данное изобретение. Для того, чтобы лучше понять суть этого изобретения, в текст, для более подробного объяснения, дополнительно включены определения терминов.

К стандартным справочным изданиям, в которых изложены общие принципы технологии рекомбинантных ДНК, относятся: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (с периодическими обновлениями) ("Ausubel et al. 1992"); серия Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990; PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995); Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, a Laboratory Manual; and Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1987). Общие принципы микробиологии изложены, например, в работах Davis, B. D. et al., Microbiology, 3rd edition, Harper & Row, publishers, Philadelphia, Pa. (1980).

В следующих абзацах, различные аспекты изобретения определены более подробно. Каждый, определенный таким образом аспект, может сочетаться с любым другим аспектом или аспектами, если четко не указано обратное. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или полезный, может сочетаться с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительные или полезные.

Ссылка в данном документе на "один вариант осуществления" или "вариант осуществления" означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с вариантом осуществления, включены по меньшей мере в один вариант осуществления настоящего изобретения. Таким образом, фразы "в одном

варианте осуществления" или "в одном из вариантов осуществления", встречающиеся в разных местах данного описания, необязательно, но могут относиться к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены в одном или нескольких вариантах осуществления изобретения любым подходящим способом, понятным специалисту в данной области из настоящего описания и раскрытия изобретения. Кроме того, в то время как некоторые варианты осуществления изобретения, описанные в настоящем документе, включают одни, но не другие признаки, включенные в другие варианты осуществления, подразумевается, что комбинации признаков из разных вариантов осуществления изобретения должны быть в границах настоящего изобретения и образовывать разные варианты его осуществления, понятные специалистам в данной области техники. Например, в прилагаемой формуле изобретения любой из заявленных вариантов осуществления может быть использован в любой комбинации.

В дальнейшем подробном описании изобретения, делается ссылка на сопроводительные чертежи (фигуры), которые являются частью описания и показаны лишь с целью иллюстрации конкретных вариантов осуществления изобретения. Следует понимать, что могут быть использованы другие варианты осуществления изобретения, а также могут быть внесены структурные или логические изменения без отклонения от объема этого изобретения. Таким образом, дальнейшее подробное описание не следует рассматривать в ограничительном смысле, а объем этого изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения.

Ниже изложены предпочтительные пункты (признаки) и варианты осуществления этого изобретения. Каждое из определенных таким образом пунктов и вариантов осуществления изобретения могут сочетаться с любыми другими пунктами и/или вариантами осуществления изобретения, если четко не указано обратное. В частности, любой признак, указанный как желательный или предпочтительный, может сочетаться с любым другим признаком или признаками или утверждениями, указанными как желательные или предпочтительные.

Термин "кукуруза", используемый в данном документе относится к растению вида *Zea mays*, предпочтительно *Zea mays ssp mays*.

Термин "растение" относится к целому растению, его потомкам или потомству. Термин "часть растения" подразумевает любую часть или производное растения, включая конкретные растительные ткани или структуры, растительные клетки, незрелый или

зрелый зародыш, соцветие, каллус, протопласт, растительную клетку или культуру ткани, из которой можно регенерировать растения, каллусы и пучки растений и растительные клетки, которые в растениях или их частях являются неповрежденными, такие как семена, зерна, початки, цветы, семядоли, листья, стебли, почки, корни, кончики корней, вегетативная масса и тому подобное. Под частями растений могут подразумеваться и обработанные части растений или их производные, включая цветы, масла, экстракты и т.п. В некоторых вариантах осуществления изобретения растительная часть или производное растения, упомянутые в настоящем документе, представляет собой вегетативную массу. В некоторых вариантах осуществления изобретения растительная часть или производное растения, упомянутые в настоящем документе, представляет собой семя или часть семени.

В настоящем документе термин "популяция растений" можно использовать как взаимозаменяемый с термином "группа растений". Популяция растений предпочтительно состоит из множества отдельных растений, например по меньшей мере из 10, например из 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90, но, предпочтительно, по меньшей мере из 100, например, из 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 или 900, более предпочтительно, по меньшей мере из 1000, например, минимум из 10000 или минимум из 100000.

Термин "вегетативная масса", используемый в настоящем документе, имеет обычное значение, известное в данной области техники. Необходимо дополнительно разъяснить, без ограничений, что вегетативная масса может включать, состоять или по существу состоять из листьев и стеблей полевых культур, таких как кукуруза, которые обычно остаются на поле после уборки зерна. Вегетативная масса может также включать початки (например, центральную сердцевину плода кукурузы без зерен). Вегетативная масса может также не включать початки. В состав вегетативной массы также может входить листообразная обертка (например, листовая внешняя оболочка початка кукурузы). Вегетативная масса может также не включать листообразную обертку. Вегетативная масса похожа на солому - остатки, остающиеся после уборки зрелых зерновых или трав для получения семян. Ею можно непосредственно кормить скот или сушить для использования в качестве корма. Вегетативная масса могут использоваться в качестве корма, независимо от того, скармливается ли она на поле, измельчается как силос, чтобы затем использовать в качестве корма, или собирается для прямого (несилосованного) использования в качестве корма. В более холодных регионах кукурузу обычно заготавливают впрок, но в тропиках ее можно собирать круглый год и скармливать

животным в виде зеленого корма. При использовании силоса, обычно, все растение (зерно и вегетативная масса, вместе) измельчается на части, которые затем раздавливаются между валками во время уборки. Помимо стеблей, листьев, листообразной обертки и початков, оставшихся на поле, после уборки урожая может, также оставаться и зерно. Такое зерно вместе с кукурузными початками служит дополнительным источником корма для пасущегося скота.

В некоторых вариантах осуществления изобретения часть растения или производное растения включает в себя, состоит или состоит по существу из одного или нескольких, предпочтительно всех стеблей, листьев и початков. В некоторых вариантах осуществления изобретения часть растения или производное растения представляет собой листья. В некоторых вариантах осуществления изобретения часть растения или производное растения представляет собой стебли. В некоторых вариантах осуществления изобретения часть растения или производное растения представляет собой початок. В некоторых вариантах осуществления изобретения часть растения или производное растения включает, состоит или состоит по существу из одного или нескольких, предпочтительно, всех стеблей и листьев. В некоторых вариантах осуществления изобретения часть растения или производное растения включает, состоит или состоит по существу из одного или нескольких, предпочтительно всех стеблей и початков. В некоторых вариантах осуществления изобретения часть растения или производное растения включает, состоит или состоит по существу из одного или нескольких, предпочтительно всех листьев и початков. В некоторых вариантах осуществления изобретения часть растения или производное растения не является (функциональным) материалом для размножения, таким как зародышевая плазма, семя, зародыш растения или другой материал, из которого можно регенерировать растение. В некоторых вариантах осуществления изобретения часть растения или производное растения не включает (функциональные) мужские и женские репродуктивные органы. В некоторых вариантах осуществления изобретения часть растения или производное растения представляет собой или включает материал для размножения, но материал для размножения, который не используется или не может быть использован (больше) для производства или создания новых растений, например, материал для размножения, который был химически, механически или иным образом лишен функциональности, например, путем термической обработки, кислотной обработки, уплотнения, дробления, измельчения, силосования и т.д.

Используемый в настоящем документе термин "переваримость" означает и измеряется как процентное содержание продукта (например, растения кукурузы, части растения или производного растения, включая, например, сухое вещество, органическое вещество или клеточную стенку продукта), поглощенного в пищеварительном тракте животного (Barrière et al. 2003). Для определения переваримости кукурузы и других кормовых культур были разработаны биологические и химические методы (Van Soest et al. 1963). Нейтрально-детергентная клетчатка (НДК), остающаяся после удаления растворимого содержимого клеток, является важным индикатором клеточной стенки растений и целлюлозы. Переваримость НДК (нейтрально-детергентной клетчатки) кормов *in vitro* (IVNDFD) - это оценка переваримости клеточной стенки, предполагающая, что часть растительного материала, не содержащая НДК (нейтрально-детергентной клетчатки), полностью переваривается (Méchin et al. 2000). Кроме того, сообщалось об использовании БИК-спектроскопии для точного измерения признаков переваримости у многих кормовых культур, включая кукурузу (Lübberstedt et al. 1997a, b; Zimmer et al. 1990). В некоторых вариантах осуществления изобретения животное является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления изобретения животное является жвачным. В некоторых вариантах осуществления изобретения животное является травоядным. В некоторых вариантах осуществления изобретения животное является травоядным млекопитающим.

Используемый в данном документе термин "улучшенная переваримость", относится к повышенной переваримости растения или части растения, например, стебля, или производного растения, имеющего признак согласно изобретению, например, полинуклеотид, мутацию, маркер, SNP (однонуклеотидный полиморфизм) или QTL, описанные в данном документе, по сравнению с растением или частью растения или производным растения, не имеющим такого признака, например, эталонным растением (или частью растения). В некоторых вариантах осуществления изобретения улучшенная или повышенная переваримость (вегетативной массы) означает увеличение средней переваримости нейтрально-детергентной клетчатки (ПНДК) по меньшей мере на 1%, то есть, минимум на 2%, минимум на 3%, минимум на 4%, минимум на 5%, минимум на 6%, минимум на 7%, минимум на 8%, минимум на 9% или минимум на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 2%, более предпочтительно по меньшей мере на 3%, например, минимум на 4%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 5%, например, минимум на 10%. В некоторых вариантах осуществления изобретения эталонное растение (или часть растения) представляет собой инбредную линию

кукурузы PH207, описанную в "Draft Assembly of Elite Inbred Line PH207 Provides Insights into Genomic and Transcriptome Diversity in Maize", Hirsch et al., Plant Cell. 2016 Nov; 28(11): 2700-2714, published online 2016 Nov 1. doi: 10.1105/tpc.16.00353, или (близкую) изогенную линию, которая не включает полинуклеотид, мутацию, маркер, SNP (однонуклеотидный полиморфизм) или QTL изобретения, описанные в данном документе. Специалисту понятно, что когда речь идет о части растения, отличной от вегетативной массы, такой как, например, семя, то когда упоминается улучшенная переваримость вегетативной массы, следует понимать, что это относится к вегетативной массе растения, от которого получена такая часть растения. Например, ссылка на семя, имеющее "улучшенную переваримость вегетативной массы", относится к вегетативной массе растения, из которого получено семя, и/или к вегетативной массе растения, выращенного из семени, предпочтительно, хотя бы к вегетативной массе растения, выращенного из семени.

Термин "локус" (локусы во множественном числе) означает конкретное место или места, или участок на хромосоме, где, например, обнаружен QTL, ген или генетический маркер. Используемый в настоящем документе термин "локус количественных признаков" или "QTL" имеет обычное значение, известное в данной области техники. Необходимо дополнительно указать, и без ограничения, что QTL может относиться к области ДНК, которая связана с дифференциальным выражением количественного фенотипического признака по меньшей мере в одном генетическом фоне, например, по меньшей мере в одной селекционной популяции. Область QTL охватывает или тесно связана с геном или генами, которые влияют на рассматриваемый признак. "Аллель QTL" может включать множество генов или других генетических факторов в пределах смежного геномного участка или группы сцепления, такой как, гаплотип. Аллель QTL может обозначать гаплотип в пределах определенного окна, где указанное окно представляет собой смежный геномный участок, который может быть определен и отслежен с помощью набора одного или нескольких мономорфных и/или полиморфных маркеров. Гаплотип может быть определен уникальным отпечатком аллелей на каждом маркере в пределах указанного окна. QTL может кодировать один или несколько аллелей, которые влияют на выраженность непрерывно распределенного (количественного) фенотипа. В некоторых вариантах осуществления изобретения QTL, полинуклеотид, маркер и т.д. изобретения, описанные в данном документе, могут быть гомозиготными. В некоторых вариантах осуществления изобретения QTL, полинуклеотид, маркер и т.д. изобретения, описанные в данном документе, могут быть гетерозиготными.

Используемый в настоящем документе термин "аллель" или "аллели" относится к одной или нескольким альтернативным формам локуса, т.е. различным нуклеотидным последовательностям.

Используемый в настоящем документе термин "мутантные аллели" или "мутация" аллелей указывает на аллели, имеющие одну или несколько мутаций, таких как инсерции, делеции, стоп-кодоны, изменения оснований (например, транзиции или трансверсии) или изменения в местах сплайсинга/сигнальных сайтах сплайсинга, которые могут приводить или не приводить к изменению генных продуктов. Модификации в аллелях могут возникать в кодирующих или не кодирующих участках (например, в промоторных участках, экзонах, интронах или соединениях при сплайсинге).

Используемые в настоящем документе термины "интрогрессия", "интрогрессированный" и "интрогрессирующий" относятся как к естественному, так и к искусственному процессу, в результате которого хромосомные фрагменты или гены одного вида, сорта или культивара перемещаются в геном другого вида, сорта или культивара путем скрещивания этих видов. Процесс необязательно может быть завершен обратным скрещиванием с рекуррентным родителем. Например, интрогрессия желаемого аллеля в определенном локусе может быть передана по меньшей мере одному потомку при половом скрещивании двух родительских форм одного вида, где по меньшей мере одна из родительских форм имеет желаемый аллель в своем геноме. Альтернативно, например, трансмиссия аллеля может происходить путем рекомбинации между двумя донорскими геномами, например, в слитом протопласте, где по крайней мере один из донорских протопластов имеет в своем геноме желаемый аллель. Желаемый аллель может быть, например, обнаружен с помощью маркера, связанного с фенотипом, в QTL, трансгене или т.п. В любом случае, потомство, содержащее желаемый аллель, может быть неоднократно скрещено с линией, имеющей желаемый генетический фон и отобрано для получения желаемого аллеля, в результате чего аллель закрепляется в выбранном генетическом фоне. "Фрагмент интрогрессии" или "сегмент интрогрессии" или "участок интрогрессии" относится к фрагменту хромосомы (или к части, или к участку хромосомы), который был введен в другое растение того же вида или родственного вида искусственным или естественным путем, например, путем скрещивания или путем традиционных методов селекции, таких как обратное скрещивание, т.е. интрогрессированный фрагмент является результатом методов селекции, обозначаемых глаголом "интрогрессировать" (например, обратно скрещивать).

Следует понимать, что термин "фрагмент интрогрессии" никогда не включает целую хромосому, а только часть хромосомы. Фрагмент интрогрессии может быть большим, например, даже в три четверти или в половину хромосомы, но желательно, чтобы он был меньшим, например, приблизительно 50 Мб или еще меньшим, например, приблизительно 30 Мб или еще меньшим, приблизительно 20 Мб или еще меньшим, приблизительно 25 Мб или еще меньшим, приблизительно 10 Мб или еще меньшим, приблизительно 9 Мб или еще меньшим, приблизительно 8 Мб или еще меньшим, приблизительно 7 Мб или еще меньшим, приблизительно 6 Мб или еще меньшим, приблизительно 5 Мб или еще меньшим, приблизительно 4 Мб или еще меньшим, приблизительно 3 Мб или еще меньшим, приблизительно 2.5 Мб или 2 Мб или еще меньшим, приблизительно 1 Мб (что равняется 1 000 000 пар оснований) или еще меньшим, или приблизительно 0,5 Мб (что равняется 500 000 пар оснований) или еще меньшим, например, приблизительно 200 000 пар оснований (что равняется 200 килопарам оснований) или еще меньшим, приблизительно 100 000 пар оснований (100 кб) или еще меньшим, приблизительно 50 000 пар оснований (50 кб) или еще меньшим, приблизительно 25 000 пар оснований (25 кб) или еще меньшим.

Генетический элемент, локус, фрагмент интрогрессии, QTL, или ген или аллель, наделяющий признаком (например, улучшенной переваримостью), считается "полученным" или "полученным из", или "производным от", или "получаемым из" или "выведенным из" или "обнаруженным в" растении или части растения, описанном в данном документе, если он может быть перенесен из растения, в котором он присутствует, в другое растение, в котором он не присутствует (например, линию или сорт) с использованием традиционных методов селекции не приводя к фенотипическим изменениям растения-реципиента, за исключением добавления признака, наделяемого генетическим элементом, локусом, фрагментом интрогрессии, QTL, геном или аллелем. Данные термины используются как взаимозаменяемые, и генетический элемент, локус, фрагмент интрогрессии, QTL, ген или аллель могут быть перенесены в любой другой генетический фон, не имеющий данного признака. Можно использовать не только растения, содержащие генетический элемент, локус, фрагмент интрогрессии, QTL, ген или аллель, но и потомство/потомков таких растений, которые были отобраны для сохранения генетического элемента, локуса, фрагмента интрогрессии, QTL, гена или аллеля, и охватываются настоящим документом. Специалист может определить, содержит ли растение (или геномная ДНК, клетка или ткань растения) тот же генетический элемент, локус, фрагмент интрогрессии, QTL, ген или аллель, который

можно получить из такого растения, используя один или несколько методов, известных в данной области, таких как фенотипические анализы, секвенирование всего генома, анализ молекулярных маркеров, картирование признаков, окрашивание хромосом, тесты на аллелизм и тому подобное, или с помощью комбинации методов. Следует понимать, что также могут быть охвачены, трансгенные растения или растения, подвергнутые генному редактированию.

В настоящем документе, термины "генная инженерия", "трансформация" и "генетическая или трансгенная модификация" используются как синонимы для обозначения переноса выделенных и клонированных генов в ДНК, обычно в хромосомную ДНК или геном другого организма.

"Внедрение", в значении настоящего изобретения, включает стабильную или переходную интеграцию посредством трансформации, включая трансформацию, опосредованную *Agrobacterium*, трансфекцию, микроинъекцию, бомбардирование, инсерцию с использованием технологии редактирования генов, такой как системы CRISPR (напр. CRISPR/Cas, в частности CRISPR/Cas9 или CRISPR/Cas12), CRISPR/CasX или CRISPR/CasY), TALENs, нуклеазы цинковых пальцев или мегануклеазы, гомологичную рекомбинацию на выбор, с помощью одной из нижеуказанных технологий редактирования генов, включая предпочтительно репарационную матрицу, модификации эндогенного гена с помощью случайного или направленного мутагенеза, например TILLING или вышеуказанных технологий редактирования генов, и т.д.

Термины "трансгенные" или "генетически модифицированные организмы" (ГМО), используемые в настоящем документе обозначают организмы, генетический материал которых был изменен с помощью методов, известных как "технология рекомбинантной ДНК". Технология рекомбинантной ДНК включает в себя способность объединять молекулы ДНК из разных источников в одну молекулу *ex vivo* (например, в пробирке). Данная терминология, как правило, не охватывает организмы, генетический состав которых был изменен путем обычного скрещивания или селекции "мутагенезом", поскольку эти методы появились до открытия технологий рекомбинантной ДНК. Термин "нетрансгенные", используемый в настоящем документе, относится к растениям и пищевым продуктам, полученным из растений, которые не являются "трансгенными" или "генетически модифицированными организмами", определенными выше.

"Трансген" или "экзоген" обозначает генетический локус, включающий последовательность ДНК, например, рекомбинантный ген, который был введен в геном растения путем трансформации, например, трансформации, опосредствованной *Agrobacterium*. Растение, содержащее трансген, стабильно интегрированный в его геном, называется "трансгенным растением". "Эндоген" обозначает молекулу нуклеиновой кислоты или генетический локус, естественным образом присутствующий в геноме растения.

"Редактирование генов" или "редактирование генома" относится к генной инженерии, при которой ДНК или РНК вставляются, удаляются, модифицируются или заменяются в геноме организма. Редактирование генов может включать целенаправленный или нецеленаправленный (случайный) мутагенез. Целенаправленный мутагенез может быть осуществлен, например, с помощью дизайнерских нуклеаз, таких как мегануклеазы, нуклеазы цинковых пальцев (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), и системы коротких палиндромных повторов, расположенных группами, равномерно удаленными друг от друга (CRISPR/Cas). Эти нуклеазы создают сайт-специфические двуцепочечные разрывы (DSBs) в нужных местах генома. Индуцированные двухцепочечные разрывы восстанавливаются посредством негомологичного соединения концов (NHEJ), гомологичной рекомбинации (HR) или гомологично направленной репарации (HDR), что приводит к целевым мутациям или модификациям нуклеиновых кислот. Использование дизайнерских нуклеаз особенно подходит для генерирования нокаутов или нокдаунов генов. В некоторых вариантах осуществления изобретения разработаны дизайнерские нуклеазы, которые специфически вызывают мутацию в гене F35H, описанном в данном документе, например, для создания мутированного F35H или нокаута гена F35H. В некоторых вариантах осуществления изобретения дизайнерские нуклеазы, в частности РНК-специфические CRISPR/Cas системы, разработаны таким образом, что они специфически нацелены на мРНК F35H, например, с целью расщепления мРНК F35H и создания нокдауна гена/мРНК/белка F35H. Системы доставки и экспрессии дизайнерских нуклеаз хорошо известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, нуклеаза или целенаправленная/сайт-специфическая/хоуминг нуклеаза представляет собой, включает, состоит по существу или состоит из (модифицированной) системы или комплекса CRISPR/Cas, (модифицированного) белка Cas, (модифицированного) цинкового пальца,

(модифицированной) нуклеазы цинкового пальца (ZFN), (модифицированного) эффектора подобного активаторам транскрипции (TALE), (модифицированной) эффекторной нуклеазы подобной активаторам транскрипции (TALEN) или (модифицированной) мегануклеазы. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная (модифицированная) нуклеаза или целенаправленная/сайт-специфическая/хоуминг нуклеаза представляет собой, включает, состоит по существу из или состоит из (модифицированной) РНК-направляемой нуклеазы. Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеазы могут быть оптимизированы по кодонам для экспрессии в растения. Используемый в настоящем документе термин "нацеливание" на выбранную последовательность нуклеиновой кислоты означает, что нуклеаза или комплекс нуклеаз действуют специфическим для нуклеотидной последовательности образом. Например, в контексте системы CRISPR/Cas, гидовая РНК способна гибридизироваться с выбранной последовательностью нуклеиновой кислоты. В данном документе термин "гибридизация" обозначает реакцию, в которой один или несколько полинуклеотидов вступают в реакцию с образованием комплекса, стабилизированного за счет водородной связи между основаниями нуклеотидных остатков. Водородная связь может возникать путем спаривания баз по Уотсону-Крику, связывания по Хугстину или любым другим способом, специфичным для последовательности. Комплекс может состоять из двух цепей, образующих дуплексную структуру, трех или более цепей, образующих мультицепочечный комплекс, одиночной самогибридирующейся цепи или любой их комбинации. Реакция гибридизации может представлять собой один из этапов более обширного процесса, такого как инициация PGR или расщепление полинуклеотида ферментом. Последовательность, способная гибридизироваться с данной последовательностью, называется "комплементом" данной последовательности.

Редактирование генов может включать преходящую, индуцибельную или конститутивную экспрессию компонентов или систем редактирования генов. Редактирование генов может включать геномную интеграцию или эпизомальное присутствие компонентов или систем редактирования генов. Компоненты или системы редактирования генов могут быть представлены на векторах, таких как плазмиды, которые могут быть доставлены с помощью соответствующих средств доставки, известных в данной области. Предпочтительными векторами являются экспрессионные векторы.

Редактирование генов может включать в себя предоставление матриц для рекомбинации с целью осуществления гомологически направленной репарации (HDR). Например, генетический элемент может быть заменен путем редактирования генов, при котором предоставляется матрица для рекомбинации. ДНК может быть разрезана выше и/или ниже последовательности, которую необходимо заменить. Таким образом, последовательность, которую необходимо заменить, вырезается из ДНК. С помощью гомологически направленной репарации (HDR), вырезанная последовательность заменяется матрицей. В некоторых вариантах осуществления изобретения аллель QTL, описанный в настоящем документе, может быть предоставлен на матрице/в качестве матрицы. Сконструировав систему таким образом, что двухцепочечные разрывы вводятся выше и ниже соответствующего участка в геноме растения, не содержащего аллель QTL, этот участок вырезается и может быть заменен матрицей, содержащей аллель QTL данного изобретения. Таким образом, введение аллеля QTL изобретения в растение необязательно должно включать многократное обратное скрещивание, в частности, с растением, имеющим определенный генетический фон. Аналогично, мутированный F35H изобретения может быть предоставлен на матрице/в качестве матрицы. Более предпочтительно, однако, чтобы мутированный F35H изобретения был получен без использования матриц для рекомбинации, а исключительно за счет действия эндонуклеазы, приводящего к двухцепочечному разрыву ДНК, которая восстанавливается нехомологичным соединением концов (NHEJ), что приводит к образованию инсерционно-делеционных полиморфизмов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация или мутация нуклеиновой кислоты осуществляется с помощью (модифицированной) эффекторной нуклеазы подобной активаторам транскрипции (TALEN). Эффекторы подобные активаторам транскрипции (TALE), могут быть сконструированы таким образом, чтобы связывать практически любую желаемую последовательность ДНК. Примерные методы редактирования генома с помощью системы TALEN можно найти, например, в работах Cermak T. Doyle EL. Christian M. Wang L. Zhang Y. Schmidt C, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* 2011;39:e82; Zhang F. Cong L. Lodato S. Kosuri S. Church GM. Arlotta P. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol.* 2011;29:149–153 и патентах США № 8,450,471, 8,440,431 и 8,440,432, которые все специально включены в настоящий документ посредством ссылки. Необходимо дополнительно, без ограничения указать, что встречающиеся в природе

эффекторы подобные активаторам транскрипции (TALE) или "эффекторы подобные активаторам транскрипции (TALE) дикого типа" представляют собой белки, связывающие нуклеиновую кислоту, секретируемые многочисленными видами протеобактерий. Полипептиды TALE содержат домен связывания нуклеиновой кислоты, состоящий из tandemных повторов высококонсервативных мономерных полипептидов, длина которых преимущественно составляет 33, 34 или 35 аминокислот и которые отличаются друг от друга в основном в аминокислотных положениях 12 и 13. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. Используемый в данном документе, термин "полипептидные мономеры" или "мономеры TALE" будет использоваться для обозначения высококонсервативных повторяющихся полипептидных последовательностей внутри домена связывания нуклеиновой кислоты TALE, а термин "повторяющиеся переменные di-остатки" или "RVD" будет использоваться для обозначения высоко переменных аминокислот в положениях 12 и 13 полипептидных мономеров. Указанные во всем раскрытии изобретения аминокислотные повторяющиеся переменные di-остатки (RVD) указываются с использованием однобуквенного кода аминокислот ИЮПАК. Общее представление мономера TALE, входящего в состав ДНК-связывающего домена, выглядит следующим образом: X1-11-(X12X13)-X14-33 или 34 или 35, где подстрочный индекс указывает на положение аминокислоты, а X представляет любую аминокислоту. X12X13 обозначает повторяющиеся переменные di-остатки (RVD). В некоторых полипептидных мономерах, переменная аминокислота в положении 13 не встречается или отсутствует, и в таких полипептидных мономерах, повторяющийся переменный di-остаток (RVD) состоит из одной аминокислоты. В таких случаях, RVD может быть альтернативно представлен как X*, где X представляет собой X12, а (*) указывает на отсутствие X13. ДНК-связывающий домен включает несколько повторов мономеров TALE, и это может быть представлено как (X1-11-(X12X13)-X14-33 или 34 или 35)_z, где в предпочтительном варианте осуществления изобретения, z составляет по меньшей мере от 5 до 40. В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения, z составляет по меньшей мере от 10 до 26. Мономеры TALE имеют аффинитет к связыванию нуклеотидов, который определяется идентичностью аминокислот в их RVD. Например, полипептидные мономеры с RVD NI предпочтительно связываются с аденином (A), полипептидные мономеры с RVD NG предпочтительно связываются с тиминем (T), полипептидные мономеры с RVD HD предпочтительно связываются с цитозином (C) и полипептидные мономеры с RVD NN

предпочтительно связываются как с аденином (A), так и с гуанином (G). В еще одном варианте осуществления изобретения, полипептидные мономеры с RVD IG предпочтительно связываются с Т. Таким образом, количество и порядок повторов полипептидных мономеров в домене связывания нуклеиновой кислоты TALE определяет его специфичность для нуклеиновой кислоты-мишени. В других вариантах осуществления изобретения, полипептидные мономеры с RVD NS распознают все четыре пары оснований и могут связываться с А, Т, G или С. Структура и функции TALE дополнительно описаны, например, в работах Moscou et al., *Science* 326:1501 (2009); Boch et al., *Science* 326:1509-1512 (2009); и Zhang et al., *Nature Biotechnology* 29:149-153 (2011), каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в ее полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация или мутация нуклеиновой кислоты осуществляется с помощью (модифицированной) системы нуклеазы цинкового пальца (ZFN). Система ZFN использует искусственные ферменты рестрикции, созданные путем слияния ДНК-связывающего домена цинкового пальца с ДНК-расщепляющим доменом, которые могут быть сконструированы для целенаправленного воздействия на желаемые последовательности ДНК. Примерные методы редактирования генома с использованием нуклеазы цинкового пальца (ZFN) можно найти, например, в патентах США №. 6,534,261, 6,607,882, 6,746,838, 6,794,136, 6,824,978, 6,866,997, 6,933,113, 6,979,539, 7,013,219, 7,030,215, 7,220,719, 7, 241 573, 7 241 574, 7 585 849, 7 595 376, 6 903 185 и 6 479 626, которые специально включены в настоящий документ посредством ссылки на них. Необходимо дополнительно указать, и без ограничения, что технология искусственных цинковых пальцев (ZF) включает массивы ZF- модулей для нацеливания на новые ДНК-связывающие сайты в геноме. Каждый модуль пальца в массиве ZF нацелен на три основания ДНК. Индивидуальный массив отдельных доменов цинковых пальцев собирается в белок ZF (ZFP). Белки с цинковыми пальцами (ZFP) могут включать в себя функциональный домен. Первые синтетические нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN) были созданы путем слияния белка с цинковыми пальцами с каталитическим доменом фермента рестрикции FokI типа IIS. (Kim, Y. G. et al., 1994, Chimeric restriction endonuclease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 883–887; Kim, Y. G. et al., 1996, Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 1156–1160). Повышенная специфичность расщепления может быть достигнута при снижении активности вне мишени за счет использования парных гетеродимеров ZFN, каждый из которых нацелен

на разные нуклеотидные последовательности, разделенные коротким спейсером. (Doyon, Y. et al., 2011, Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. Nat. Methods 8, 74-79). Белки с цинковыми пальцами (ZFP) также могут быть сконструированы как активаторы и репрессоры транскрипции и используются для нацеливания на многие гены в самых разных организмах.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация нуклеиновой кислоты осуществляется с помощью (модифицированной) мегануклеазы, которая представляет собой эндодезоксирибонуклеазу, характеризующуюся большим сайтом узнавания (двухцепочечные последовательности ДНК от 12 до 40 пар оснований). Примерный метод использования мегануклеаз можно найти в патентах США №: 8,163,514; 8,133,697; 8,021,867; 8,119,361; 8,119,381; 8,124,369; и 8,129,134, которые специально включены в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация нуклеиновой кислоты осуществляется с помощью (модифицированного) комплекса или системы CRISPR/Cas. Что касается общей информации о CRISPR/Cas системах, их компонентах и доставке таких компонентов, включая методы, материалы, средства доставки, векторы, частицы, их изготовление и применение, в том числе в отношении количеств и составов, а также Cas9CRISPR/Cas-экспрессирующих эукариотических клеток, Cas-9 CRISPR/Cas-экспрессирующих эукариот, таких как мышь, предоставляется ссылка на: Патенты США №: 8,999,641, 8,993,233, 8,697,359, 8,771,945, 8,795,965, 8,865,406, 8,871,445, 8,889,356, 8,889,418, 8,895,308, 8,906,616, 8,932,814, 8,945,839, 8,993,233 и 8,999,641; Патентные публикации США US 2014-0310830 (US App. Ser. No. 14/105,031), US 2014-0287938 A1 (U.S. App. Ser. No. 14/213,991), US 2014-0273234 A1 (U.S. App. Ser. No. 14/293,674), US2014-0273232 A1 (U.S. App. Ser. No. 14/290,575), US 2014-0273231 (U.S. App. Ser. No. 14/259,420), US 2014-0256046 A1 (U.S. App. Ser. No. 14/226,274), US 2014-0248702 A1 (U.S. App. Ser. No. 14/258,458), US 2014-0242700 A1 (U.S. App. Ser. No. 14/222,930), US 2014-0242699 A1 (U.S. App. Ser. No. 14/183,512), US 2014-0242664 A1 (U.S. App. Ser. No. 14/104,990), US 2014-0234972 A1 (U.S. App. Ser. No. 14/183,471), US 2014-0227787 A1 (U.S. App. Ser. No. 14/256,912), US 2014-0189896 A1 (U.S. App. Ser. No. 14/105,035), US 2014-0186958 (U.S. App. Ser. No. 14/105,017), US 2014-0186919 A1 (U.S. App. Ser. No. 14/104,977), US 2014-0186843 A1 (U.S. App. Ser. No. 14/104,900), US 2014-0179770 A1 (U.S. App. Ser. No. 14/104,837) и US 2014-0179006 A1 (U.S. App. Ser. No. 14/183,486), US 2014-0170753 (US App Ser No 14/183,429); US 2015-0184139 (U.S. App. Ser. No.

14/324,960); 14/054,414 Европейские патентные заявки EP 2 771 468 (EP13818570.7), EP 2 764 103 (EP13824232.6), и EP 2 784 162 (EP14170383.5); и Патентные публикации PCT WO 2014/093661 (PCT/US2013/074743), WO 2014/093694 (PCT/US2013/074790), WO 2014/093595 (PCT/US2013/074611), WO 2014/093718 (PCT/US2013/074825), WO 2014/093709 (PCT/US2013/074812), WO 2014/093622 (PCT/US2013/074667), WO 2014/093635 (PCT/US2013/074691), WO 2014/093655 (PCT/US2013/074736), WO 2014/093712 (PCT/US2013/074819), WO 2014/093701 (PCT/US2013/074800), WO 2014/018423 (PCT/US2013/051418), WO 2014/204723 (PCT/US2014/041790), WO 2014/204724 (PCT/US2014/041800), WO 2014/204725 (PCT/US2014/041803), WO 2014/204726 (PCT/US2014/041804), WO 2014/204727 (PCT/US2014/041806), WO 2014/204728 (PCT/US2014/041808), WO 2014/204729 (PCT/US2014/041809), WO 2015/089351 (PCT/US2014/069897), WO 2015/089354 (PCT/US2014/069902), WO 2015/089364 (PCT/US2014/069925), WO 2015/089427 (PCT/US2014/070068), WO 2015/089462 (PCT/US2014/070127), WO 2015/089419 (PCT/US2014/070057), WO 2015/089465 (PCT/US2014/070135), WO 2015/089486 (PCT/US2014/070175), PCT/US2015/051691, PCT/US2015/051830. Ссылки, также делаются на предварительные патентные заявки США 61/758,468; 61/802,174; 61/806,375; 61/814,263; 61/819,803 та 61/828,130, поданные 30 января 2013 года; 15 марта 2013 года; 28 марта 2013 года; 20 апреля 2013 года; 6 мая 2013 года и 28 мая 2013 года соответственно. Также, делается ссылка на предварительную патентную заявку США 61/836,123, поданую 17 июня 2013 года. Дополнительно делается ссылка на предварительные патентные заявки США 61/835,931, 61/835,936, 61/835,973, 61/836,080, 61/836,101 и 61/836,127, каждая из которых подана 17 июня 2013 года. Далее делается ссылка на предварительные патентные заявки США 61/862,468 и 61/862,355, поданные 5 августа 2013 года; 61/871,301, поданую 28 августа 2013 года; 61/960,777, поданую 25 сентября 2013 года и 61/961,980, поданую 28 октября 2013 года. Ниже приведены некоторые из них: PCT/US2014/62558, поданая 28 октября 2014 года, а также предварительные патентные заявки США с серийными номерами 61/915,148, 61/915,150, 61/915,153, 61/915,203, 61/915,251, 61/915,301, 61/915,267, 61/915,260 и 61/915,397, каждая из которых подана 12 декабря 2013 года; 61/757,972 и 61/768,959, поданные 29 января 2013 года и 25 февраля 2013 года; 62/010,888 и 62/010,879, обе поданные 11 июня 2014 года 62/010 329, 62/010 439 и 62/010 441, каждая из которых подана 10 июня 2014 года; 61/939 228 и 61/939 242, каждая из которых подана 12 февраля 2014 года; 61/980 012, поданая 15 апреля 2014 года; 62/038 358, поданая 17 августа 2014 года; 62/055 484, 62/055 460 и 62/055 487, каждая из которых

подана 25 сентября 2014 года; и 62/069 243, поданая 27 октября 2014 года. Ссылка делается на заявку РСТ, указывающую, в частности, на США, заявку № РСТ/US14/41806, поданую 10 июня 2014 года. Ссылка делается на предварительную патентную заявку США 61/930,214, поданую 22 января 2014 года. Ссылка делается на заявку РСТ, указывающую, кроме прочего, на США, заявку № РСТ/US14/41806, поданую 10 июня 2014 года. Также делается ссылка на заявку США 62/180,709 от 17 июня 2015 года PROTECTED GUIDE RNAS (PGRNAS); заявку США 62/091,455 от 12 декабря 2014 года PROTECTED GUIDE RNAS (PGRNAS); заявку США 62/096,708 от 24 декабря 2014 года PROTECTED GUIDE RNAS (PGRNAS); заявку США 62/091,462 от 12 декабря 2014 года, 62/096,324 от 23 декабря 2014 года, 62/180,681 от 17 июня 2015 года и 62/237,496 от 5 октября 2015 года DEAD GUIDES FOR CRISPR TRANSCRIPTION FACTORS; заявку США 62/091,456 от 12 декабря 2014 года и 62/180,692 от 17 июня 2015 года ESCORTED AND FUNCTIONALIZED GUIDES FOR CRISPR-CAS SYSTEMS; заявку США 62/091,461 от 12 декабря 2014 года DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR GENOME EDITING AS TO HEMATOPOETIC STEM CELLS (HSCs); заявку США 62/094,903 от 19 декабря 2014 года UNBIASED IDENTIFICATION OF DOUBLE-STRAND BREAKS AND GENOMIC REARRANGEMENT BY GENOME-WISE INSERT CAPTURE SEQUENCING; заявку США 62/096,761 от 24 декабря 2014 года ENGINEERING OF SYSTEMS, METHODS AND OPTIMIZED ENZYME AND GUIDE SCAFFOLDS FOR SEQUENCE MANIPULATION; заявки США 62/098,059 от 30 декабря 2014 года, 62/181,641 от 18 июня 2015 года, и 62/181,667 от 18 июня 2015 года, RNA-TARGETING SYSTEM; заявки США 62/096,656 от 24 декабря 2014 года и 62/181,151 от 17 июня 2015 года CRISPR HAVING OR ASSOCIATED WITH DESTABILIZATION DOMAINS; заявку США 62/096,697 от 24 декабря 2014 года CRISPR HAVING OR ASSOCIATED WITH AAV; заявку США 62/098,158 от 30 декабря 2014 года, ENGINEERED CRISPR COMPLEX INSERTIONAL TARGETING SYSTEMS; заявку США 62/151,052 от 22 апреля 2015 года CELLULAR TARGETING FOR EXTRACELLULAR EXOSOMAL REPORTING; заявку США 62/054,490 от 24 сентября 2014 года DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING DISORDERS AND DISEASES USING PARTICLE DELIVERY COMPONENTS; заявку США 61/939,154 от 12 февраля 2014 года SYSTEMS, METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR-CAS SYSTEMS; заявку

СИИА 62/055,484 от 25 сентября 2014 года SYSTEMS, METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR-CAS SYSTEMS; заявку СИИА 62/087,537 от 4 декабря 2014 года SYSTEMS, METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR-CAS SYSTEMS; заявку СИИА 62/054,651 от 24 сентября 2014 года DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR MODELING COMPETITION OF MULTIPLE CANCER MUTATIONS IN VIVO; заявку СИИА 62/067,886 от 23 октября 2014 года DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR MODELING COMPETITION OF MULTIPLE CANCER MUTATIONS IN VIVO; заявки СИИА 62/054,675 от 24 сентября 2014 года и 62/181,002 от 17 июня 2015 года DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS IN NEURONAL CELLS/TISSUES; заявку СИИА 62/054,528 от 24 сентября 2014 года DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS IN IMMUNE DISEASES OR DISORDERS; заявку СИИА 62/055,454 от 25 сентября 2014 года DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING DISORDERS AND DISEASES USING CELL PENETRATION PEPTIDES (CPP); заявку СИИА 62/055,460 от 25 сентября 2014 года MULTIFUNCTIONAL-CRISPR COMPLEXES AND/OR OPTIMIZED ENZYME LINKED FUNCTIONAL-CRISPR COMPLEXES; заявки СИИА 62/087,475 от 4 декабря 2014 года и 62/181,690 от 18 июня 2015 года FUNCTIONAL SCREENING WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR-CAS SYSTEMS; заявку СИИА 62/055,487 от 25 сентября 2014 года FUNCTIONAL SCREENING WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR-CAS SYSTEMS; заявки СИИА 62/087,546 от 4 декабря 2014 года и 62/181,687 от 18 июня 2015 года MULTIFUNCTIONAL CRISPR COMPLEXES AND/OR OPTIMIZED ENZYME LINKED FUNCTIONAL-CRISPR COMPLEXES; и заявку СИИА 62/098,285 от 30 декабря 2014 года, CRISPR MEDIATED IN VIVO MODELING AND GENETIC SCREENING OF TUMOR GROWTH AND METASTASIS. Делается ссылка на заявки СИИА 62/181,659 от 18 января 2015 года и 62/207,318 от 19 августа 2015 года ENGINEERING AND OPTIMIZATION OF SYSTEMS, METHODS, ENZYME AND GUIDE SCAFFOLDS OF CAS9 ORTHOLOGS AND VARIANTS FOR SEQUENCE MANIPULATION. Делается ссылка на заявки СИИА 62/181,663 от 18 января 2015 года и 62/245,264 от 22 октября 2015 года NOVEL CRISPR ENZYMES AND SYSTEMS, заявку

США 62/181,675 от 18 января 2015 года, и адвокатское досье №. 46783.01.2128, поданное 22 октября 2015 года NOVEL CRISPR ENZYMES AND SYSTEMS, заявку США 62/232,067 от 24 сентября 2015 года, заявку США 62/205,733 от 16 августа 2015 года, заявку США 62/201,542 от 5 августа 2015 года, заявку США 62/193,507 от 16 июля 2015 года, и заявку США 62/181,739 от 18 июня 2015 года, каждую под названием NOVEL CRISPR ENZYMES AND SYSTEMS и заявку США 62/245,270 от 22 октября 2015 года NOVEL CRISPR ENZYMES AND SYSTEMS. Также делается ссылка на заявки США 61/939,256 от 12 февраля 2014 года, и WO 2015/089473 (PCT/US2014/070152) от 12 декабря 2014 года, каждая под названием ENGINEERING OF SYSTEMS, METHODS AND OPTIMIZED GUIDE COMPOSITIONS WITH NEW ARCHITECTURES FOR SEQUENCE MANIPULATION. Также, делается ссылка на PCT/US2015/045504 от 15 августа 2015 года, заявку США 62/180,699 от 17 июня 2015 года и заявку США 62/038,358 от 17 августа 2014 года, каждую под названием GENOME EDITING USING CAS9 NICKASES. Европейская патентная заявка EP3009511. Далее, в тексте ссылка делается на Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., & Zhang, F. Science Feb 15;339(6121):819-23 (2013); RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F, Marraffini LA. Nat Biotechnol Mar;31(3):233-9 (2013); One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. Wang H., Yang H., Shivalila CS., Dawlaty MM., Cheng AW., Zhang F., Jaenisch R. Cell May 9;153(4):910-8 (2013); Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Hsu PD, Heidenreich M, Cong L, Platt RJ, Scott DA, Church GM, Zhang F. Nature. 2013 Aug 22;500(7463):472-6. doi: 10.1038/Nature12466. Epub 2013 Aug 23; Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. Ran, FA., Hsu, PD., Lin, CY., Gootenberg, JS., Konermann, S., Trevino, AE., Scott, DA., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., & Zhang, F. Cell Aug 28. pii: S0092-8674(13)01015-5. (2013); DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Hsu, P., Scott, D., Weinstein, J., Ran, FA., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E., Wu, X., Shalem, O., Cradick, TJ., Marraffini, LA., Bao, G., & Zhang, F. Nat Biotechnol doi:10.1038/nbt.2647 (2013); Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Ran, FA., Hsu, PD., Wright, J., Agarwala, V., Scott, DA., Zhang, F. Nature Protocols Nov;8(11):2281-308. (2013); Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. Shalem, O., Sanjana, NE., Hartenian, E., Shi, X., Scott, DA., Mikkelsen, T., Heckl, D., Ebert, BL., Root, DE., Doench, JG., Zhang, F. Science

Dec 12. (2013). [Epub ahead of print]; Crystal structure of cas9 in complex with guide RNA and target DNA. Nishimasu, H., Ran, FA., Hsu, PD., Konermann, S., Shehata, SI., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., Nureki, O. Cell Feb 27. (2014). 156(5):935-49; Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. Wu X., Scott DA., Kriz AJ., Chiu AC., Hsu PD., Dadon DB., Cheng AW., Trevino AE., Konermann S., Chen S., Jaenisch R., Zhang F., Sharp PA. Nat Biotechnol. (2014) Apr 20. doi: 10.1038/nbt.2889; CRISPR-Cas9 Knockin Mice for Genome Editing and Cancer Modeling, Platt et al., Cell 159(2): 440-455 (2014) DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.014; Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering, Hsu et al, Cell 157, 1262-1278 (June 5, 2014) (Hsu 2014); Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system, Wang et al., Science. 2014 January 3; 343(6166): 80–84. doi:10.1126/science.1246981; Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation, Doench et al., Nature Biotechnology 32(12):1262-7 (2014) опубликовано online 3 Сентября 2014 года; doi:10.1038/nbt.3026, and In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9, Swiech et al, Nature Biotechnology 33, 102–106 (2015) опубликовано online 19 Октября 2014 года; doi:10.1038/nbt.3055, Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System, Zetsche et al., Cell 163, 1-13 (2015); Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems, Shmakov et al., Mol Cell 60(3): 385-397 (2015); C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector, Abudayyeh et al, Science (2016) опубликовано online 2 июня 2016 года doi: 10.1126/science.aaf5573. Каждая из этих публикаций, патентов, патентных публикаций и заявок, а также все документы, цитируемые в них или в ходе их рассмотрения ("цитируемые документы"), и все документы, цитируемые или упоминаемые в цитируемых документах, вместе с любыми инструкциями, описаниями, спецификациями продукции и товарными листами для любых продуктов, упомянутых в них или в любом документе, включенном в них и включенном в них путем ссылки, настоящим включены в данный документ путем ссылки и могут быть использованы в практике изобретения. Все документы (например, эти патенты, патентные публикации и заявки, а также процитированные документы) включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый отдельный документ был специально и индивидуально указан как включенный посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения система или комплекс CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR/Cas класса 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная CRISPR/Cas система или комплекс представляет

собой CRISPR/Cas систему или комплекс типа II, типа V или типа VI. Система CRISPR/Cas не требует создания специальных белков, нацеленных на конкретные последовательности, скорее один белок Cas может быть запрограммирован гидовой РНК (гРНК) на распознавание конкретной нуклеиновой кислоты-мишени, другими словами, ферментный белок Cas может быть рекрутирован в конкретный локус-мишень нуклеиновой кислоты (который может включать или состоять из РНК и/или ДНК), представляющий интерес, с помощью указанной короткой гидовой РНК.

В целом, CRISPR/Cas или CRISPR-система, в контексте, в котором используется в настоящих документах, относится к транскриптам и другим элементам, участвующим в экспрессии или направляющим активность CRISPR-ассоциированных ("Cas") генов, включая последовательности, кодирующие Cas-ген и одну или несколько из tracr (транс-активирующих CRISPR) последовательностей (например, tracrRNA или активную частичную tracrRNA), tracr-mate последовательность (охватывающую "прямой повтор" и обработанный tracrРНК частичный прямой повтор в контексте эндогенной системы CRISPR), направляющую последовательность (также называемую "спейсером" в контексте эндогенной системы CRISPR), или "РНК(ы)", в контексте, в котором этот термин используется в настоящем документе (например, РНК(ы) для направления Cas, например Cas9, например, CRISPR РНК и, где это применимо, трансактивирующую (tracr) РНК или одиночную направляющую РНК (sgRNA) (химерную РНК)) или другие последовательности и транскрипты из CRISPR-локуса. В целом, CRISPR-система характеризуется элементами, которые способствуют образованию CRISPR-комплекса в сайте последовательности-мишени (также называемой протоспейсером в контексте эндогенной CRISPR-системы). В контексте образования CRISPR-комплекса, "последовательность-мишень" относится к последовательности, к которой разработана комплементарная направляющая последовательность, где гибридизация между последовательностью-мишенью и направляющей последовательностью способствует образованию CRISPR-комплекса. Последовательность-мишень может включать любой полинуклеотид, например, полинуклеотиды ДНК или РНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК представляет собой химерную гидовую РНК или одиночную гидовую РНК (sgRNA). В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК включает в себя направляющую последовательность и tracr mate последовательность (или прямой повтор). В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК состоит из направляющей последовательности, tracr

mate последовательности (или прямого повтора) и tracr последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения система или комплекс CRISPR/Cas, описанные в настоящем документе, не включают tracr последовательность и/или не зависят от присутствия tracr последовательности (например, если белок Cas представляет собой Cpf1).

Используемые в настоящем документе, термины "CRISPR РНК" (crRNA), или "гидовая РНК" (gRNA), или "одиночная гидовая РНК" (sgRNA) или "один или несколько компонентов нуклеиновой кислоты" эффекторного белка локуса CRISPR/Cas, в зависимости от случая, включает любую полинуклеотидную последовательность, обладающую достаточной степенью комплементарности с последовательностью нуклеиновой кислоты - мишени для гибридизации с последовательностью нуклеиновой кислоты - мишени и направленного специфического связывания комплекса нуклеиновой кислоты - мишени с последовательностью нуклеиновой кислоты - мишени. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности при оптимальном выравнивании, с использованием подходящего алгоритма выравнивания, составляет около или более 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или еще больше. Оптимальное выравнивание может быть определено с помощью любого подходящего алгоритма выравнивания последовательностей, неограничивающий пример которого включает алгоритм Смита-Ватермана, алгоритм Нидлмана-Вунша, алгоритмы, основанные на преобразовании Барроуза-Уиллера (напр, Burrows Wheeler Aligner), ClustalW, Clustal X, BLAT, Novoalign (Novocraft Technologies; доступно на www.novocraft.com), ELAND (Illumina, San Diego, CA), SOAP (доступно на soap.genomics.org.cn) и Maq (доступно на maq.sourceforge.net). Способность направляющей последовательности (в составе гидовой РНК, нацеленной на нуклеиновую кислоту) направлять специфическое для последовательности связывание комплекса нуклеиновой кислоты-мишени с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени может быть оценена с помощью любого подходящего анализа.

Направляющая последовательность и, следовательно, гидовая РНК, нацеленная на нуклеиновую кислоту, может быть выбрана для нацеливания на любую последовательность-мишень нуклеиновой кислоты. Последовательностью-мишенью может быть ДНК. Последовательностью-мишенью может быть геномная ДНК. Последовательностью-мишенью может быть митохондриальная ДНК. Последовательностью-мишенью может быть любая последовательность РНК. В

некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность-мишень может быть последовательностью в молекуле РНК, выбранной из группы, состоящей из матричной РНК (мРНК), пре-мРНК, рибосомной РНК (рРНК), транспортной РНК (тРНК), микро-РНК (miRNA), малой интерферирующей РНК (siRNA), малой ядерной РНК (snRNA), малой ядрышковой РНК (мяРНК, snoRNA), двуцепочечной РНК (dsRNA), некодирующей РНК (ncRNA), длинной некодирующей РНК (lncRNA) и scRNA. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень может быть последовательностью в молекуле РНК, выбранной из группы, состоящей из мРНК, пре-мРНК и рРНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень может быть последовательностью в молекуле РНК, выбранной из группы, состоящей из ncRNA и lncRNA. В некоторых более предпочтительных вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень может быть последовательностью внутри молекулы мРНК или молекулы пре-мРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК состоит из шпильки, предпочтительно одной шпильки. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность прямого повтора образует шпильку, предпочтительно одну шпильку. В некоторых вариантах осуществления изобретения длина спейсера гидовой РНК составляет от 15 до 35 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения длина спейсера гидовой РНК составляет не менее 15 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения длина спейсера составляет от 15 до 17 нуклеотидов, например, 15, 16 или 17 нуклеотидов, от 17 до 20 нуклеотидов, например, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов, от 20 до 24 нуклеотидов, например, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида, от 23 до 25 нуклеотидов, например, 23, 24 или 25 нуклеотидов, от 24 до 27 нуклеотидов, например, 24, 25, 26 или 27 нуклеотидов, от 27-30 нуклеотидов, например, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов, от 30-35 нуклеотидов, например, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 нуклеотидов, или 35 нуклеотидов, или больше. В конкретных вариантах осуществления изобретения, система CRISPR/Cas требует наличия tracrRNA. Последовательность "tracrRNA" или аналогичные термины включают любую полинуклеотидную последовательность, которая обладает достаточной комплементарностью с последовательностью crRNA для гибридизации. В некоторых вариантах осуществления изобретения степень комплементарности между последовательностью tracrRNA и последовательностью crRNA по длине более короткой из них, при оптимальном выравнивании, составляет около или больше 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%,

95%, 97,5%, 99%, или еще больше. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность tracr имеет длину около или больше 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50 нуклеотидов, или длину в еще больше нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность tracr и последовательность гРНК содержатся в одном транскрипте, так что гибридизация между ними приводит к образованию транскрипта, имеющего вторичную структуру, такую как шпилька. В одном из вариантов осуществления изобретения, транскрипт или транскрибируемая полинуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере две или более шпильки. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, транскрипт имеет две, три, четыре или пять шпилек. В другом варианте осуществления изобретения, транскрипт имеет не более пяти шпилек. В шпильчатой структуре часть последовательности 5' конечной "N" и в направлении противоположном направлению транскрипции петли может соответствовать последовательности tracr mate, а часть последовательности 3' от петли тогда соответствует последовательности tracr. В шпильчатой структуре часть последовательности 5' концевой "N" и в направлении противоположном направлению транскрипции петли может альтернативно соответствовать последовательности tracr, а часть последовательности 3' от петли соответствует последовательности tracr mate. В альтернативных вариантах осуществления изобретения, система CRISPR/Cas не требует tracrRNA, как известно специалисту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовая РНК (способная направлять Cas к локусу-мишени) может включать (1) направляющую последовательность, способную гибридизироваться с локусом-мишенью, и (2) tracr mate или последовательность прямого повтора (в ориентации 5' - 3' или, альтернативно, в ориентации 3' - 5', в зависимости от типа белка Cas, как известно специалисту). В конкретных вариантах осуществления изобретения, CRISPR/Cas белок характеризуется тем, что он может использовать гидовую РНК, включающую направляющую последовательность, способную гибридизироваться с локусом-мишенью, и последовательность прямого повтора, и не требует наличия tracrRNA. В конкретных вариантах осуществления изобретения, когда CRISPR/Cas белок характеризуется тем, что он может использовать tracrRNA, направляющая последовательность, tracr mate и tracr последовательность могут находиться в одной РНК, т.е. sgRNA (в ориентации 5' - 3' или, альтернативно, в ориентации 3' - 5'), или tracrRNA может быть другой РНК, отличной от РНК, содержащей направляющую последовательность и tracr mate

последовательность. В этих вариантах осуществления изобретения, tracr гибридуется с tracr mate последовательностью и направляет комплекс CRISPR/Cas к последовательности-мишени.

Обычно в контексте эндогенной системы нацеливания на нуклеиновую кислоту, образование комплекса нацеливания на нуклеиновую кислоту (включающего гидовую РНК, гибридованную с последовательностью-мишенью и соединенную с одним или несколькими эффекторными белками, нацеленными на нуклеиновую кислоту) приводит к модификации (например, расщеплению) одной или обеих нитей ДНК или РНК в последовательности-мишени или вблизи нее (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 или более пар оснований). Используемый в настоящем документе термин "последовательность (последовательности), связанная (связанные) с интересующим локусом-мишенью" относится к последовательностям, находящимся вблизи последовательности-мишени (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 или более пар оснований от последовательности-мишени, при чем последовательность-мишень находится в интересующем локусе-мишени). Специалисту будут известны специфические сайты разрезания для выбранных CRISPR/Cas систем относительно последовательности-мишени, которые, как известно в данной области, могут находиться внутри последовательности-мишени или, альтернативно, 3' или 5' последовательности-мишени.

В некоторых вариантах осуществления изобретения немодифицированный эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, может обладать активностью по расщеплению нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза, описанная в настоящем документе, может направлять расщепление одной или обеих нитей нуклеиновой кислоты (ДНК, РНК или гибридов, которые могут быть одно- или двухцепочечными) в месте расположения последовательности-мишени или вблизи нее, например, внутри последовательности-мишени и/или в комплементе последовательности-мишени или в последовательностях, связанных с последовательностью-мишенью. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, может направлять расщепление одной или обеих нитей ДНК или РНК в пределах примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 500 или более пар оснований от первого или последнего нуклеотида последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепление может образовывать тупые концы (например,

для Cas9, таких как SaCas9 или SpCas9). В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепление может быть ступенчатым (например, для Cpf1), т.е. генерировать липкие концы. В некоторых вариантах осуществления расщепление представляет собой ступенчатый разрез с 5'-выступающими концами. В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепление представляет собой ступенчатый разрез с 5' выступающими концами из 1 - 5 нуклеотидов, предпочтительно из 4 или 5 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт расщепления находится по направлению против хода транскрипции от РАМ (мотива смежного с протоспейсером). В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт расщепления находится по направлению хода транскрипции от РАМ (мотива смежного с протоспейсером). В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, может быть мутирован по отношению к соответствующему ферменту дикого типа таким образом, что мутированный эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, лишается способности расщеплять одну или обе нити ДНК или РНК полинуклеотида-мишени, содержащего последовательность-мишень. В качестве еще одного примера, два или несколько каталитических доменов белка Cas (например, RuvC I, RuvC II и RuvC III или HNH-домен белка Cas9) могут быть мутированы для получения мутированного белка Cas, практически лишённого всей активности по расщеплению ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, может считаться в значительной степени лишённым всей активности расщепления ДНК и/или РНК, если активность расщепления мутированного фермента составляет не более 25%, 10%, 5%, 1%, 0,1%, 0,01% или менее от активности расщепления нуклеиновой кислоты немутированной формы фермента; примером может быть ситуация, когда активность расщепления нуклеиновой кислоты мутированной формы равна нулю или ничтожна по сравнению с немутированной формой. Используемый в настоящем документе термин "модифицированный" Cas обычно относится к белку Cas, имеющему одну или несколько модификаций или мутаций (включая точечные мутации, усечения, инсерции, делеции, химеры, слитые белки и т.д.) по сравнению с белком Cas дикого типа, из которого он получен. Под термином "полученный" (или "производный") подразумевается, что полученный фермент в значительной степени основан (в смысле имеет высокую степень) на гомологии последовательности с ферментом дикого типа, но что он был мутирован (модифицирован) каким-либо образом, известным в данной области техники или описанным в настоящем документе.

В конкретном варианте осуществления изобретения, мутированный эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, основанный на системе CRISPR, описанной выше, который не способен расщеплять одну или обе нити ДНК или РНК полинуклеотида, содержащего последовательность-мишень, может быть соединен с другими инструментами, такими как другие нуклеазы, никазы, рекомбиназы, транспозазы, редакторы оснований или молекулярные комплексы, включающие эти инструменты. Термин "редактор оснований", используемый в настоящем документе, означает белок или его фрагмент, обладающий такой же каталитической активностью, как и белок, из которого он получен, и этот белок или его фрагмент, сам по себе или в виде молекулярного комплекса, называемого в настоящем документе комплексом редактирования оснований, обладает способностью опосредовать целевую модификацию основания, т.е. преобразование интересующего основания, приводящее к интересующей точечной мутации. Предпочтительно, по меньшей мере один редактор оснований, в контексте настоящего изобретения, временно или постоянно связан по меньшей мере с одним сайт-специфическим эффектором или, необязательно, с компонентом по меньшей мере одного сайт-специфического эффекторного комплекса (например, доменом распознавания ДНК системы CRISPR, цинковым пальцем или TAL-эффекторами). Связь может быть ковалентной и/или нековалентной.

В многочисленных публикациях показано целенаправленное преобразование оснований, в первую очередь цитидина (С) в тимин (Т), с помощью CRISPR/Cas9 никазы или нефункциональной нуклеазы, связанной с доменом цитидиндеаминазы, APOBEC1, например, APOBEC, полученным от крысы. Деаминирование цитозина (С) катализируется цитидиндеаминазами и приводит к образованию урацила (U), который обладает свойствами сопряжения оснований тимина (Т). Большинство известных цитидиндеаминаз работают с РНК, а те немногие примеры, которые способны работать с ДНК, требуют одноцепочечной (ss) ДНК. Исследования комплекса dCas9-target DNA показали, что при образовании комплекса Cas9-guide RNA-DNA 'R-loop' по меньшей мере девять нуклеотидов (н.о.) перемещенной нити ДНК не спарены (Jore et al., Nat. Struct. Mol. Biol., 18, 529-536 (2011)). Действительно, в структуре комплекса Cas9 R-петля, первые 11 н.о. протоспейсера на смещенной нити ДНК неупорядочены, что позволяет предположить, что их перемещение не сильно ограничено. Также было высказано предположение, что вызываемые никазой Cas9 мутации цитозинов в нешаблонной нити могут возникать из-за их доступности для клеточных ферментов цитозиндеаминазы. Было предположено, что подгруппа этого участка одноцепочечной ДНК в R-петле может

служить эффективным субстратом для dCas9-связанной цитидиндезаминазы для прямого программируемого преобразования C в U в ДНК (Komor et al., supra). Недавно, Goudelli et al ((2017). Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage *Nature*, 557(7681), 464.) описали редакторы адениновых оснований (ABEs), которые опосредуют преобразование A-T в G-C в геномной ДНК.

Таким образом, любой комплекс редактирования оснований, согласно настоящему изобретению, может включать по меньшей мере одну цитидиндезаминазу или ее каталитически активный фрагмент. По меньшей мере один комплекс редактирования оснований может включать цитидиндеаминазу или ее домен в виде каталитически активного фрагмента в качестве редактора оснований.

В другом варианте осуществления изобретения, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания представляет собой преобразование любого нуклеотида C, A, T или G в любой другой нуклеотид. Любой из нуклеотидов C, A, T или G может быть заменен сайт-направленным способом, опосредованным редактором оснований или его каталитически активным фрагментом, на другой нуклеотид. Таким образом, по меньшей мере один комплекс редактирования оснований может включать любой редактор оснований, или домен редактора оснований, или его каталитически активный фрагмент, который может целенаправленно преобразовывать интересующий нуклеотид в любой другой интересующий нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность-мишень должна быть связана с PAM (мотивом смежным с протоспейсером) или PFS; то есть, короткой последовательностью, распознаваемой комплексом CRISPR. Точные требования к последовательности и длине PAM зависят от используемого фермента CRISPR, но, обычно, PAM-ы представляют собой последовательности из 2-5 пар оснований, примыкающие к протоспейсеру (то есть последовательности-мишени). Примеры последовательностей PAM приведены в разделе примеров ниже, и специалист сможет определить другие последовательности PAM для использования с конкретным ферментом CRISPR. Кроме того, инженерия домена PAM Interacting (PI) может позволить программировать специфичность PAM, улучшить точность распознавания сайта-мишени и повысить универсальность Cas, например, Cas9, платформы геномной инженерии. Cas-белки, такие как белки Cas9, могут быть сконструированы таким образом, чтобы изменить их специфичность PAM, например, как описано в труде Kleinstiver BP et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*. 2015 Jul 23;523(7561):481-5. doi: 10.1038/nature14592. В

некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает предоставление возможности комплексу CRISPR связываться с полинуклеотидом-мишенью для осуществления расщепления указанного полинуклеотида-мишени, тем самым модифицируя этот полинуклеотид-мишень, причем комплекс CRISPR включает фермент CRISPR связанный с направляющей последовательностью, гибридной с последовательностью-мишенью в указанном полинуклеотиде-мишени, причем указанная направляющая последовательность связана с последовательностью *tracr mate*, которая в свою очередь гибридизуется с последовательностью *tracr*. Специалисту понятно, что другие белки Cas могут быть модифицированы аналогичным образом.

Белок Cas, упомянутый в настоящем документе, например, без ограничения, такой как Cas9, Cpf1 (Cas12a), C2c1 (Cas12b), C2c2 (Cas13a), C2c3, Cas13b, может происходить из любого подходящего источника, и, следовательно, может включать различные ортологи, происходящие из различных (прокариотических) организмов, как хорошо известно в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения белок Cas представляет собой (модифицированный) Cas9, предпочтительно (модифицированный) *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9) или (модифицированный) *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9). В некоторых вариантах осуществления изобретения Cas-белок представляет собой (модифицированный) Cpf1, предпочтительно *Acidaminococcus* sp., например, *Acidaminococcus* sp. BV3L6 Cpf1 (AsCpf1) или *Lachnospiraceae* bacterium Cpf1, например, *Lachnospiraceae* bacterium MA2020 или *Lachnospiraceae* bacterium MD2006 (LbCpf1). В некоторых вариантах осуществления изобретения Cas-белок представляет собой (модифицированный) C2c2, предпочтительно *Leptotrichia wadei* C2c2 (LwC2c2) или *Listeria newyorkensis* FSL M6-0635 C2c2 (LbFSLC2c2). В некоторых вариантах осуществления изобретения (модифицированный) Cas-белок представляет собой C2c1. В некоторых вариантах осуществления изобретения (модифицированный) Cas-белок представляет собой C2c3. В некоторых вариантах осуществления изобретения (модифицированный) белок Cas представляет собой Cas13b.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация нуклеиновой кислоты осуществляется путем случайного мутагенеза. Клетки или организмы могут подвергаться воздействию мутагенов, таких как УФ-излучение или мутагенные химические вещества (например, этилметансульфонат (EMS)), после чего отбираются мутанты с желаемыми характеристиками. Мутанты могут быть идентифицированы, например, методом TILLING (от англ. Targeting Induced Local Lesions in Genomes). Этот

метод сочетает в себе мутагенез, например, мутагенез с использованием химического мутагена, такого как этилметансульфонат (EMS), с чувствительной техникой скрининга ДНК, которая выявляет мутации одного основания/точечные мутации в гене-мишени. Метод TILLING основан на образовании гетеродуплексов ДНК, которые образуются при амплификации нескольких аллелей методом ПЦР, а затем нагреваются и медленно охлаждаются. В месте несовпадения двух нитей ДНК образуется "пузырек", который затем расщепляется одноцепочечной нуклеазой. Затем продукты разделяют по размеру, например, с помощью ВЭЖХ. См. также McCallum et al. "Targeted screening for induced mutations"; Nat Biotechnol. 2000 Apr;18(4):455-7 и McCallum et al. "Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics"; Plant Physiol. 2000 Jun;123(2):439-42.

РНК-интерференция (RNAi) - это биологический процесс, в котором молекулы РНК подавляют экспрессию или трансляцию генов, нейтрализуя целевые молекулы мРНК. Два типа малых молекул рибонуклеиновой кислоты (РНК) - микроРНК (miRNA) и малые интерферирующие РНК (siRNA) - занимают центральное место в РНК-интерференции. РНК являются непосредственными продуктами генов, и эти малые РНК могут связываться с другими специфическими молекулами матричной РНК (мРНК) и либо увеличивать, либо уменьшать их активность, например, препятствуя переводу мРНК в белок. Путь RNAi существует у многих эукариот, включая животных, и запускается ферментом Dicer, который расщепляет длинные молекулы двухцепочечной РНК (dsRNA) на короткие двухцепочечные фрагменты длиной около 21 нуклеотида, siRNA (малые интерферирующие РНК). Каждая малая интерферирующая РНК (siRNA) расплетается на две одноцепочечные РНК (ssRNA), направляющую цепочку и цепочку-спутницу. Цепочка-спутница деградирует, а направляющая цепочка включается в РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (RISC). Зрелые микроРНК структурно похожи на малые интерферирующие РНК, образующиеся из экзогенной двухцепочечной РНК, но прежде чем достичь зрелости, микроРНК должны сначала пройти обширную посттранскрипционную модификацию. МикроРНК экспрессируется из гораздо более длинного РНК-кодирующего гена в виде первичного транскрипта, известного как примикроРНК, который в ядре клетки обрабатывается микропроцессорным комплексом до 70-нуклеотидной шпильчатой структуры, называемой пре-микроРНК. Этот комплекс состоит из фермента, РНКазы III, под названием Drosha и dsRNA(дцПНК)-связывающего белка DGCR8. Часть двухцепочечной (дц) РНК этой пре-микроРНК связывается и расщепляется ферментом Dicer, в результате чего образуется зрелая молекула микроРНК,

которая может быть интегрирована в комплекс RISC; таким образом, микроРНК и малая интерферирующая РНК (siRNA) имеют один и тот же клеточный механизм в направлении по ходу транскрипции. Короткая шпилечная РНК или малая шпилечная РНК (shRNA/Hairpin Vector) - это искусственная молекула РНК с тугим поворотом шпильки, которая может быть использована для заглушения экспрессии гена-мишени с помощью РНК-интерференции. Наиболее хорошо изученным результатом является посттранскрипционное глушение генов, которое происходит, когда направляющая цепочка спаривается с комплементарной последовательностью в молекуле матричной РНК и вызывает расщепление посредством Argonaute 2 (Ago2), каталитического компонента RISC. Упоминаемая в настоящем документе, молекула РНК-интерференции может быть малой интерферирующей РНК (siRNA), малой шпилечной РНК (shRNA) или микроРНК. Следует понимать, что молекулы РНК-интерференции могут вводиться как таковые в растение или могут быть кодированы соответствующими векторами, из которых экспрессируется молекула РНК-интерференции. Системы доставки и экспрессии молекул РНК-интерференции, таких как малые интерферирующие РНК (siRNAs), малые шпилечные РНК (shRNAs) или микро РНК (miRNAs), хорошо известны в данной области.

Используемый в настоящем документе термин "гомозигота" относится к отдельной клетке или растению, имеющим одинаковые аллели в одном или нескольких или во всех локусах. Когда этот термин используется в отношении конкретного локуса или гена, он означает, что по меньшей мере этот локус или ген имеет одинаковые аллели. Используемый в настоящем документе термин "гомозиготный" означает генетическое состояние, когда одинаковые аллели находятся в соответствующих локусах на гомологичных хромосомах. Используемый в настоящем документе термин "гетерозигота" относится к отдельной клетке или растению, имеющим различные аллели в одном или нескольких или во всех локусах. Когда этот термин используется в отношении конкретного локуса или гена, он означает, что по меньшей мере этот локус или ген имеет различные аллели. Используемый в настоящем документе термин "гетерозиготный" означает генетическое состояние, когда различные аллели находятся в соответствующих локусах на гомологичных хромосомах. В некоторых вариантах осуществления изобретения QTL и/или один или несколько маркеров, описанных в настоящем документе, являются гомозиготными. В некоторых вариантах осуществления изобретения QTL и/или один или несколько маркеров, описанных в настоящем документе, являются гетерозиготными. В некоторых вариантах осуществления

изобретения аллель QTL, полинуклеотид и/или аллель(и) одного или нескольких маркеров, описанные в настоящем документе, являются гомозиготными. В некоторых вариантах осуществления изобретения аллель QTL, полинуклеотид и/или один или несколько аллелей маркера(ов), описанные в настоящем документе, являются гетерозиготными.

"Маркер" - это средство нахождения позиции на генетической или физической карте, а также сцепления между маркерами и локусами признаков (локусами, влияющими на признаки). Положение, которое обнаруживает маркер, может быть известно благодаря обнаружению полиморфных аллелей и их генетическому картированию, или же благодаря гибридизации, совпадению последовательностей или амплификации последовательности, которая была физически картирована. Маркер может быть ДНК-маркером (выявляет полиморфизмы ДНК), белком (выявляет вариации кодированного полипептида) или просто унаследованным фенотипом (например, "waxy" фенотипом). ДНК-маркер может быть разработан на основе геномной последовательности нуклеотидов или экспрессируемых нуклеотидных последовательностей (например, сплайсированной РНК или кДНК). В зависимости от технологии ДНК-маркера, маркер может состоять из комплементарных праймеров, фланкирующих локус, и/или комплементарных зондов, которые гибридизуются с полиморфными аллелями в локусе. Термин "маркерный локус" означает локус (ген, последовательность или нуклеотид), который обнаруживает маркер. Термин "маркер", "молекулярный маркер" или "маркерный локус" может также использоваться для обозначения последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислоты, которая является достаточно уникальной для характеристики конкретного локуса в геноме. В качестве маркера может быть использован любой обнаруживаемый полиморфный признак, если он наследуется дифференцированно и проявляет неравновесное сцепление с интересующим фенотипическим признаком.

Маркеры, обнаруживающие генетические полиморфизмы между членами популяции, хорошо известны в данной области. Маркеры могут быть определены по типу полиморфизма, который они обнаруживают, а также по маркерной технологии, используемой для обнаружения полиморфизма. Типы маркеров включают, например, выявление полиморфизмов длины рестрикционных фрагментов (RFLP), выявление изоферментных маркеров, случайно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD), полиморфизмов длины амплифицированных фрагментов (AFLPs), выявление простых

повторов последовательности (SSRs), выявление амплифицированных переменных последовательностей генома растений, выявление самоподдерживающейся репликации последовательности или выявление однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs), но не ограничиваются ими. Однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) могут быть обнаружены, например, с помощью секвенирования ДНК; специфичных для последовательности методов амплификации, основанных на ПЦР; обнаружения полинуклеотидных полиморфизмов с помощью аллель-специфической гибридизации (ASH), динамической аллель-специфической гибридизации (DASH); молекулярных маяков; гибридизации микрочипов; анализов олигонуклеотидных лигаз, эндонуклеаз Flap, 5' эндонуклеаз, расширения праймеров (primer extension), полиморфизма конформации однонитевой ДНК (SSCP) или температурного градиентного гелевого электрофореза (TGGE). Преимущество секвенирования ДНК, например, технологии пиросеквенирования, заключается в том, что она позволяет обнаружить ряд сцепленных аллелей однонуклеотидного полиморфизма (SNP), которые образуют гаплотип. Гаплотипы, как правило, более информативны (обнаруживают более высокий уровень полиморфизма), чем однонуклеотидные полиморфизмы.

"(Молекулярный) маркерный аллель", альтернативно "аллель маркерного локуса", может относиться к одной из множества полиморфных нуклеотидных последовательностей, обнаруженных в маркерном локусе в популяции. Что касается SNP-маркера, аллель относится к конкретному нуклеотидному основанию, присутствующему в этом SNP-локусе отдельного растения. В данном документе термин "(Молекулярный) маркерный аллель" может использоваться как взаимозаменяемый с терминами "донорский аллель" или "аллель-донор" и означает (молекулярный) маркерный аллель, связанный с улучшенной переваримостью в соответствии с изобретением, если явно не указано иное.

"Тонкое картирование" относится к способам, с помощью которых положение QTL может быть определено более точно (сужено) и с помощью которых размер фрагмента интрогрессии, включающего QTL, уменьшается. Например, могут быть созданы почти изогенные линии для QTL (QTL-NILs), которые содержат различные, перекрывающиеся фрагменты интрогрессии в пределах однородного генетического фона рекуррентной родительской формы. Такие линии могут быть использованы для картирования фрагмента, на котором расположен QTL, и для идентификации линии с более коротким фрагментом интрогрессии, включающим QTL.

"Маркер-ориентированная селекция" (MAS) - это процесс, в ходе которого отдельные растения отбираются на основе маркерных генотипов. "Маркер-ориентированная контрселекция" - это процесс, при котором маркерные генотипы используются для выявления растений, которые не будут отобраны, что позволяет исключить их из программы селекции или посадки. Маркер-ориентированная селекция использует присутствие молекулярных маркеров, которые генетически связаны с определенным локусом или с определенным участком хромосомы (например, фрагментом интрогрессии, трансгеном, полиморфизмом, мутацией и т.д.), для отбора растений по наличию определенного локуса или участка (фрагмента интрогрессии, трансгена, полиморфизма, мутации и т.д.). Например, молекулярный маркер, генетически связанный с QTL переваримости, определенным в настоящем документе, может быть использован для обнаружения и/или отбора растений, содержащих QTL на хромосоме 9. Чем ближе генетическое сцепление молекулярного маркера с локусом (например, около 7 сМ, 6 сМ, 5 сМ, 4 сМ, 3 сМ, 2 сМ, 1 сМ, 0,5 сМ или меньше), тем меньше вероятность того, что маркер будет отделен от локуса в результате мейотической рекомбинации. Аналогично, чем ближе два маркера связаны друг с другом (например, в пределах 7 сМ или 5 сМ, 4 сМ, 3 сМ, 2 сМ, 1 сМ или меньше), тем меньше вероятность того, что эти два маркера будут отделены друг от друга (и тем больше вероятность того, что они будут косегрегировать как единое целое). "LOD-балл" (логарифм соотношения шансов (основание 10)) – это статистический тест, часто используемый для анализа сцепления в популяциях животных и растений. LOD-балл сравнивает вероятность получения тестовых данных, если два локуса (локус молекулярного маркера и/или локус фенотипического признака) действительно сцеплены, с вероятностью получения тех же данных чисто случайно. Положительные LOD-баллы свидетельствуют о наличии сцепления, а LOD-балл, превышающий 3,0 считается доказательством сцепления. LOD-балл +3, означает вероятность 1000 к 1, что наблюдаемое сцепление возникло не случайно.

Под "маркерным гаплотипом" понимается комбинация аллелей в маркерном локусе.

Маркерный локус" - это определенное место хромосомы в геноме вида, где может быть обнаружен конкретный маркер. Маркерный локус можно использовать для отслеживания присутствия второго сцепленного локуса, например, локуса, влияющего на выражение фенотипического признака. Например, маркерный локус может

использоваться для мониторинга сегрегации аллелей в генетически или физически сцепленном локусе.

«Маркерный зонд» - это последовательность нуклеиновой кислоты или молекула, которая может быть использована для идентификации присутствия маркерного локуса, например, зонд нуклеиновой кислоты, который комплементарен последовательности маркерного локуса посредством гибридизации нуклеиновой кислоты. Для гибридизации нуклеиновых кислот могут использоваться маркерные зонды, включающие 30 или более смежных нуклеотидов маркерного локуса ("все или часть" последовательности маркерного локуса). Альтернативно, в некоторых аспектах, маркерный зонд относится к зонду любого типа, который способен различать (т.е. генотипировать) конкретный аллель, присутствующий в маркерном локусе.

Термин "молекулярный маркер" может использоваться для обозначения генетического маркера или его кодированного продукта (например, белка), используемого в качестве точки отсчета при идентификации сцепленного локуса. Маркер может быть получен из геномных нуклеотидных последовательностей или из экспрессируемых нуклеотидных последовательностей (например, из сплайсированной РНК, кДНК и т.д.), или из кодированного полипептида. Этот термин также относится к последовательностям нуклеиновых кислот, комплементарным маркерным последовательностям или фланкирующим их, например, нуклеиновым кислотам, используемым в качестве зондов или пар праймеров, способных амплифицировать маркерную последовательность. Молекулярный маркерный зонд" - это последовательность нуклеиновой кислоты или молекула, которая может быть использована для идентификации наличия маркерного локуса, например, зонд нуклеиновой кислоты, комплементарный последовательности маркерного локуса. Альтернативно, в некоторых аспектах, маркерный зонд относится к зонду любого типа, который способен различать (т.е. генотипировать) конкретный аллель, присутствующий в маркерном локусе. Нуклеиновые кислоты являются "комплементарными", когда они специфически гибридизуются в растворе, например, в соответствии с правилами парности оснований Уотсона-Крика. Некоторые маркеры, описанные в настоящем документе, также называются маркерами гибридизации, когда они расположены на в инсерционном/делеционном участке, например, в описанном неколлинеарном участке. Это связано с тем, что инсерционный участок, по определению, является полиморфизмом по сравнению с растением без инсерции. Таким образом, маркер должен лишь указывать, присутствует ли инсерционный/делеционный участок

или нет. Для выявления такого маркера гибридизации можно использовать любую соответствующую технологию обнаружения маркеров, например, в приведенных здесь примерах используется SNP-технология.

"Генетические маркеры" - это нуклеиновые кислоты, которые являются полиморфными в популяции и аллели которых можно обнаружить и отличить с помощью одного или нескольких аналитических методов, например, таких как выявление полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP), полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (AFLP), изозима, выявление однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), выявление простых повторов последовательностей (SSR) и тому подобное. Термины "молекулярный маркер" и "генетический маркер" в этом документе используются как взаимозаменяемые. Этот термин также относится к последовательностям нуклеиновых кислот, комплементарных геномным последовательностям, таким как нуклеиновые кислоты, используемые в качестве зондов. Маркеры, соответствующие генетическим полиморфизмам между членами популяции, могут быть обнаружены методами, хорошо известными в данной области. К ним относятся, например, методы амплификации специфические для последовательностей на основе ПЦР, выявление полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP), выявление изоферментных маркеров, выявление полинуклеотидных полиморфизмов путем аллель-специфической гибридизации (ASH), выявление амплифицированных переменных последовательностей генома растений, выявление самоподдерживающейся репликации последовательности, выявление простых повторов последовательностей (SSRs), выявление однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) или выявление полиморфизмов длины амплифицированных фрагментов (AFLPs). Также известны хорошо зарекомендовавшие себя методы обнаружения меток экспрессированных последовательностей (ESTs) и SSR-маркеров, полученных из последовательностей EST и случайно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD).

"Полиморфизм" - это вариации в ДНК двух или более особей в популяции. Предпочтительно, чтобы частота полиморфизма в популяции составляла не менее 1 %. Полезный полиморфизм может включать однонуклеотидный полиморфизм (SNP), простой повтор последовательности (SSR) или инсерционно-делеционный полиморфизм, также называемый в данном документе "InDel". Термин "инсерционно-делеционный полиморфизм" относится к инсерции или делеции, при чем одна линия может по отношению ко второй линии выступать как имеющая вставленный нуклеотид или

участок ДНК, или вторая линия может по отношению к первой линии выступать как имеющая удаленный нуклеотид или участок ДНК.

"Физическое расстояние" между локусами (например, между молекулярными маркерами и/или между фенотипическими маркерами) на одной хромосоме - это собственно физическое расстояние, выраженное в основаниях или парах оснований (п.о., bp), килооснованиях или килопарах оснований (kb) или мегабазах или мегапарах оснований (Mb).

"Генетическое расстояние" между локусами (например, между молекулярными маркерами и/или между фенотипическими маркерами) на одной хромосоме измеряется частотой кроссинговера, или частотой рекомбинации (RF), и указывается в сантиморганидах (сМ). Одна сМ соответствует частоте рекомбинации в 1%. Если рекомбинантов найти не удастся, RF равна нулю, а локусы либо очень близки друг к другу физически, либо идентичны. Чем дальше друг от друга находятся два локуса, тем выше RF.

Физическая карта" генома - это карта, показывающая линейный порядок идентифицируемых ориентиров (включая гены, маркеры и т. д.) на хромосомной ДНК. Однако, в отличие от генетических карт, расстояния между ориентирами являются абсолютными (например, измеряются в парах оснований или изолированных и перекрывающихся смежных генетических фрагментах) и не основаны на генетической рекомбинации (которая может варьировать в разных популяциях).

Аллель "отрицательно" коррелирует с признаком, когда он связан с ним и когда присутствие аллеля является показателем того, что желаемый признак или форма признака не проявится у растения, включающего этот аллель. Аллель "положительно" коррелирует с признаком, когда он связан с ним и когда присутствие аллеля является показателем того, что желаемый признак или форма признака будет проявляться у растения, включающего этот аллель.

Сантиморганида ("сМ") - это единица измерения частоты рекомбинации. Одна сМ равна 1 % вероятности того, что маркер в одном генетическом локусе будет отделен от маркера во втором локусе в результате кроссинговера в одном поколении.

Используемый в настоящем документе термин "хромосомный интервал" обозначает непрерывный линейный участок геномной ДНК, находящийся *in planta* на одной хромосоме. Генетические элементы или гены, расположенные на одном хромосомном

интервале, физически сцеплены между собой. Размер хромосомного интервала не является особо ограниченным. В некоторых аспектах генетические элементы, расположенные в пределах одного хромосомного интервала, генетически сцеплены, как правило с генетическим расстоянием рекомбинации, например, меньшим или равным 20 сМ, или, альтернативно, меньшим или равным 10 сМ. То есть, два генетических элемента в пределах одного хромосомного интервала подвергаются рекомбинации с частотой меньшей или равной 20% или 10%.

Термин "тесно сцепленный" в настоящей заявке означает, что рекомбинация между двумя сцепленными локусами происходит с частотой, равной или менее 10% (т.е. они разделены на генетической карте не более чем на 10 сМ). Другими словами, тесно сцепленные локусы косегрегируют в не менее, чем 90 % случаев. Маркерные локусы особенно полезны в отношении объекта настоящего раскрытия, когда они демонстрируют значительную вероятность косегрегации (сцепления) с желаемым признаком (например, устойчивостью к бурой пятнистости листьев). Тесно сцепленные локусы, такие как маркерный локус и второй локус, могут демонстрировать частоту межлокусной рекомбинации 10% или менее, предпочтительно приблизительно 9% или менее, более предпочтительно приблизительно 8% или менее, более предпочтительно приблизительно 7% или менее, более предпочтительно приблизительно 6% или менее, более предпочтительно приблизительно 5% или менее, более предпочтительно приблизительно 4% или менее, более предпочтительно приблизительно 3% или менее, и наиболее предпочтительно приблизительно 2% или менее. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления изобретения, частота рекомбинации в соответствующих локусах составляет около 1 % или менее, например, около 0,75 % или менее, более предпочтительно около 0,5 % или менее, более предпочтительно около 0,25 % или менее. Два локуса, которые локализованы на одной хромосоме и находятся на таком расстоянии, что рекомбинация между ними происходит с частотой менее 10% (например, около 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25% или меньше), также считаются "проксимальными" по отношению друг к другу. В некоторых случаях два разных маркера могут иметь одинаковые координаты на генетической карте. В этом случае два маркера находятся в такой близости друг от друга, что рекомбинация между ними происходит с такой низкой частотой, что ее невозможно обнаружить.

"Сцепление" означает тенденцию к сцеплению аллелей друг с другом чаще, чем можно было бы случайно ожидать, если бы их трансмиссия была независимой. Обычно,

сцепление касается аллелей на одной хромосоме. Генетическая рекомбинация происходит с предполагаемой случайной частотой по всему геному. Генетические карты строятся путем измерения частоты рекомбинации между парами признаков или маркеров. Чем ближе друг к другу расположены на хромосоме признаки или маркеры, тем ниже частота рекомбинации и тем выше степень сцепления. Признаки или маркеры считаются сцепленными, если они, как правило, косегрегируют. Вероятность рекомбинации 1/100 на поколение определяется как расстояние на генетической карте в 1,0 сантиморганиду (1,0 сМ). Термин "неравновесное сцепление" означает неслучайную сегрегацию генетических локусов или признаков (или и того, и другого). В любом случае, неравновесное сцепление означает, что соответствующие локусы находятся в пределах достаточной физической близости друг от друга по длине хромосомы, так что они косегрегируют вместе с большей, чем случайная (т.е. неслучайная) частотой. Маркеры, которые демонстрируют неравновесное сцепление, считаются сцепленными. Сцепленные локусы косегрегируют более чем в 50%, например, от примерно 51% до примерно 100% случаев. Другими словами, два косегрегирующих маркера имеют частоту рекомбинации менее 50% (и, по определению, разделены менее чем на 50 сМ в одной группе сцепления). В контексте настоящего документа, сцепление может быть между двумя маркерами или, альтернативно, между маркером и локусом, влияющим на фенотип. Маркерный локус может быть "ассоциированным" (сцепленным) с признаком. Степень сцепления маркерного локуса с локусом, влияющим на фенотипический признак, измеряется, например, как статистическая вероятность косегрегации этого молекулярного маркера с фенотипом (например, F-статистика или LOD-балл).

Используемый в данном документе, термин "идентичный последовательности" означает степень идентичности между любой данной последовательностью нуклеиновой кислоты и последовательностью-мишенью нуклеиновой кислоты. Процент идентичности последовательности рассчитывается путем определения количества совпадающих положений в выровненных последовательностях нуклеиновых кислот, деления количества совпадающих положений на общее количество выровненных нуклеотидов и умножения на 100. Под совпадающим положением понимается положение, в котором идентичные нуклеотиды встречаются в одном и том же положении в выровненных последовательностях нуклеиновых кислот. Процент идентичности последовательности также может быть определен для любой аминокислотной последовательности. Для определения процента идентичности последовательности, последовательность-мишень нуклеиновой кислоты или аминокислоты сравнивают с идентифицированной

последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислоты с помощью программы BLAST 2 Sequences (B12seq) из автономной версии BLASTZ, содержащей BLASTN и BLASTP. Эту автономную версию BLASTZ можно получить на веб сайте компании Fish & Richardson (World Wide Web по адресу fr.com/blast) или на веб сайте Национального центра биотехнологической информации правительства США (World Wide Web по адресу ncbi.nlm.nih.gov). Инструкции по использованию программы B12seq можно найти в файле `readme`, прилагаемом к BLASTZ. B12seq выполняет сравнение двух последовательностей, используя алгоритм BLASTN или BLASTP.

BLASTN используется для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, а BLASTP - для сравнения последовательностей аминокислот. Для сравнения двух последовательностей нуклеиновых кислот параметры задаются следующим образом: `-i` - файл, содержащий первую сравниваемую последовательность нуклеиновых кислот (например, `C:\seq 1 .txt`); `-j` - файл, содержащий вторую сравниваемую последовательность нуклеиновых кислот (например, `C:\seq2.txt`); `-p` устанавливается на `blastn`; `-o` устанавливается любое желаемое имя файла (например, `C :\output.txt`); `-q` устанавливается на `- 1`; `-г` устанавливается на `2`; и все остальные опции оставляются по умолчанию. Следующая команда создаст выходной файл, содержащий сравнение двух последовательностей: `C:\B12seq -i c:\seq1 .txt -j c:\seq2.txt -p blastn -o c:\output.txt -q - 1 -г 2`. Если последовательность-мишень имеет общую гомологию с какой-либо частью идентифицированной последовательности, то в указанном выходном файле эти области гомологии будут представлены в виде выровненных последовательностей. Если последовательность-мишень не имеет гомологии ни с одной частью идентифицированной последовательности, то в указанном выходном файле не будут представлены выровненные последовательности. После выравнивания, длина определяется путем подсчета количества последовательных нуклеотидов из последовательности-мишени, представленных в выравнивании с последовательностью из идентифицированной последовательности, начиная с любого совпадающего положения и заканчивая любым другим совпадающим положением. Совпадающее положение - это любое положение, в котором идентичный нуклеотид присутствует как в последовательности-мишени, так и в идентифицированной последовательности. Пробелы, представленные в последовательности-мишени, не учитываются, поскольку пробелы не являются нуклеотидами. Аналогично, пробелы, представленные в идентифицированной последовательности, не учитываются, поскольку учитываются нуклеотиды последовательности-мишени, а не нуклеотиды из идентифицированной

последовательности. Процент идентичности на определенной длине определяется путем подсчета числа совпадающих положений на этой длине и деления этого числа на длину, с последующим умножением полученного значения на 100. Например, если (i) последовательность-мишень нуклеиновой кислоты из 500 оснований сравнивается с последовательностью нуклеиновой кислоты-объекта, (ii) программа B12seq представляет 200 оснований последовательности-мишени, выровненных с участком последовательности-объекта, где первое и последнее основания этой области из 200 оснований совпадают, и (iii) количество совпадений на этих 200 выровненных основаниях составляет 180, то последовательность-мишень нуклеиновой кислоты из 500 оснований имеет длину 200 и идентичность последовательности на этой длине составляет 90% (т.е. $180 / 200 \times 100 = 90$). Следует понимать, что различные участки в пределах одной последовательности-мишени нуклеиновой кислоты, которая выравнивается с идентифицированной последовательностью, могут иметь свой собственный процент идентичности. Следует отметить, что значение процента идентичности округляется до ближайшей десятой. Например, 78,11, 78,12, 78,13 и 78,14 округляются до 78,1, а 78,15, 78,16, 78,17, 78,18 и 78,19 округляются до 78,2. Также следует отметить, что значение длины всегда будет целым числом.

Термин "последовательность", используемый в настоящем документе, касается нуклеотидной последовательности (последовательностей), полинуклеотида (полинуклеотидов), последовательности (последовательностей) нуклеиновых кислот, нуклеиновой кислоты (нуклеиновых кислот), молекулы нуклеиновой кислоты, пептидов, полипептидов и белков, в зависимости от контекста, в котором употребляется термин "последовательность". Термины "последовательность (последовательности) нуклеотидов", "полинуклеотид (полинуклеотиды)", "последовательность (последовательности) нуклеиновых кислот", "нуклеиновая кислота (нуклеиновые кислоты)", "молекула нуклеиновой кислоты" используются в этом документе как взаимозаменяемые и относятся к нуклеотидам, рибонуклеотидам, дезоксирибонуклеотидам или их комбинации в полимерной неразветвленной форме любой длины. Последовательности нуклеиновых кислот включают ДНК, кДНК, геномную ДНК, РНК, синтетические формы и смешанные полимеры, как смысловые, так и антисмысловые цепи, или могут содержать неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания, что понятно специалистам в данной области.

"Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты" или "выделенная ДНК" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая больше не находится в естественной среде, из которой она была выделена, например, последовательность нуклеиновой кислоты в бактериальной клетке-хозяине или в ядерном или пластидном геноме растения. При упоминании в данном документе "последовательности" подразумевается, что речь идет о молекуле, имеющей такую последовательность, например, о молекуле нуклеиновой кислоты. "Клетка-хозяин", "рекомбинантная клетка-хозяин" или "трансформированная клетка" - это термины, относящиеся к новой отдельной клетке (или организму), возникающей в результате введения в указанную клетку по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты. Клетка-хозяин предпочтительно представляет собой растительную или бактериальную клетку. Клетка-хозяин может содержать нуклеиновую кислоту в виде внехромосомно (эписомально) реплицирующейся молекулы, или включать нуклеиновую кислоту, интегрированную в ядерный или пластидный геном клетки-хозяина, или в виде внедренной хромосомы, например, минихромосомы.

Используемый в настоящем документе термин "полипептид" или "белок" (оба термина используются в настоящем документе как взаимозаменяемые) означает пептид, белок или полипептид, которые включают аминокислотные цепи определенной длины, в которых аминокислотные остатки соединены ковалентными пептидными связями. Однако, изобретением также охватываются пептидомиметики таких белков/полипептидов, в которых аминокислота (аминокислоты) и/или пептидная связь (пептидные связи) заменены функциональными аналогами, а также другие аминокислоты, помимо 20-и кодируемых генами аминокислот, такие как селеноцистеин. Пептиды, олигопептиды и белки могут быть названы полипептидами. Термин "полипептид" также относится к модификациям полипептида, таким как например, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и тому подобное, но не исключается ими. Такие модификации хорошо описаны в базовых текстах и в более подробных монографиях, а также в исследовательской литературе.

Аминокислотные субституции охватывают изменения аминокислотного состава, при которых аминокислота заменяется другим, встречающимся в природе аминокислотным остатком. Такие субституции можно классифицировать как "консервативные" - в них аминокислотный остаток, содержащийся в белке дикого типа, заменяется на другую встречающуюся в природе аминокислоту аналогичного характера, например, Gly $\leftrightarrow$ Ala,

Val<->Ile, Asp<->Glu, Lys<->Arg, Asn<->Gln или Phe<->Trp<->Tyr. Субституции, охватываемые настоящим изобретением, также могут быть "неконсервативными" – в них аминокислотный остаток, присутствующий в белке дикого типа, заменяется аминокислотой с другими свойствами, например, встречающейся в природе аминокислотой из другой группы (например, субституция заряженной или гидрофобной аминокислоты на аланин. Используемый в настоящем документе термин "сходные аминокислоты", относится к аминокислотам, которые имеют сходные аминокислотные боковые цепи, т.е. аминокислоты, которые имеют полярные, неполярные или практически нейтральные боковые цепи. Используемый в настоящем документе термин "несходные аминокислоты", относится к аминокислотам, которые имеют разные аминокислотные боковые цепи, например, аминокислота с полярной боковой цепью не похожа на аминокислоту с неполярной боковой цепью. Полярные боковые цепи обычно присутствуют на поверхности белка, где они могут взаимодействовать с водной средой, присутствующей в клетках ("гидрофильные" аминокислоты). С другой стороны, "неполярные" аминокислоты обычно располагаются в центре белка, где они могут взаимодействовать с аналогичными неполярными соседями ("гидрофобные" аминокислоты). Примерами аминокислот с полярными боковыми цепями являются аргинин, аспарагин, аспартат, цистеин, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин (все гидрофильные, за исключением цистеина, который является гидрофобным). Примерами аминокислот с неполярными боковыми цепями являются аланин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин и триптофан (все гидрофобные, за исключением глицина, который является нейтральным).

Используемый в настоящем документе термин "ген", относится к полимерной форме нуклеотидов любой длины, как рибонуклеотидов, так и дезоксирибонуклеотидов. Этот термин включает двух- и одноцепочечные ДНК и РНК. Он также включает известные типы модификаций, например, метилирование, "кэпы", субституцию одного или нескольких встречающихся в природе нуклеотидов на аналог. Предпочтительно, ген содержит кодирующую последовательность, кодирующую определенный в данном документе полипептид. "Кодирующая последовательность" - это нуклеотидная последовательность, которая транскрибируется в мРНК и/или транслируется в полипептид, когда размещается или находится под контролем соответствующих регуляторных последовательностей. Границы кодирующей последовательности определяются кодоном начала трансляции на 5'-конце и кодоном остановки трансляции на 3'-конце. Кодирующая последовательность может включать мРНК, кДНК,

последовательности рекомбинантных нуклеиновых кислот или геномную ДНК, но не ограничивается ими, а при определенных обстоятельствах могут присутствовать и интроны.

Используемый в настоящем документе термин "эндогенный" относится к гену или аллелю, который присутствует в своем естественном местоположении в геноме. Термин "эндогенный" может использоваться как взаимозаменяемый с терминами "естественный" или "дикий". Однако это не исключает наличия одной или нескольких нуклеиновых кислот, отличающихся от аллеля дикого типа. В конкретных вариантах осуществления изобретения, разница с аллелем дикого типа может составлять менее 9 нуклеотидных различий, предпочтительно менее 6, более предпочтительно менее 3, например, 0. В частности, разница с последовательностью дикого типа может составлять всего один нуклеотид. Предпочтительно, эндогенный аллель кодирует модифицированный белок, имеющий менее 9 аминокислотных различий, предпочтительно менее 6, более предпочтительно менее 3 и еще более предпочтительно только одно аминокислотное различие с белком дикого типа, или ни одного.

В настоящем документе, термин "экзогенный полинуклеотид" относится к полинуклеотиду, такому как ген (или кДНК) или аллель, который рекомбинантно вводится или был рекомбинантно введен в клетку (или растение). Экзогенный полинуклеотид может быть эписомальным или геномно интегрированным. Интеграция может быть случайной или сайт-направленной. Интеграция может включать замену соответствующего эндогенного полинуклеотида. Следует понимать, что экзогенный полинуклеотид не является естественно присутствующим в клетке или растении.

Когда упоминается нуклеиновая кислота (например, ДНК или геномная ДНК), чья последовательность "существенно идентична" эталонной последовательности или нуклеиновая кислота, чья последовательность идентична по меньшей мере на 60%>, например, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% эталонной последовательности, в одном варианте осуществления изобретения указанная нуклеотидная последовательность считается существенно идентичной данной нуклеотидной последовательности и может быть идентифицирована с использованием жестких условий гибридизации. В другом варианте осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты содержит одну или более мутаций по сравнению с данной нуклеотидной последовательностью, но все еще может быть идентифицирована с использованием жестких условий гибридизации. "Жесткие условия

гибридизации" могут быть использованы для идентификации нуклеотидных последовательностей, которые в значительной степени идентичны данной нуклеотидной последовательности. Жесткие условия зависят от последовательности и будут отличаться в разных обстоятельствах. Как правило, жесткие условия выбираются таким образом, чтобы они были примерно на 5°C ниже температуры плавления (T_m) для конкретных последовательностей при определенной ионной силе и pH. T_m - это температура (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% последовательности-мишени гибридизуется с идеально подобранным зондом. Обычно выбираются жесткие условия, при которых концентрация соли составляет около 0,02 моля при pH 7, а температура - не менее 60°C. Снижение концентрации соли и/или повышение температуры увеличивает жесткость условий. Жесткие условия для гибридизации РНК-ДНК (нозерн-блоты с использованием зонда, например, из 100 н.о.) включают, например, по меньшей мере одну промывку в 0,2X SSC при 63°C в течение 20 минут или эквивалентные условия. Жесткие условия для гибридизации ДНК-ДНК (саузерн-блоты с использованием зонда, например, из 100 н.о.) включают, например, по меньшей мере одну промывку (обычно 2) в 0,2X SSC при температуре не менее 50°C, обычно около 55°C, в течение 20 мин, или эквивалентные условия. См. также Sambrook et al. (1989) и Sambrook and Russell (2001). Примерами особо жестких условий гибридизации являются условия, при которых гибридизации подвергаются преимущественно только те молекулы нуклеиновых кислот, которые идентичны последовательности по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%. Такими особо жесткими условиями гибридизации являются, например: 4 x SSC при 65°C и последующие многократные промывки в 0,1 x SSC при 65°C в течение приблизительно 1 часа. Термин "жесткие условия гибридизации", используемый в настоящем документе, может также означать: гибридизацию при 68°C в 0,25 М фосфате натрия, при pH 7,2, 7 % SDS, 1 mM EDTA и 1 % BSA в течение 16 часов и последующую двукратную промывку в 2 x SSC и 0,1 % SDS при 68°C. Предпочтительно, чтобы гибридизация проходила в жестких условиях. Менее жесткими условиями гибридизации являются, например, гибридизация в 4 x SSC при 37 °C и последующая многократная промывка в 1 x SSC при комнатной температуре.

В настоящем документе, вырожденные нуклеотиды обозначаются в соответствии со стандартами нуклеотидных кодов ИЮПАК.

При использовании в данном документе, F35H (ExPASy запись фермента EC 1.14.13.88) относится к гену или белку флавоноидной 3',5'-гидроксилазы. F35H также известен как F3'5'H, F3',5'H, флавоноид 3',5'-гидроксилаза цитохрома P450, или флаванон, NADPH: кислород оксидоредуктаза. F35H катализирует следующую реакцию: флаванон + 2 NADPH + 2 O(2) $\rightleftharpoons$ 3',5'-дигидроксифлаванон + 2 NADP(+) + 2 H(2)O.

Настоящее изобретение относится к растениям или частям растений кукурузы, таким как вегетативная масса, характеризующимся наличием специфических (молекулярных) маркеров (аллелей), в частности, связанных с улучшенной переваримостью (вегетативной массы). Изобретение также относится к использованию таких маркеров для создания, а также идентификации или отбора растений, или частей растений кукурузы. Изобретение также относится к (выделенным) полинуклеиновым кислотам, содержащим такие маркеры, или пригодным для идентификации или обнаружения таких маркеров.

Маркеры, подходящие для использования в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения представлены в таблице А ниже.

Таблица А

SEQ ID №:	Маркер	Аллель-донор (улучшенная переваримость)		Комментарий
		Положение полиморфизма в SEQ ID №	Идентичность полиморфизма	
13	SYN38529	61		полиморфный
14	SYN5866	61		полиморфный
15	SYN11764	61		полиморфный
16	PZE-109015136	51		полиморфный
17	PZE-109015397	51		полиморфный
18	PZE-109016177	51		полиморфный
19	PZE-109017276	51		полиморфный
20	PZE-109017407	51		полиморфный
21	PZE-109018614	51		полиморфный
22	SYN32168	61		полиморфный
23	PZE-109021152	51		полиморфный
24	PZE-109021389	51		полиморфный
25	zm06133s02	101		полиморфный
26	PZE-109022641	51		полиморфный
27	Affx-90814890	31		полиморфный
28	SYN34181	61		полиморфный
29	SYN29297	61		полиморфный
30	PZE-109026962	51		полиморфный

31	SYN13048	61		полиморфный
32	PZE-109063861	51		полиморфный
33	PZE-109029427	51		полиморфный
34	zm08444s04	101		полиморфный
35	zm08444s03	101		полиморфный
36	PZE-109031125	51		полиморфный
37	PZE-109033123	51		полиморфный
38	SYN18776	61		полиморфный
39	PZE-109035519	51		полиморфный
40	PZE-109035852	51		полиморфный
41	PZE-109036977	51		полиморфный
42	zm10851s01	101		полиморфный
43	PZE-109041138	51		полиморфный
44	PZE-109040213	51		полиморфный
45	PZE-109043990	51		полиморфный
46	PZE-109045856	51		полиморфный
47	PZE-109048885	51		полиморфный
48	SYN32492	101		полиморфный
49	SYN32488	61		полиморфный
50	zm11758s02	101		полиморфный
51	PZE-109051621	51		полиморфный
52	PZE-109053851	51		полиморфный
53	PZE-109053885	51		полиморфный
54	PZE-109053887	51		полиморфный
55	PZE-109053906	51		полиморфный
56	PZE-109054050	51		полиморфный
57	PZE-109054055	51		полиморфный
58	PZE-109054205	51		полиморфный
59	PZE-109054458	51		полиморфный
60	PZE-109054723	51		полиморфный
61	PZE-109054729	51		полиморфный
62	PZE-109054805	51		полиморфный
63	PZE-109054812	51		полиморфный
64	PZE-109054943	51		полиморфный
65	SYN32299	61		полиморфный
66	PZE-109058460	51		полиморфный
67	Affx-91355778	36		полиморфный
68	PZE-109061769	51		полиморфный
69	SYN36472	61		полиморфный
70	PUT-163a- 4646495-2099	56		полиморфный
71	PZE-109065712	51		полиморфный
72	Affx-91059234	36		полиморфный
73	PZE-109066188	51		полиморфный
74	PZE-109067522	51		полиморфный
75	PZE-109067146	51		полиморфный
76	PZE-109066949	51		полиморфный
77	PZE-109066773	51		полиморфный
78	PZE-100001123	51		полиморфный

79	PZE-100000965	51		полиморфный
80	ZM011231-0277	61		полиморфный
81	PZE-109067561	51		полиморфный
82	PZE-109067890	51		полиморфный
83	PZE-109068071	51		полиморфный
84	SYN21877	61		полиморфный
85	PZE-109071755	51		полиморфный
86	PZE0008250961	51		полиморфный
87	SYN29013	61		полиморфный
88	PZE-109072798	51		полиморфный
89	SYN23066	101		полиморфный
90	PZE-109073024	51		полиморфный
91	PZE-109073894	51		полиморфный
92	SYN30845	61		полиморфный
93	ma60054s01	101		полиморфный
94	PZE-109074314	51		полиморфный
95	SYN22542	61		полиморфный
96	PZE-109074671	51		полиморфный
97	PZE-109074676	51		полиморфный
98	PZE0004090171	51		полиморфный
99	PZE-100001246	51		полиморфный
100	PZE-100001337	51		полиморфный
101	PZE-100001338	51		полиморфный
102	SYN4635	61		полиморфный
103	PZE-109075140	51		полиморфный
104	PZE-109075353	51		полиморфный
105	PZE-109075487	51		полиморфный
106	PZE-109075564	51		полиморфный
107	PZE-109075835	51		полиморфный
108	PZE-109075980	51		полиморфный
109	PZE-109076467	51	ade	
110	PZE-109076558	51	gua	
111	PZE-109076739	51	ade	
112	PZE-109076761	51	ade	
113	PZE-109077374	51	ade	
114	ma61126d01	100-101		делеция SEQ ID №: 115 между положениями 100-101 SEQ ID №: 114
116	PZE-109077509	51	ade	
117	PZE-109077598	51	gua	
118	PZE-109077976	51	ade	
119	PZE-109078320	51	ade	
120	ma60405s01	101	gua	
121	PZE-109078814	51	gua	
122	PZE-109078789	51	cyt	
123	PZE-109079170	51	ade	
124	ma61134d16	101-107	gcggtct	Инсерция 7 п.о.
125	ma61134d15	101-108	gcggttct	Инсерция 8 п.о.

126	Affx-91110408	101	ade	
127	PUT-163a-16926216-1143	56	cyt	
128	Affx-91121762	36	ade	
129	PZE-109080508	51	ade	
130	PZE-109080569	51	gua	
131	ma60182s01	101	ade	
132	PZE-109080822	51	ade	
133	ma61125s01	101	ade	
134	SYN29273	61	ade	
135	PZE-109081405	51	gua	
136	PZE-109081479	51	ade	
137	Affx-90937015	36	thy	
138	PZE-109081680	51	gua	
139	SYN29834	61	gua	
140	PZE-109082046	51	gua	
141	PZE-109082004	51	gua	
142	Affx-90383113	36	cyt	
143	SYN34099	61	gua	
144	Affx-91186901	10	gua	
145	SYN33659	61	ade	
146	PZE-109082918	51	ade	
147	PZE-109083369	51	ade	
148	PZE-109083328	51	gua	
149	SYN29817	61	gua	
150	ma60360s01	101	ade	
151	ma61158s01	101	thy	
152	ma61036s01	101	thy	
153	PZE-109086494	51	cyt	
154	ma61161s01	101	ade	
155	ma60806s03	101		полиморфный
156	ma61071s01	101		полиморфный
157	SYN38267	61		полиморфный
158	PZE-109088808	51		полиморфный
159	PUT-163a-60348412-2592	55		полиморфный
160	PHM1599.84	61		полиморфный
161	PZE-109090188	51		полиморфный
162	ma60984s01	101		полиморфный
163	PZE-109091377	51		полиморфный
164	PZE-109092033	51		полиморфный
165	PZE-109092182	51		полиморфный
166	SYN27192	61		полиморфный
167	PZE-109093491	51		полиморфный
168	PZE-109093846	51		полиморфный
169	PZE-109094238	51		полиморфный
170	PZE-109094399	51		полиморфный
171	ZM013688-0470	20		полиморфный
172	PZE-109096103	51		полиморфный

173	SYN22829	61		полиморфный
174	SYN22625	61		полиморфный
175	PZE-109097654	51		полиморфный
176	PZE-109097752	51		полиморфный
177	PZE-109098108	51		полиморфный
178	zm00728s04	101		полиморфный
179	PZE-109098623	51		полиморфный
180	SYN27711	61		полиморфный
181	SYN27709	61		полиморфный
182	PZE-109099670	51		полиморфный
183	Affx-91229917	36		полиморфный
184	PZE-109100755	51		полиморфный
185	SYN25124	61		полиморфный
186	SYN25123	61		полиморфный
187	PZE-109101695	51		полиморфный
188	PZE-109101698	51		полиморфный
189	PZE-109102054	51		полиморфный
190	PZE-109102157	51		полиморфный
191	zm02908s02	101		полиморфный
192	Affx-90454668	36		полиморфный
193	PUT-163a- 60357079-2822	56		полиморфный
194	Affx-90988936	36		полиморфный
195	PZE-109103504	51		полиморфный

Предпочтительные маркеры, подходящие для использования в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, представлены в таблице В ниже.

Таблица В

SEQ ID №:	Маркер	Аллель-донор (улучшенная переваримость)		Комментарий
		Положение полиморфизма в SEQ ID №	Идентичность полиморфизма	
109	PZE-109076467	51	ade	
110	PZE-109076558	51	gua	
111	PZE-109076739	51	ade	
112	PZE-109076761	51	ade	
113	PZE-109077374	51	ade	
114	ma61126d01	100-101		делеция SEQ ID №: 115 между положениями 100-101 SEQ ID №: 114
116	PZE-109077509	51	ade	
117	PZE-109077598	51	gua	
118	PZE-109077976	51	ade	

119	PZE-109078320	51	ade	
120	ma60405s01	101	gua	
121	PZE-109078814	51	gua	
122	PZE-109078789	51	cyt	
123	PZE-109079170	51	ade	
124	ma61134d16	101-107	gcggtct	Инсерция 7 п.о.
125	ma61134d15	101-108	gcggttct	Инсерция 8 п.о.
126	Affx-91110408	101	ade	
127	PUT-163a- 16926216-1143	56	cyt	
128	Affx-91121762	36	ade	
129	PZE-109080508	51	ade	
130	PZE-109080569	51	gua	
131	ma60182s01	101	ade	
132	PZE-109080822	51	ade	
133	ma61125s01	101	ade	
134	SYN29273	61	ade	
135	PZE-109081405	51	gua	
136	PZE-109081479	51	ade	
137	Affx-90937015	36	thy	
138	PZE-109081680	51	gua	
139	SYN29834	61	gua	
140	PZE-109082046	51	gua	
141	PZE-109082004	51	gua	
142	Affx-90383113	36	cyt	
143	SYN34099	61	gua	
144	Affx-91186901	10	gua	
145	SYN33659	61	ade	
146	PZE-109082918	51	ade	
147	PZE-109083369	51	ade	
148	PZE-109083328	51	gua	
149	SYN29817	61	gua	
150	ma60360s01	101	ade	
151	ma61158s01	101	thy	
152	ma61036s01	101	thy	
153	PZE-109086494	51	cyt	
154	ma61161s01	101	ade	

Наиболее предпочтительные маркеры, подходящие для использования в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения представлены, в таблице С ниже.

Таблица С

SEQ ID №:	Marker	Аллель-донор (улучшенная переваримость)	Комментарий
-----------	--------	---	-------------

		Положение полиморфизма в SEQ ID №	Идентичность полиморфизма	
124	ma61134d16	101-107	gcsgtct	Инсерция 7 п.о.
125	ma61134d15	101-108	gcsgttct	Инсерция 8 п.о.

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию QTL на хромосоме 9 в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), или его фрагмента, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), фланкированного SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01 или состоящего в полинуклеотиде или QTL (аллеле), включающем и/или фланкированном (молекулярным) маркером (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01.

Как указано в настоящем документе, считается, что полинуклеиновая кислота, такая как, например, QTL (аллель), описанный в настоящем документе, фланкирована определенными молекулярными маркерами или аллелями молекулярных маркеров, если полинуклеиновая кислота входит в состав полинуклеиновой кислоты, где соответственно первый маркер (аллель) расположен в направлении против хода транскрипции (т.е. 5') данной полинуклеиновой кислоты и второй маркер (аллель) расположен в направлении по ходу транскрипции (т.е. 3') данной полинуклеиновой кислоты. Такой первый и второй маркер (аллель) могут граничить с полинуклеиновой кислотой. Нуклеиновая кислота может в равной степени включать такой первый и второй маркер (аллель), например, соответственно на 5' и 3' конце или вблизи него, например, соответственно в пределах 50 kb от 5' и 3' конца, предпочтительно в пределах 10 kb от 5' и 3' конца, например, в пределах 5 kb от 5' и 3' конца, в пределах 1 kb от 5' и 3' конца, или еще ближе.

Специалисту понятно, что обнаружение любого из (молекулярных) маркеров (аллелей) таблиц А, В или С может эквивалентно обнаружить любой из других (молекулярных) маркеров (аллелей), учитывая их тесную связь. Например, скрининг на полинуклеотид,

включающий ma61134d16 или ma61134d15, может быть проведен путем скрининга на сами эти маркеры (аллели) или, альтернативно, путем скрининга на любой другой маркер (аллель) из Таблицы А или В, предпочтительно Таблицы В.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ma61134d16 или ma61134d15 не присутствуют в полинуклеотиде или QTL (аллеле) изобретения, описанных в данном документе в других вариантах.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию QTL на хромосоме 9 в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в изолированном из растения или части растения генетическом материале) или его фрагмента, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), фланкированного SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01 или включенного в полинуклеотид или QTL (аллель), включающий и/или фланкированный (молекулярным) маркером (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию QTL на хромосоме 9 в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в изолированном из растения или части растения генетическом материале), или его фрагмента, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), фланкированного SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01, или включенного в полинуклеотид или QTL (аллель), включающий и/или фланкированный (молекулярным) маркером (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01, и отбор растения или части растения, в которых присутствует этот QTL.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной

переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения, и скрининг на наличие или идентификацию QTL на хромосоме 9 в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале) или его фрагмента, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), фланкированного SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01 или включенного в полинуклеотид или QTL (аллель), включающий и/или фланкированный (молекулярным) маркером (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01, и отбор растения или части растения, в котором присутствует этот QTL.

Предпочтительно, QTL включает один или более (молекулярных) маркеров (аллелей) из таблицы А. Более предпочтительно, QTL включает один или более (молекулярных) маркеров (аллелей) из таблицы В. Наиболее предпочтительно, QTL включает один или более (молекулярных) маркеров (аллелей) из таблицы С.

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности связанный с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающий один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы А в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности, растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы А в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы А в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в которых присутствует этот полинуклеотид.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы А в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в которых присутствует этот полинуклеотид.

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы В в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной

переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы В в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы В в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в которых присутствует этот полинуклеотид.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, например, QTL или его фрагмента, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы В в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует этот полинуклеотид.

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности

связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы С в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности, растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы С в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы С в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в которых присутствует этот полинуклеотид.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы С в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или

части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в которых присутствует этот полинуклеотид.

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего одну или несколько из SEQ ID №: 13-195 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности, растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности, связанного с улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающего одну или несколько из SEQ ID №: 13-195 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего одну или несколько из SEQ ID №: 13-195 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует данный полинуклеотид.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего одну или несколько из SEQ ID №: 13-195 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует этот полинуклеотид.

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего одну или несколько из SEQ ID №: 109-154 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности, растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего одну или несколько из SEQ ID №: 109-154 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего одну или несколько из SEQ ID №: 109-154 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует данный полинуклеотид.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего одну или несколько из SEQ ID №: 109-154 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует этот полинуклеотид.

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего одну или несколько из SEQ ID №: 124-125 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности, растения или части

растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, например, QTL или его фрагмента, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего одну или несколько из SEQ ID №: 124-125 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего одну или несколько из SEQ ID №: 124-125 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует данный полинуклеотид.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего одну или несколько из SEQ ID №: 124-125 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует этот полинуклеотид.

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения

кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, например, QTL или его фрагмента, в частности связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего (молекулярный) маркер (аллель) ma61134d15 и/или ma61134d16 в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности, растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения, и скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего (молекулярный) маркер (аллель) ma61134d15 и/или ma61134d16 в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего (молекулярный) маркер (аллель) ma61134d15 и/или ma61134d16 в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в которых присутствует этот полинуклеотид.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию полинуклеотида, такого как QTL или его фрагмент, в

частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), включающего (молекулярный) маркер (аллель) *ma61134d15* и/или *ma61134d16* в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в которых присутствует этот полинуклеотид.

В некоторых из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, скрининг на наличие или идентификацию/обнаружение полинуклеотида включает скрининг на наличие или идентификацию/обнаружение любого из указанных (молекулярных) маркеров (аллелей) или SEQ ID №.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид или QTL (аллель) расположен на хромосоме 9 и включает и/или фланкирован (молекулярным) маркером (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и *ma61161s01*, или входит в состав полинуклеотида или QTL (аллеля), включающего и/или фланкированного (молекулярным) маркером (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и *ma61161s01*.

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения, или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы А в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы А в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной

переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы А в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует данный (молекулярный) маркер (аллель).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности, растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы А в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует данный (молекулярный) маркер (аллель).

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы В в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения, и скрининг на наличие или идентификацию одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы В в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности, растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или

идентификацию одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы В в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует данный (молекулярный) маркер (аллель).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы В в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует данный (молекулярный) маркер (аллель).

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения, или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы С в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности, растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы С в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы С в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения

или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует данный (молекулярный) маркер (аллель).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей) таблицы С в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует данный (молекулярный) маркер (аллель).

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности, растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию одной или нескольких SEQ ID №: 13-195 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице А) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности, растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию одной или нескольких SEQ ID №: 13-195 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице А) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию одной или нескольких SEQ ID №: 13-195 (имеющих маркерный

(донорный) аллель в положении, указанном в таблице А) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует SEQ ID

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности, растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию одной или нескольких SEQ ID №: 13-195 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице А) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует SEQ ID

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию одной или нескольких SEQ ID №: 109-154 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице А) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию одной или нескольких SEQ ID №: 109-154 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице А) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части

растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию одной или нескольких SEQ ID №: 109-154 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует SEQ ID

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию одной или нескольких SEQ ID №: 109-154 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует SEQ ID

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию одной или нескольких SEQ ID №: 124-125 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию одной или нескольких SEQ ID №: 124-125 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или

части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию одной или нескольких SEQ ID №: 124-125 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует SEQ ID

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию одной или нескольких SEQ ID №: 124-125 (имеющих маркерный (донорный) аллель в положении, указанном в таблице A) в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует SEQ ID

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения, или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию (молекулярного) маркера (аллеля) ma61134d15 и/или ma61134d16 в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения, и скрининг на

наличие или идентификацию (молекулярного) маркера (аллеля) та61134d15 и/или та61134d16 в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию (молекулярного) маркера (аллеля) та61134d15 и/или та61134d16 в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует данный (молекулярный) маркер (аллель).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию (молекулярного) маркера (аллеля) та61134d15 и/или та61134d16 в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале), и отбор растения или части растения, в котором присутствует данный (молекулярный) маркер (аллель).

В некоторых вариантах осуществления способов идентификации изобретения, растение или часть растения кукурузы включает полинуклеиновую кислоту, включающую один или несколько молекулярных маркеров (аллелей) из таблицы А. В некоторых вариантах осуществления способов идентификации изобретения, растение или часть растения кукурузы включает полинуклеиновую кислоту, включающую один или более молекулярных маркеров (аллелей) из таблицы В. В некоторых вариантах осуществления способов идентификации изобретения, растение или часть растения кукурузы включает полинуклеиновую кислоту, включающую один или более молекулярных маркеров (аллелей) из таблицы С.

В некоторых вариантах осуществления способов идентификации изобретения, растение или часть растения кукурузы включает полинуклеиновую кислоту, включающую полинуклеиновую кислоту, имеющую последовательность, изложенную в SEQ ID №: 1 или 4. В некоторых вариантах осуществления способов идентификации изобретения,

растение или часть растения кукурузы включает полинуклеиновую кислоту, имеющую кодирующую последовательность или кодирующую полинуклеиновую кислоту, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID №: 2 или 5. В некоторых вариантах осуществления способов идентификации изобретения, растение или часть растения кукурузы включает полинуклеиновую кислоту, включающую полинуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, имеющий последовательность, указанную в SEQ ID №: 3 или 6.

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения, или части растения кукурузы, в частности, растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале) полинуклеотида, включающего последовательность, выбранную из:

- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;
- б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;
- в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, идентична SEQ ID №: 7 или 8;
- г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID №: 9;

где нуклеотидная последовательность имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов не кратного трем, более предпочтительно приводящую к сдвигу рамки считывания, наиболее предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тиминном в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического

материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале) полинуклеотида, содержащего последовательность, выбранную из:

- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;
- б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;
- в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, идентична SEQ ID №: 7 или 8;
- г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID №: 9;

где нуклеотидная последовательность имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов не кратного трем, более предпочтительно приводящую к сдвигу рамки считывания, наиболее предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тиминном в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале) полинуклеотида, включающего последовательность, выбранную из

- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;
- б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;
- в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID №: 7 или 8;
- г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9 или аминокислотную последовательность, которая по

меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, идентична последовательности SEQ ID №: 9;

где нуклеотидная последовательность имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов не кратного трем, более предпочтительно приводящую к сдвигу рамки считывания, наиболее предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тиминном в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8, и выбор растения или части растения, в которой присутствует данный полинуклеотид.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале) полинуклеотида, содержащего последовательность, выбранную из

а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;

б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;

в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, идентична SEQ ID №: 7 или 8;

г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, идентична последовательности SEQ ID №: 9;

где нуклеотидная последовательность имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов не кратного трем, более предпочтительно приводящую к сдвигу рамки считывания, наиболее предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тиминном в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8, и выбор растения или части растения, в которой присутствует данный полинуклеотид.

Специалисту понятно, что соответствующие положения нуклеотидов могут быть определены путем соответствующего выравнивания, известного в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления изобретения инсерция 7 нуклеотидов имеет последовательность gcsgtct.

В некоторых вариантах осуществления инсерция 8 нуклеотидов имеет последовательность gcsgttct.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет последовательность, выбранную из:

- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;
- б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;
- в) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9;

где нуклеотидная последовательность имеет инсерцию 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тиминном в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид имеет последовательность, выбранную из:

- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcsgttct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcsgttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;
- б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcsgttct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcsgttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;
- в) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, где

нуклеотидная последовательность предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет последовательность, выбранную из:

- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4;
- б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5;
- в) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6.

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации или отбора растения, или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или идентификацию в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале) полинуклеотида, содержащего последовательность, выбранную из

- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;
- б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;
- в) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, где нуклеотидная последовательность предпочтительно включает gcsgtct, более

предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале) полинуклеотида, включающего последовательность, выбранную из

а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

в) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, где нуклеотидная последовательность предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему скрининг на наличие или

идентификацию в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале) полинуклеотида, включающего последовательность, выбранную из

а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

в) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, где нуклеотидная последовательность предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1, и

выбор растения или части растения, в которой присутствует данный полинуклеотид.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу идентификации или отбора растения или части растения кукурузы, в частности растения или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему выделение генетического материала по меньшей мере из одной клетки растения или части растения и скрининг на наличие или идентификацию в растении или части растения кукурузы (геноме, например, в выделенном из растения или части растения генетическом материале) полинуклеотида, включающего последовательность, выбранную из

а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении,

соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

в) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, где нуклеотидная последовательность предпочтительно включает gcsgttct, более предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1, и

выбор растения или части растения, в которой присутствует данный полинуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения скрининг на наличие или идентификацию включает присутствие или идентификацию инсерции длиной 7 пар оснований, имеющей последовательность gcggttct (соответствующую положению 103-109 SEQ ID №: 4).

В некоторых вариантах осуществления изобретения скрининг на наличие или идентификацию включает присутствие или идентификацию инсерции длиной 8 пар оснований, имеющей последовательность gcggttct (соответствующую положению 103-110 из SEQ ID №: 1).

SEQ ID №: 1 и 4 соответствуют геномной последовательности мутированного гена F35H в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, и соответственно включают инсерцию длиной 8 пар оснований или инсерцию длиной 7 пар оснований, описанные в данном документе.

SEQ ID №: 2 и 5 соответствуют кодирующей последовательности мутировавшего гена F35H в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, и соответственно включают инсерцию длиной 8 пар оснований или инсерцию длиной 7 пар оснований, описанные в данном документе (т.е. в положениях, соответствующих указанной геномной последовательности).

SEQ ID №: 3 и 6 соответствуют полипептидной последовательности, кодируемой мутировавшим геном F35H в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, и соответственно включают инсерцию длиной 8 пар оснований или инсерцию длиной 7 пар оснований, описанные в данном документе.

Следует понимать, что в описанных выше способах, когда полинуклеотид, аллель QTL, аллель (молекулярного) маркера или SEQ ID присутствуют или идентифицированы/обнаружены, то растение или часть растения идентифицируется как имеющее улучшенную переваримость, в частности улучшенную переваримость вегетативной массы. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, способы идентификации растения или части растения, описанные выше, являются способами идентификации растения или части растения, имеющего улучшенную переваримость, в частности улучшенную переваримость вегетативной массы. Альтернативно, в описанных выше способах, когда полинуклеотид, аллель QTL, аллель (молекулярного) маркера или SEQ ID не присутствуют или не идентифицированы/обнаружены, то растение или часть растения идентифицируют как не имеющие улучшенной переваримости, в частности, не имеющие улучшенной переваримости вегетативной массы.

Способы скрининга или обнаружения присутствия полинуклеиновой кислоты, аллеля QTL, (молекулярного) маркерного аллеля или SEQ ID описанных в настоящем документе, известны в данной области техники. Без ограничения, скрининг или обнаружение могут включать в себя секвенирование, методы на основе гибридизации (такие как (динамическая) аллель-специфическая гибридизация, молекулярные маяки, SNP-микрочипы), методы на основе ферментов (такие как ПЦР, KASP (конкурентная аллель-специфичная ПЦР), полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP), полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (ALFP), произвольно амплифицированная полиморфная ДНК (RAPD), эндонуклеаза Flap, удлинение праймеров, 5'-нуклеаза, метод лигирования олигонуклеотидов), методы постамплификации, основанные на физических свойствах ДНК (такие как конформационный полиморфизм одноцепочечных фрагментов ДНК, гель электрофорез с температурным градиентом, денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография, плавление всего ампликона с высоким разрешением, использование белков связывающих несоответствия ДНК, SNPlax, анализ surveyor нуклеазы), и т.д. Предпочтительно одна или более полинуклеиновых кислот, аллель QTL, аллель

(молекулярного) маркера или SEQ ID детектируются полинуклеиновой кислотой, такой как аллель-специфичная полинуклеиновая кислота (молекулярный маркер), подходящей для гибридизации в качестве праймера - прямого или обратного с локусом в хромосомном интервале, косегрегирующем с улучшенной переваримостью.

В одном из аспектов изобретение относится к растению или части растения кукурузы, идентифицированному или отобранному с помощью способов изобретения, описанных в настоящем документе в других разделах.

В одном из аспектов изобретение относится к способу, например, такому как способ создания или производства растения или части растения кукурузы, в частности, растения или части растения с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему введение в геном растения или части растения кукурузы полинуклеотида, (молекулярного) маркера (аллеля), QTL (аллеля) или мутированного гена F35H изобретения, описанных в настоящем документе.

В одном из аспектов изобретение относится к способу создания или производства растения, или части растения кукурузы, в частности растения или части растения с улучшенной переваримостью, предпочтительно улучшенной переваримостью вегетативной массы, включающему введение в геном растения или части растения кукурузы полинуклеотида, (молекулярного) маркера (аллеля), QTL (аллеля) или мутированного гена F35H изобретения, описанных в настоящем документе.

В одном из аспектов изобретение относится к способу улучшения переваримости растения или части растения кукурузы, предпочтительно переваримости вегетативной массы, включающему введение в геном растения или части растения кукурузы полинуклеотида, (молекулярного) маркера (аллеля), QTL (аллеля) или мутированного гена F35H изобретения, описанных в настоящем документе.

В одном из аспектов изобретение относится к способу, например, такому как способ создания растения или части растения и/или улучшения переваримости растения или части растения, предпочтительно переваримости вегетативной массы, включающему введение в геном растения QTL (аллеля), в частности, связанного с улучшенной переваримостью (вегетативной массы) и включающему нуклеотидную последовательность, кодирующую флавоноид 3',5'-гидроксилазу цитохрома P450 с мутацией.

В одном из аспектов изобретение относится к способу, например, способу создания растения или части растения и/или улучшения переваримости растения или части растения, предпочтительно переваримости вегетативной массы, включающему введение в геном растения QTL (аллеля), включающего нуклеотидную последовательность, кодирующую флавоноид 3',5'-гидроксилазу цитохрома P450 с мутацией.

В некоторых вариантах осуществления изобретения QTL (аллель) расположен на хромосоме 9 и включает и/или фланкирован (молекулярными) маркерами (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01, или входит в состав полинуклеотида или QTL (аллеля), включающего и/или фланкированного (молекулярными) маркерами (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01.

В некоторых вариантах осуществления изобретения QTL (аллель) расположен на хромосоме 9 и включает один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей), выбранных из таблицы А.

В некоторых вариантах осуществления изобретения QTL (аллель) расположен на хромосоме 9 и включает один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей), выбранных из таблицы В.

В некоторых вариантах осуществления изобретения QTL (аллель) расположен на хромосоме 9 и включает один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей), выбранных из таблицы С.

В одном из аспектов изобретение относится к способу, например, способу получения растения или части растения и/или улучшения переваримости растения или части растения, предпочтительно переваримости вегетативной массы, включающему введение в геном растения полинуклеотида, включающего (молекулярный) маркер (аллель), выбранный из таблицы А, предпочтительно все (необязательно за исключением одного - ma61134d15 или ma61134d16).

В одном из аспектов изобретение относится к способу, например, способу создания растения или части растения и/или улучшения переваримости растения или части растения, предпочтительно переваримости вегетативной массы, включающему введение в геном растения полинуклеотида, включающего (молекулярный) маркер (аллель), выбранный из таблицы В, предпочтительно все (необязательно за исключением одного - ma61134d15 или ma61134d16).

В одном из аспектов изобретение относится к способу, например, такому как способ получения растения или части растения и/или улучшения переваримости растения или части растения, предпочтительно переваримости вегетативной массы, включающему введение в геном растения полинуклеотида, содержащего (молекулярный) маркер (аллель), выбранный из таблицы С.

В одном из аспектов изобретение относится к способу, например, такому как способ создания растения или части растения и/или улучшения переваримости растения или части растения, предпочтительно переваримости вегетативной массы, включающему введение в геном растения полинуклеотида, включающего (молекулярный) маркер (аллель) `ma61134d15` и/или `ma61134d16` в растении или части растения кукурузы (геноме).

В одном из аспектов изобретение относится к способу, например, способу создания растения или части растения и/или улучшения переваримости растения или части растения, предпочтительно переваримости вегетативной массы, включающему введение в геном растения полинуклеотида, имеющего последовательность, выбранную из:

- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;
- б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;
- в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 7 или 8;

г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 9;

где нуклеотидная последовательность, указанная в пунктах а) - г) имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов не кратного трем, более предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тиминном в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8; или

д) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает `gcsgtct`, более предпочтительно `gcggtct`, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или `gcsgttct`, предпочтительно `gcggttct`, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

е) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

ж) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, где нуклеотидная последовательность предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующей положению 103-110 SEQ ID №: 1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения переваримость улучшается по сравнению с переваримостью линии кукурузы PH207 или (близкой) изогенной линии, которая не включает полинуклеотид, QTL (аллель) или один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения переваримость улучшается по меньшей мере на 5%, предпочтительно по меньшей мере на 10%, по сравнению с переваримостью кукурузы линии PH207 или (близкой) изогенной линии, не включающей полинуклеотид, QTL (аллель) или один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид или QTL (аллель) включает один или несколько маркерных аллелей изобретения, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид или QTL (аллель) включает мутировавший ген F35H, описанный в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к способу получения или создания растения или части растения кукурузы, включающему (а) предоставление первого растения, имеющего полинуклеотид, такой как QTL (аллель), например, QTL (аллель), связанный с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), описанной в настоящем документе, необязательно, где указанный QTL (аллель) расположен на

хромосомном интервале, предпочтительно на хромосоме 9, и включает и/или фланкирован (молекулярными) маркерами (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01, или входит в полинуклеотид или QTL (аллель), включающий и/или фланкированный (молекулярным) маркером (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01, или получение указанного первого растения из семени *Zea mays*, переданных на хранение в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43997 (или его потомства), (b) скрещивание указанного первого растения со вторым растением, таким которое не имеет указанного полинуклеотида, такого как указанный QTL (аллель), (c) отбор потомства растений, имеющих указанный полинуклеотид, такой как указанный QTL (аллель), и необязательно (d) сбор указанной части растения из указанного потомства.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к способу получения или создания растения или части растения кукурузы, включающему (a) предоставление первого растения, имеющего (молекулярный) маркерный аллель, такой как (молекулярный) маркерный аллель, связанный с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), выбранный из таблицы А; (b) скрещивание указанного первого растения со вторым растением, таким как второе растение, не имеющее указанного (молекулярного) маркерного аллеля, (c) отбор потомства, имеющего указанный (молекулярный) маркерный аллель, и, необязательно, (d) сбор указанной части растения из указанного потомства.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к способу получения или создания растения или части растения кукурузы, включающему (a) предоставление первого растения, имеющего (молекулярный) маркерный аллель, такой как (молекулярный) маркерный аллель, связанный с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), выбранный из таблицы В; (b) скрещивание указанного первого растения со вторым растением, таким как второе растение, не имеющее указанного (молекулярного) маркерного аллеля, (c) отбор потомства, имеющего указанный (молекулярный) маркерный аллель, и, необязательно, (d) сбор указанной части растения из указанного потомства.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к способу получения или создания растения или части растения кукурузы, включающему (a) предоставление первого растения, имеющего (молекулярный) маркерный аллель, такой как (молекулярный) маркерный аллель, связанный с улучшенной переваримостью

(вегетативной массы), выбранный из таблицы С; (b) скрещивание указанного первого растения со вторым растением, таким как второе растение, не имеющее указанного (молекулярного) маркерного аллеля, (c) отбор потомства, имеющего указанный (молекулярный) маркерный аллель, и, необязательно, (d) сбор указанной части растения из указанного потомства.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, QTL (аллель), (молекулярный) маркер (аллель) и/или мутация F35H в первом растении присутствуют в гомозиготном состоянии. В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, QTL (аллель), (молекулярный) маркер (аллель) и/или мутация F35H в первом растении присутствуют в гетерозиготном состоянии. В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, QTL (аллель), (молекулярный) маркер (аллель) и/или мутация F35H во втором растении присутствуют в гетерозиготном состоянии. В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, QTL (аллель), (молекулярный) маркер (аллель) и/или мутация F35H во втором растении не присутствуют.

В некоторых вариантах осуществления изобретения отбирают потомство, в котором полинуклеотид, QTL (аллель), (молекулярный) маркер (аллель) и/или мутировавший F35H изобретения присутствует в гомозиготном состоянии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения отбирают потомство, в котором полинуклеотид, QTL (аллель), (молекулярный) маркер (аллель) и/или мутировавший F35H изобретения присутствует в гетерозиготном состоянии.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к способу получения или создания растения или части растения кукурузы, включающему трансформацию растения или части растения кукурузы, предпочтительно растительной клетки, более предпочтительно незрелого или зрелого зародыша, соцветия, протопласта или каллуса, с указанным полинуклеотидом, указанным одним или несколькими (молекулярным) маркером (аллелем) или указанным QTL (аллелем), и, необязательно, регенерацию растения из указанной растительной клетки, предпочтительно незрелого или зрелого зародыша, соцветия, протопласта или каллуса.

Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления, растение или часть растения кукурузы не содержит эндогенно указанные полинуклеиновые кислоты, (молекулярный) маркер (аллель), QTL (аллель) и/или мутированный F35H.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способы получения растений или частей растений, описанные в настоящем документе согласно изобретению, например, способы получения растений или частей растений с улучшенной переваримостью, включают (или состоят из) трансгенез и/или редактирование генов и/или редактирование оснований, например, включая CRISPR/Cas, TALEN, ZFN, мегануклеазы; (индуцированный) мутагенез, который может быть или не быть случайным мутагенозом, например, TILLING. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы получения растений или частей растений, описанные в настоящем документе в соответствии с изобретением, например, способы получения растений или частей растений с улучшенной переваримостью, включают (или состоят из) применения РНК-интерференции, которые могут быть или не быть трансгенными применениями, включать трансгенные применения или быть связанными с ними. В качестве примера, нетрансгенные способы могут включать нанесение компонентов РНК-интерференции, таких как двуцепочечные малые интерферирующие РНК (siRNA), на растения или поверхности растений, например, в виде спрея. Стабильная интеграция в геном растения не требуется.

В некоторых вариантах осуществления, способы получения растений или частей растений, описанные в настоящем документе согласно изобретению, такие как способы получения растений или частей растений с улучшенной переваримостью, не включают или включают трансгенез, редактирование генов/оснований и/или мутагенез.

В некоторых вариантах осуществления, способы получения растений или частей растений, описанные в настоящем документе согласно изобретению, такие как способы получения растений или частей растений с улучшенной переваримостью, включают или состоят из селекции и отбора.

В некоторых вариантах осуществления, способы получения растений или частей растений, описанные в настоящем документе согласно изобретению, такие как способы получения растений или частей растений с улучшенной переваримостью, не включают и не состоят из селекции и отбора.

Нокдаун или нокаут F35H может быть осуществлен любым из методов мутагенеза, описанным в настоящем документе.

Специалисту понятно, что введение или мутация двух или нескольких последовательностей, генов, маркеров или аллелей, описанных в настоящем документе, может быть одновременным или последовательным, и что введение или мутация двух

или нескольких последовательностей, генов, маркеров или аллелей, описанных в настоящем документе, может происходить как рекомбинантно (например, путем трансформации), так и путем селекции. например, путем трансформации) или с помощью методов селекции (например, интрогрессии), или что введение одной из двух или нескольких последовательностей, генов, маркеров или аллелей может быть рекомбинантным, а другой - с помощью методов селекции (например, интрогрессии).

В одном из аспектов изобретение относится к растению или части растения кукурузы, полученным или получаемым с помощью описанных здесь способов изобретения, таких как способы создания, производства или получения растений, или частей растения, в частности, растений или частей растения с улучшенной переваримостью (вегетативной массы). Изобретение также относится к потомству таких растений.

В одном из аспектов изобретение относится к растению или части растения, включающим полинуклеотид, такой как QTL (аллель), в частности связанный с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), причем указанный полинуклеотид, такой как QTL (аллель), включает нуклеотидную последовательность гена, кодирующего флавоноид 3',5'-гидроксилазу цитохрома P450 (F35H) с мутацией.

В некоторых вариантах осуществления, QTL (аллель) расположен на хромосоме 9 и включает и/или фланкирован (молекулярными) маркерами (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01, или входит в состав полинуклеотида или QTL (аллеля), включающего и/или фланкированного (молекулярными) маркерами (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01.

В некоторых вариантах осуществления изобретения QTL (аллель) расположен на хромосоме 9 и включает один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из таблицы A8, предпочтительно все (необязательно за исключением одного - ma61134d15ma61134d15 или ma61134d16).

В некоторых вариантах осуществления изобретения QTL (аллель) расположен на хромосоме 9 и включает один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из таблицы B, предпочтительно все (необязательно за исключением одного - ma61134d15ma61134d15 или ma61134d16).

В некоторых вариантах осуществления изобретения QTL (аллель) расположен на хромосоме 9 и включает один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из таблицы С.

В одном из аспектов изобретение относится к растению или части растения, включающим нуклеотидную последовательность гена, кодирующего флавоноид 3',5'-гидроксилазу цитохрома P450 (F35H) с мутацией.

В одном из аспектов изобретение относится к растению или части растения, включающим один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей), выбранных из таблицы А, предпочтительно все (необязательно за исключением одного - ma61134d15 или ma61134d16).

В одном из аспектов изобретение относится к растению или части растения, включающим один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей), выбранных из таблицы В, предпочтительно все (необязательно за исключением одного - ma61134d15 или ma61134d16).

В одном из аспектов изобретение относится к растению или части растения, включающим один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей), выбранных из таблицы С, предпочтительно все.

В одном из аспектов изобретение относится к растению или части растения, включающим:

- а) нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 7;
- б) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;
- в) нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 7 или 8;

г) нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 9;

где нуклеотидная последовательность, указанная в пунктах а) - г), имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов не кратного трем, более предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тимином в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8; или

д) нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

е) нуклеотидную последовательность, имеющую кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

ж) нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, где нуклеотидная последовательность предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

Специалисту понятно, что указанные полинуклеиновые кислоты могут быть оперативно связаны с одной или несколькими регуляторными последовательностями, в частности, регуляторными последовательностями, осуществляющими транскрипцию указанного полинуклеотида, в частности, кодирующей области указанного полинуклеотида. Такие регуляторные последовательности могут включать подходящие (растительные) промоторы, сайты инициации транскрипции, сайты терминации транскрипции и т.д., известные в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления изобретения растение не является разновидностью растения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ген F35H дикого типа или немутированный ген включает:

(i) нуклеотидную последовательность, включающую последовательность SEQ ID №: 7;

(ii) нуклеотидную последовательность, имеющую кДНК или кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;

- (iii) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9;
- (iv) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 60% идентичную последовательности SEQ ID №: 7, или 8; например, по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, предпочтительно по меньшей мере на 85% идентичную указанной последовательности, более предпочтительно по меньшей мере на 90% идентичную указанной последовательности или по меньшей мере на 95% идентичную указанной последовательности;
- (v) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, по меньшей мере на 60% идентичный последовательности SEQ ID №: 9; например, по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, предпочтительно по меньшей мере на 85% идентичный указанной последовательности, более предпочтительно по меньшей мере на 90% идентичный указанной последовательности или по меньшей мере на 95% идентичный указанной последовательности;
- (vi) нуклеотидную последовательность, гибридизующуюся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, определенной в (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и
- (vii) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, полученный из полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью любого из пунктов (i)-(vi), путем замены, делеции и/или добавления одной или нескольких аминокислоты (аминокислот).

В некоторых вариантах осуществления изобретения ген F35H дикого типа или немутированный ген включает:

- (i) нуклеотидную последовательность, включающую последовательность SEQ ID №: 7;
- (ii) нуклеотидную последовательность, имеющую кДНК или кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;
- (iii) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ген F35H дикого типа или немутированный ген включает:

- (i) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 60% идентичную последовательности SEQ ID №: 7, или 8; например, по меньшей мере на 65%, 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, предпочтительно по меньшей мере на 85% идентичную указанной последовательности, более предпочтительно по меньшей мере на 90% идентичную указанной последовательности или по меньшей мере на 95% идентичную указанной последовательности; или

(ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, по меньшей мере на 60% идентичный последовательности SEQ ID №: 9; например, по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, предпочтительно по меньшей мере на 85% идентичный указанной последовательности, более предпочтительно по меньшей мере на 90% идентичный указанной последовательности или по меньшей мере на 95% идентичный указанной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ген F35H дикого типа или немутированный ген включает:

(i) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 60% идентичную последовательности SEQ ID №: 8; например, по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, предпочтительно по меньшей мере на 85% идентичную указанной последовательности, более предпочтительно по меньшей мере на 90% идентичную указанной последовательности или по меньшей мере на 95% идентичную указанной последовательности; или

(ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, по меньшей мере на 60% идентичный последовательности SEQ ID №: 9; например, по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, предпочтительно по меньшей мере на 85% идентичный указанной последовательности, более предпочтительно по меньшей мере на 90% идентичный указанной последовательности или по меньшей мере на 95% идентичный указанной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ген F35H дикого типа или немутированный ген включает:

(i) нуклеотидную последовательность, гибридизирующуюся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7 или SEQ ID №: 8, при жестких условиях гибридизации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ген F35H дикого типа или немутированный ген включает; или

(ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, полученный из полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью SEQ ID №: 7 или SEQ ID №: 8, путем замены, делеции и/или добавления одной или нескольких аминокислоты (аминокислот).

Специалисту понятно, что дикий тип или немутированный генный продукт F35H представляет собой функциональный генный продукт, обладающий ферментативной активностью, определенной в настоящем документе. Специалисту также понятно, что описанные выше вариации последовательности для F35H дикого типа не включают сдвиг рамки считывания или нонсенс-мутации.

Используемый в данном документе, мутировавший F35H или мутация в F35H может включать или относиться к любому типу мутации F35H. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутация изменяет экспрессию белка дикого типа или природного белка и/или мРНК F35H. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутация снижает или устраняет экспрессию белка (дикого типа или природного) и/или мРНК F35H, описанных в настоящем документе. Мутации могут влиять на транскрипцию и/или трансляцию. Мутации могут происходить в экзонах или интронах. Мутации могут происходить в регуляторных элементах, таких как промоторы, энхансеры, терминаторы, инсуляторы и т.д. Мутации могут происходить в кодирующих последовательностях. Мутации могут происходить в сигнальных сайтах сплайсинга, таких как донорные или акцепторные сайты сплайсинга. Мутации могут быть мутациями сдвига рамки считывания. Мутации могут быть нонсенс-мутациями. Мутации могут представлять собой инсерцию или делецию одного или нескольких нуклеотидов. Мутации могут быть неконсервативными мутациями (при которых одна или несколько аминокислот дикого типа заменяются одной или несколькими аминокислотами недикого типа). Мутации могут влиять или изменять функцию белка F35H, например, ферментативную активность. Мутации могут снижать или (в значительной степени) устранять функцию белка F35H, например, ферментативную активность. Снижение функции, например, снижение ферментативной активности, может относиться к снижению по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 30%, более предпочтительно по меньшей мере на 50%, например, по меньшей мере на 20%, 40%, 60%, 80% или более, например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или более. (Существенно) устраненная функция, такая как

(существенно) устраненная ферментативная активность, может означать снижение по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%. Мутации могут быть доминантно-негативными мутациями. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутации оценивают по отношению к инбредной линии кукурузы PH207, определенной в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мутация F35H представляет собой инсерцию одного или нескольких нуклеотидов в кодирующую последовательность. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутация F35H представляет собой нонсенс-мутацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутация F35H приводит к изменению экспрессии гена F35H. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутация F35H приводит к нокауту гена F35H или нокауту мРНК и/или белка F35H. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутация приводит к сдвигу рамки считывания кодирующей последовательности F35H. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутация приводит к изменению последовательности белка, кодируемого геном F35H.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мутация F35H представляет собой инсерцию, предпочтительно в экзон, предпочтительно в первый экзон, одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно инсерцию со сдвигом рамки считывания. В некоторых вариантах осуществления изобретения инсерция составляет 7 или 8 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения инсерция находится между положениями 102 и 103 гена F35H, представленного нуклеотидной последовательностью SEQ ID №: 7. Специалист способен определить соответствующее положение в гомологах или ортологах F35H. В некоторых вариантах осуществления изобретения инсерция включает или состоит из нуклеотидной последовательности gcs~~g~~gtct, например, gcggtct. В некоторых вариантах осуществления изобретения инсерция включает или состоит из нуклеотидной последовательности gcs~~g~~gtct, например, gcggttct. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутировавший F35H включает нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 1 или 4, или имеет кДНК или кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5, или кодирует белок, имеющий последовательность SEQ ID №: 3 или 6. Альтернативно, мутация представляет собой субституцию, предпочтительно субституцию по меньшей мере одной нуклеиновой

кислоты, приводящую к замене по меньшей мере одной аминокислоты или к замене кодирующей аминокислоты кодона на стоп-кодон.

Экспрессия мРНК и/или белка гена F35H может быть снижена или устранена путем мутации самого гена F35H (включая кодирующий, некодирующий и регуляторный элемент). Способы введения мутаций описаны в настоящем документе. Альтернативно, экспрессия мРНК и/или белка гена F35H может быть снижена или устранена путем (специфического) вмешательства в транскрипцию и/или трансляцию, например, для снижения или устранения транскрипции, или трансляции мРНК и/или белка. Альтернативно, экспрессия мРНК и/или белка гена F35H может быть снижена или устранена путем (специфического) вмешательства в стабильность мРНК и/или белка, например, для снижения стабильности мРНК и/или белка. Например, стабильность мРНК может быть снижена с помощью РНК-интерференции, описанной в настоящем документе. Также для воздействия на стабильность мРНК можно использовать микроРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения сниженная экспрессия F35H, которая достигается путем снижения стабильности мРНК или белка, также охватывается термином "мутированный" F35H. В некоторых вариантах осуществления изобретения сниженная экспрессия F35H, которая достигается путем снижения стабильности мРНК или белка, не охватывается термином "мутированный" F35H.

В одном из аспектов изобретение относится к использованию одной или нескольких полинуклеиновых кислот или QTL (аллелей) согласно изобретению, описанных в других разделах настоящего документа, для производства или создания растения, или части растения, в частности с улучшенной переваримостью (вегетативной массы).

В одном из аспектов изобретение относится к использованию одного или нескольких из описанных в настоящем документе (молекулярных) маркеров, для идентификации растения или части растения, в частности, с улучшенной переваримостью (вегетативной массы). В одном из аспектов изобретение относится к использованию одного или нескольких из описанных в настоящем документе (молекулярных) маркеров, способных обнаруживать по меньшей мере один (диагностический) маркерный аллель для идентификации растения или части растения, в частности, имеющих улучшенную переваримость (вегетативной массы). В одном из аспектов изобретение относится к обнаружению одного или нескольких из описанных в настоящем документе (молекулярных) маркеров (аллелей) для идентификации растения или части растения, в частности с улучшенной переваримостью (вегетативной массы), или для различения

растений или частей растения, в частности растений и частей растения с улучшенной переваримостью (вегетативной массы) от растений или частей растения, не имеющих улучшенной переваримости (вегетативной массы).

Маркерные аллели изобретения, описанные в настоящем документе, могут быть диагностическими маркерными аллелями, которые можно использовать для идентификации и/или отбора растений или частей растений с улучшенной переваримостью, предпочтительно с улучшенной переваримостью вегетативной массы.

В одном из аспектов изобретение относится к (выделенной) полинуклеиновой кислоте, включающей (молекулярный) маркерный аллель изобретения или его (уникальный) фрагмент, или комплемент или обратный комплемент (молекулярного) маркерного аллеля изобретения или его (уникальный) фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к полинуклеиновой кислоте, включающей по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 17 или 18 смежных нуклеотидов, например, по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов (молекулярного) маркера (аллеля) изобретения, или комплемента или обратного комплемента (молекулярного) маркера (аллеля) изобретения. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, фрагмент включает по меньшей мере один нуклеотид полиморфизма соответствующего (молекулярного) маркера (аллеля) или его комплемент или обратный комплемент.

В одном из аспектов изобретение относится к (выделенному) полинуклеотиду, включающему полинуклеиновую кислоту, имеющую последовательность, выбранную из:

- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;
- б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;
- в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 7 или 8;
- г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 9;

где нуклеотидная последовательность, указанная в пунктах а)-г), имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов не кратного трем,

более предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тиминном в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8; или

д) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

е) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

ж) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6;

или (уникальный) фрагмент последовательности, указанной в пунктах а) - ж);

или комплемент или обратный комплемент последовательности, указанной в пунктах а)-ж) или ее (уникальный) фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение касается полинуклеиновой кислоты, включающей по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 17 или 18 смежных нуклеотидов, например, по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов любой из SEQ ID №: 13-195, или ее комплемента или обратного комплемента, и предпочтительно включающей соответствующий полиморфизм (или по меньшей мере самый большой 5' или самый большой 3' нуклеотид полиморфизма, например, в случае инсерции или делеции), указанный в таблице А, предпочтительно, когда указанный полиморфизм (или по меньшей мере один его нуклеотид) представляет собой самый большой 3' нуклеотид, второй по величине 3' нуклеотид или третий по величине 3' нуклеотид, предпочтительно самый большой 3' нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение касается полинуклеиновой кислоты, включающей по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, предпочтительно по меньшей

мере 15 смежных нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 17 или 18 смежных нуклеотидов, например, по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов любой из SEQ ID №: 109-154, или ее комплемента или обратного комплемента, и предпочтительно включающей соответствующий полиморфизм (или по меньшей мере самый большой 5' или самый большой 3' нуклеотид полиморфизма, например, в случае инсерции или делеции), указанный в таблице А, предпочтительно, когда указанный полиморфизм (или по меньшей мере один его нуклеотид) представляет собой самый большой 3' нуклеотид, второй по величине 3' нуклеотид или третий по величине 3' нуклеотид, предпочтительно самый большой 3' нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение касается полинуклеиновой кислоты, включающей по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 17 или 18 смежных нуклеотидов, например, по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов любой из SEQ ID №: 124, 125, или ее комплемента или обратного комплемента, и предпочтительно включающей соответствующий полиморфизм (или по меньшей мере самый большой 5' или самый большой 3' нуклеотид полиморфизма, например, в случае инсерции или делеции), указанный в таблице А, предпочтительно, когда указанный полиморфизм (или по меньшей мере один его нуклеотид) представляет собой самый большой 3' нуклеотид, второй по величине 3' нуклеотид или третий по величине 3' нуклеотид, предпочтительно самый большой 3' нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеиновая кислота способна различать (молекулярный) маркер (аллель) изобретения от немолекулярного маркерного аллеля, например, специфически гибридизоваться с (молекулярным) маркерным аллелем изобретения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеиновая кислота способна гибридизоваться с уникальным нуклеотидным фрагментом или участком любой из SEQ ID №: 1, 2, 4, 5, 13-195, или с комплементом или обратным комплементом любой из SEQ ID №: 1, 2, 4, 5, 13-195, предпочтительно из SEQ ID №: 1, 2, 4, 5, или 109-154, более предпочтительно любой из SEQ ID №: 1, 2, 4, 5, 124 или 125, и предпочтительно включает соответствующий полиморфизм (или по меньшей мере самый большой 5' или самый большой 3' нуклеотид полиморфизма, например, в случае инсерции или делеции), указанный в таблице А, предпочтительно, когда указанный полиморфизм (или по меньшей мере один его нуклеотид) представляет собой самый большой 3' нуклеотид,

второй по величине 3' нуклеотид или третий по величине 3' нуклеотид, предпочтительно самый большой 3' нуклеотид.

Следует понимать, что (уникальный) участок или фрагмент предпочтительно относится к участку или фрагменту, включающему однонуклеотидный полиморфизм (SNP) (или по меньшей мере один уникальный нуклеотид полиморфизма в случае, например, инсерции или делеции) или соответствующие маркерные аллели изобретения (такие как, например, указанные в таблице А, В или С), или к участку или фрагменту, включающему 5' или 3' стык вставки маркерного аллеля изобретения, или к участку или фрагменту, находящемуся внутри вставки маркерного аллеля изобретения, или к участку или фрагменту, включающему стык делеции маркерного аллеля изобретения. В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеиновая кислота или ее комплемент, или обратный комплемент не гибридизуется (по существу) с (геномной) ДНК, происходящей из инбредной линии кукурузы PH207, или не связывается с ней. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность полинуклеиновой кислоты или ее комплемента, или обратного комплемента не встречается или не присутствует в инбредной линии кукурузы PH207.

В одном из аспектов изобретение относится к (выделенному) полинуклеотиду, включающему или входящему в QTL (аллель), в частности ассоциированный с улучшенной переваримостью, (на хромосоме 9) и включающему и/или фланкированному (молекулярным) маркером (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01, или содержащемуся в полинуклеотиде или QTL (аллеле), включающем и/или фланкированном (молекулярным) маркером (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и ma61161s01; его комплементу или обратному комплементу; или его (уникальному) фрагменту, его комплементу или обратному комплементу.

В одном из аспектов изобретение относится к полинуклеиновой кислоте, способной специфически гибридизоваться с (молекулярным) маркерным аллелем изобретения, или ее комплемента, или ее обратного комплемента, и предпочтительно включающей соответствующий полиморфизм (или по меньшей мере самый большой 5' или самый большой 3' нуклеотид полиморфизма, например, в случае инсерции или делеции), указанный в таблице А, предпочтительно, где указанный полиморфизм (или по меньшей мере один его нуклеотид) является самым большим 3' нуклеотидом, вторым по величине

3' нуклеотидом или третьим по величине 3' нуклеотидом, предпочтительно самым большим 3' нуклеотидом.

В одном из аспектов изобретение относится к полинуклеиновой кислоте, способной специфически гибридизоваться с полинуклеотидом, имеющим последовательность, изложенную в любой из SEQ ID №: 13-195, или ее комплементу, или обратному комплементу, и предпочтительно включающей соответствующий полиморфизм (или по меньшей мере самый большой 5' или самый большой 3' нуклеотид полиморфизма, например, в случае инсерций или делеций), указанный в таблице А, предпочтительно, где указанный полиморфизм (или по меньшей мере один его нуклеотид) представляет собой самый большой 3' нуклеотид, второй по величине 3' нуклеотид или третий по величине 3' нуклеотид, предпочтительно самый большой 3' нуклеотид.

В одном из аспектов изобретение относится к полинуклеиновой кислоте, способной специфически гибридизоваться с полинуклеотидом, имеющим последовательность, изложенную в любой из SEQ ID №: 109-154, или ее комплементу, или обратному комплементу, и предпочтительно включающей соответствующий полиморфизм (или по меньшей мере самый большой 5' или самый большой 3' нуклеотид полиморфизма, например, в случае инсерций или делеций), указанный в таблице А, предпочтительно, где указанный полиморфизм (или по меньшей мере один его нуклеотид) является самым большим 3' нуклеотидом, вторым по величине 3' нуклеотидом или третьим по величине 3' нуклеотидом, предпочтительно самым большим 3' нуклеотидом.

В одном из аспектов изобретение относится к полинуклеиновой кислоте, способной специфически гибридизоваться с полинуклеотидом, имеющим последовательность, изложенную в любой из SEQ ID №: 124-125, или ее комплементу, или обратному комплементу, и предпочтительно включающей соответствующий полиморфизм (или по меньшей мере самый большой 5' или самый большой 3' нуклеотид полиморфизма, например, в случае инсерций или делеций), указанный в таблице А, предпочтительно, где указанный полиморфизм (или по меньшей мере один его нуклеотид) представляет собой самый большой 3' нуклеотид, второй по величине 3' нуклеотид или третий по величине 3' нуклеотид, предпочтительно самый большой 3' нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеиновая кислота представляет собой праймер. В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеиновая кислота представляет собой зонд. В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеиновая кислота представляет собой аллель-

специфичный праймер. В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеиновая кислота представляет собой праймер KASP.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеиновая кислота представляет собой аллель-специфичную полинуклеиновую кислоту, например, аллель-специфичный праймер или зонд.

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

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеиновая кислота включает от 15 до 500 нуклеотидов, предпочтительно от 17 до 100 нуклеотидов, более предпочтительно от 17 до 50 нуклеотидов, наиболее предпочтительно от 17 до 30 нуклеотидов.

Специалисту понятно, что полинуклеиновые кислоты, такие как праймеры или зонды, могут также включать (5') дополнительные нуклеотиды, которые, например, могут служить в качестве метки, хвоста или штрих-кода.

Следует понимать, что "специфически гибридизирующаяся" означает, что полинуклеиновая кислота гибридизуется с (молекулярным) маркерным аллелем (например, при жестких условиях гибридизации, определенных в настоящем документе), но не гибридизуется (по существу) с полинуклеиновой кислотой, не содержащей маркерный аллель, или (по существу) не способна использоваться в качестве ПЦР-праймера. Например, в подходящем считывании, сигнал гибридизации с маркерным аллелем или ПЦР-амплификации маркерного аллеля по меньшей мере в 5 раз, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз или более сильнее, чем сигнал гибридизации с немаркерным аллелем или любой другой последовательностью.

В одном из аспектов изобретение относится к набору, включающему такие полинуклеиновые кислоты, как праймеры (прямые и/или обратные праймеры) и/или зонды. Набор может также содержать инструкцию по применению.

Следует понимать, что в вариантах осуществления изобретения, относящихся к набору прямых и обратных праймеров, только один из двух праймеров (прямой или обратный) может быть способным различать (молекулярный) маркерный аллель изобретения от немаркерного аллеля, и, следовательно, может быть уникальным. Другой праймер может

быть или не быть способным различать (молекулярный) маркерный аллель изобретения от немаркерного аллеля, и, следовательно, может быть или не быть уникальным.

Необходимо дополнительно указать, без ограничений, что настоящее изобретение охватывается приведенными ниже аспектами и вариантами осуществления.

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, включающему скрининг на наличие полинуклеотида, включающего (молекулярный) маркер (аллель) *ma61134d15* и/или *ma61134d16* в растении или части растения кукурузы (геноме).

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид включает или входит в QTL (аллель), в частности, связанный с улучшенной переваримостью, на хромосоме 9 и включает и/или фланкирован (молекулярными) маркерами (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и *ma61161s01* или входит в полинуклеотид или QTL (аллель), включающий и/или фланкированный (молекулярным) маркером (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и *ma61161s01*.

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, включающему скрининг на наличие QTL (аллеля), в частности, связанного с улучшенной переваримостью на хромосоме 9 и включающего и/или фланкированного (молекулярным) маркером (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и *ma61161s01* или состоящего из полинуклеотида или QTL (аллеля), включающего и/или фланкированного (молекулярным) маркером (аллелями) SYN38529 и PZE-109103504, предпочтительно PZE-109076467 и *ma61161s01*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения QTL (аллель) включает (молекулярный) маркер (аллель) *ma61134d15* и/или *ma61134d16*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает скрининг на наличие одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей), выбранных из таблицы А.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает скрининг на наличие одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей), выбранных из таблицы В.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает скрининг на наличие одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей), выбранных из таблицы С.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид включает один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей), определенных в пункте 5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения QTL (аллель) включает один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей), выбранных из таблицы А, таблицы В или таблицы С.

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, включающему скрининг или обнаружение присутствия одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей), выбранных из таблицы А, таблицы В или таблицы С в растении или части растения кукурузы (геноме).

В некоторых вариантах осуществления изобретения маркер входит в QTL, в частности связанный с улучшенной переваримостью, на хромосоме 9, фланкированный (молекулярным) маркером (аллелем) SYN38529 и PZE-109103504, и/или включающий его.

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, включающему скрининг в растении или части растения кукурузы (геноме) на наличие полинуклеотида, включающего последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;
- б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;
- в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 7 или 8;
- г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 9;

где нуклеотидная последовательность имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов не кратного трем, более предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тиминном в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8.

В некоторых вариантах осуществления изобретения инсерция 8 нуклеотидов имеет последовательность gcsgttct, или инсерция 7 нуклеотидов имеет последовательность gcsgtct.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из:

- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcsgttct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcsgttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;
- б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcsgttct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcsgttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;
- в) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcsgttct, в положении, соответствующем соответственно положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcsgttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

В одном из аспектов изобретение относится к способу идентификации растения или части растения кукурузы, включающему скрининг в растении или части растения кукурузы (геноме) на наличие полинуклеотида, включающего последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcsgttct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcsgttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcgggtct, в положении, соответствующем соответственно положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

в) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, где нуклеотидная последовательность предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcgggtct, в положении, соответствующем соответственно положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ представляет собой способ идентификации растения или части растения с улучшенной переваримостью.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ представляет собой способ идентификации растения или части растения с улучшенной переваримостью вегетативной массы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения переваримость улучшается по сравнению с переваримостью кукурузы линии PH207 или (близкой) изогенной линии, которая не включает полинуклеотид, QTL (аллель) или один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная переваримость по меньшей мере на 5%, предпочтительно по меньшей мере на 10%, улучшается, по сравнению с переваримостью кукурузы линии PH207 или (близкой) изогенной линии, не включающей полинуклеотид, QTL (аллель) или один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно включает выделение геномной ДНК из растения или части растения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно включает отбор растения или части растения, содержащих полинуклеотид, один или несколько из (молекулярных) маркеров (аллелей) или QTL (аллель).

В некоторых вариантах осуществления изобретения часть растения не является материалом для размножения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения часть растения представляет собой вегетативную массу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения растение или часть растения включает полинуклеотид, имеющий последовательность, выбранную из:

- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;
- б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;
- в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 7 или 8;

г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 9;

где нуклеотидная последовательность, указанная в пунктах а) - г), имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов не кратного трем, более предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тиминном в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8; или

д) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcs_ggtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcs_ggttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

е) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcs_ggtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcs_ggttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

ж) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6,

которая предпочтительно включает gcs_ggtct, более предпочтительно gcs_ggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcs_ggtct, предпочтительно gcs_ggtct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения растение или часть растения определяются как имеющие улучшенную переваримость, если полинуклеотид, один или несколько из (молекулярных) маркеров (аллелей) или QTL (аллель) присутствуют в геноме указанного растения или части растения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения растение или часть растения определяются как имеющие улучшенную переваримость вегетативной массы, если полинуклеотид, один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) или QTL (аллель) присутствуют в геноме указанного растения или части растения.

В одном из аспектов изобретение относится к растению или части растения кукурузы, включающим один или несколько (молекулярных) маркерных (аллелей), определенных в таблице А.

В одном из аспектов изобретение относится к растению или части растения кукурузы, включающим один или несколько (молекулярных) маркерных (аллелей), определенных в таблице В.

В одном из аспектов изобретение относится к растению или части растения кукурузы, включающим один или несколько (молекулярных) маркерных (аллелей), определенных в таблице С.

В одном из аспектов изобретение относится к растению или части растения кукурузы, включающим полинуклеотид или QTL (аллель), описанные выше.

В некоторых вариантах осуществления изобретения растение или часть растения получены из растения, включающего указанный полинуклеотид, указанный (молекулярный) маркер (аллель) или указанный QTL (аллель), полученные путем интродукции или интрогрессии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения растение или часть растения являются результатом мутагенеза, опосредованного транспозоном или транспозируемым элементом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения растение или часть растения являются трансгенными или генно-редактированными.

В одном из аспектов изобретение относится к способу создания или производства растения, или части растения кукурузы и/или улучшения переваримости (вегетативной массы), включающему введение в геном растения или части растения кукурузы полинуклеотида, одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей) или QTL (аллеля), описанных выше.

В одном из аспектов изобретение относится к способу создания или производства растения, или части растения кукурузы и/или улучшения переваримости (вегетативной массы), включающему введение в геном растения или части растения кукурузы полинуклеотида, имеющего последовательность, выбранную из:

- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;
 - б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;
 - в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 7 или 8;
 - г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 9;
- где нуклеотидная последовательность, указанная в пунктах а) - г), имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов не кратного трем, более предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тиминном в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8; или
- д) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgtct, предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;
 - е) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgtct, предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

ж) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение в геном включает интрогрессию.

В определенных вариантах осуществления изобретения, способ включает этапы; (а) предоставление первого растения кукурузы, имеющего полинуклеотид, один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) или QTL (аллель), определенные в любом из пунктов 1-9, или полученного из семян *Zea mays*, переданных на хранение под регистрационным номером NCIMB 43997 (или их потомства), (b) скрещивание указанного первого растения кукурузы со вторым растением кукурузы, и (c) отбор потомства, имеющего полинуклеотид, один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) или QTL (аллель), определенные в любом из пунктов 1 - 9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно включает (d) сбор части растения из указанного потомства.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение в геном включает мутагенез, опосредованный транспозоном или транспозируемым элементом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение в геном включает трансгенез или редактирование генов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения часть растения представляет собой растительную клетку, ткань, орган или семя.

В некоторых вариантах осуществления изобретения часть растения представляет собой незрелый или зрелый зародыш, соцветие, протопласт или каллус.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает этапы трансформации растения или части растения, предпочтительно растительной клетки, более предпочтительно незрелого или зрелого зародыша, соцветия, протопласта или каллуса, с указанным полинуклеотидом, указанным одним или несколькими (молекулярными) маркерами (аллелями) или указанным QTL (аллелем), и,

необязательно, регенерации растения из указанной растительной клетки, предпочтительно незрелого или зрелого зародыша, соцветия, протопласта или каллуса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ представляет собой способ улучшения переваримости растения или части растения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ представляет собой способ улучшения переваримости вегетативной массы.

В некоторых вариантах осуществления часть растения представляет собой вегетативную массу.

В одном из аспектов изобретение относится к растению или части растения кукурузы, полученным описанным выше способом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, указанный один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) или указанный QTL (аллель) являются гомозиготными.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, указанный один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) или указанный QTL (аллель) являются гетерозиготными.

В одном из аспектов изобретение относится к использованию молекулярного маркера, определенного в таблице А, для идентификации или отбора растения, или части растения кукурузы.

В одном из аспектов изобретение относится к использованию молекулярного маркера, определенного в таблице В, для идентификации или отбора растения, или части растения кукурузы.

В одном из аспектов изобретение относится к использованию молекулярного маркера, определенного в таблице С, для идентификации или отбора растения, или части растения кукурузы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения маркер используется для идентификации или отбора растения, или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью.

В некоторых вариантах осуществления изобретения маркер используется для идентификации или отбора растения, или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью вегетативной массы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения переваримость улучшается по сравнению с переваримостью линии кукурузы PH207 или (близкой) изогенной линии, которая не включает полинуклеотид, QTL (аллель), один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения переваримость улучшается по меньшей мере на 5%, предпочтительно по меньшей мере на 10%, по сравнению с переваримостью кукурузы линии PH207 или (близкой) изогенной линии, не включающей полинуклеотид, QTL (аллель), один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения часть растения представляет собой вегетативную массу.

В одном из аспектов изобретение относится к использованию полинуклеотида или QTL (аллеля), определенных в настоящем документе, согласно изобретению, для создания или производства растения, или части растения кукурузы.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к использованию полинуклеотида или QTL (аллеля), определенных в настоящем документе, согласно изобретению, для создания или производства растения, или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к использованию полинуклеотида или QTL (аллеля), определенных в настоящем документе, согласно изобретению, для создания или производства растения, или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью вегетативной массы.

В определенных вариантах осуществления изобретения, переваримость улучшается по сравнению с переваримостью линии кукурузы PH207 или (близкой) изогенной линии, которая не включает полинуклеотид, QTL (аллель), один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.

В определенных вариантах осуществления изобретения, переваримость улучшается по меньшей мере на 5%, предпочтительно по меньшей мере на 10%, по сравнению с переваримостью кукурузы линии PH207 или (близкой) изогенной линии, не включающей полинуклеотид, QTL (аллель), один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения часть растения представляет собой зерно или вегетативную массу.

В одном из аспектов изобретение относится к (выделенному) полинуклеотиду, включающему полинуклеиновую кислоту, имеющую последовательность, выбранную из:

- а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;
- б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;
- в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 7 или 8;

г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 9;

где нуклеотидная последовательность, указанная в пунктах а) - г), имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов не кратного трем, более предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тиминном в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8; или

д) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgtct, предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

е) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgtct, предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

ж) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, где нуклеотидная последовательность предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID

№: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

В одном из аспектов изобретение относится к использованию (выделенного) полинуклеотида для создания или производства растения, или части растения кукурузы.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к использованию (выделенного) полинуклеотида для создания или производства растения, или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к использованию (выделенного) полинуклеотида для создания или производства растения, или части растения кукурузы с улучшенной переваримостью вегетативной массы.

В определенных вариантах осуществления изобретения, переваримость улучшается по сравнению с переваримостью линии кукурузы PH207 или (близкой) изогенной линии, которая не включает полинуклеотид, QTL (аллель), один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения переваримость улучшается по меньшей мере на 5%, предпочтительно по меньшей мере на 10%, по сравнению с переваримостью кукурузы линии PH207 или (близкой) изогенной линии, не включающей полинуклеотид, QTL (аллель), один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) из любого из предыдущих пунктов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения растительная часть представляет собой вегетативную массу.

В одном из аспектов изобретение подразумевает (выделенный) полинуклеотид, включающий (молекулярный) маркер (аллель), выбранный из таблицы А, его комплемент или обратный комплемент, или его фрагмент.

В одном из аспектов изобретение подразумевает (выделенный) полинуклеотид, включающий (молекулярный) маркер (аллель), выбранный из таблицы В, его комплемент или обратный комплемент, или его фрагмент.

В одном из аспектов изобретение подразумевает (выделенный) полинуклеотид, включающий (молекулярный) маркер (аллель), выбранный из таблицы С, его комплемент или обратный комплемент, или его фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения (выделенный) полинуклеотид включает от 10 до 500 нуклеотидов, предпочтительно от 15 до 250 нуклеотидов, более предпочтительно от 18 до 250 нуклеотидов, наиболее предпочтительно от 20 до 250 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения (выделенная) полинуклеиновая кислота, в частности, подходящая в качестве молекулярного маркера, включает по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 18, более предпочтительно по меньшей мере 20, смежных нуклеотидов любой из SEQ ID №: 13-195, или нуклеотидов комплементарных смежным нуклеотидам любой из SEQ ID №: 13-195, или нуклеотидов обратно комплементарных смежным нуклеотидам любой из SEQ ID №: 13-195, и предпочтительно включает по меньшей мере один нуклеотид соответствующего полиморфизма (донорского аллеля), представленного в таблице А.

В некоторых вариантах осуществления изобретения (выделенная) полинуклеиновая кислота, в частности, подходящая в качестве молекулярного маркера, включает по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 18, более предпочтительно по меньшей мере 20, смежных нуклеотидов любой из SEQ ID №: 109-154, или нуклеотидов комплементарных смежным нуклеотидам любой из SEQ ID №: 109-154, или нуклеотидов обратно комплементарных смежным нуклеотидам любой из SEQ ID №: 109-154, и предпочтительно включает по меньшей мере один нуклеотид соответствующего полиморфизма (донорского аллеля), представленного в таблице А.

В некоторых вариантах осуществления изобретения (выделенная) полинуклеиновая кислота, в частности, подходящая в качестве молекулярного маркера, включает по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 18, более предпочтительно по меньшей мере 20, смежных нуклеотидов любой из SEQ ID №: 124, 125, или нуклеотидов комплементарных смежным нуклеотидам любой из SEQ ID №: 124, 125, или нуклеотидов обратно комплементарных смежным нуклеотидам любой из SEQ ID №: 124-125, и предпочтительно включает по меньшей мере один нуклеотид соответствующего полиморфизма (донорского аллеля), представленного в таблице А.

В некоторых вариантах осуществления изобретения (выделенный) полинуклеотид является специфичным для растения или части растения с улучшенной переваримостью вегетативной массы.

В одном из аспектов изобретение относится к (выделенной) полинуклеиновой кислоте, специфически гибридизующейся с молекулярным маркером таблицы А, его комплементом или обратным комплементом.

В одном из аспектов изобретение относится к (выделенной) полинуклеиновой кислоте, специфически гибридизующейся с молекулярным маркером таблицы В, его комплементом или обратным комплементом.

В одном из аспектов изобретение относится к (выделенной) полинуклеиновой кислоте, специфически гибридизующейся с молекулярным маркером таблицы С, его комплементом или обратным комплементом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения (выделенная) полинуклеиновая кислота представляет собой праймер или зонд.

В некоторых вариантах осуществления изобретения (выделенная) полинуклеиновая кислота представляет собой аллель-специфический праймер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения (выделенная) полинуклеиновая кислота представляет собой праймер KASP.

В одном из аспектов изобретение относится к праймеру или зонду, способному специфически детектировать полинуклеотид, один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) или QTL (аллель) изобретения, описанные в других разделах настоящего документа.

В одном из аспектов изобретение относится к набору праймеров, способных специфически детектировать полинуклеотид, один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей) или QTL (аллель) изобретения, описанные в других разделах настоящего документа.

В одном из аспектов изобретение относится к семенам *Zea mays*, обозначенным K0001, репрезентативный образец которых был передан на хранение в NCIMB (Национальную коллекцию промышленных пищевых и морских бактерий; Ltd. Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA Scotland), под регистрационным номером NCIMB 43997, 6 июля 2022 года, или к растениям или частям растений, таким как, предпочтительно вегетативная масса, выращенным или полученным из этих семян, или к потомству, полученному из них. В одном из аспектов изобретение относится к семенам *Zea mays*, переданным на хранение в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43997, или растениям или частям растений, таким как предпочтительно

вегетативная масса, выращенным или полученным из них, или потомству, полученному из них. Семена (или растения, выращенные из них, или части растений, полученные из них (из выращенных растений), или их потомство), переданные на хранение в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43997, включают ma61134d16, определенный в Таблице А или Таблице 3, детектируемый молекулярным маркером SEQ ID №: 124. Семена (или растения, выращенные из них, или части растений, полученные из них (из выращенных растений), или их потомство), переданные на хранение в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43997, включают ген F35H (на хромосоме 9), имеющий последовательность (включающую инсерцию 7 п.о.), указанную в SEQ ID №: 4. Растения, выращенные или полученные из семян, переданных на хранение в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43997, или их потомство демонстрируют повышенную или улучшенную переваримость вегетативной массы, например, по сравнению с растением *Zea mays*, не имеющим указанного молекулярного маркера или последовательности. В одном из аспектов изобретение относится к части растения, например, предпочтительно к вегетативной массе, полученной или способной быть полученной из растений, выращенных из семян *Zea mays*, переданных на хранение в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43997, или из их потомства. В одном из аспектов изобретение относится к растению или части растения, например, предпочтительно к вегетативной массе, включающим ген F35H, присутствующий в семенах *Zea mays*, переданных на хранение в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43997, или к их потомству. В одном из аспектов изобретение относится к растению или части растения, например, предпочтительно к вегетативной массе, включающей ген F35H (на хромосоме 9), имеющий последовательность (включающую инсерцию 7 п.о.), изложенную в SEQ ID №: 4, присутствующую в семенах *Zea mays*, переданных на хранение в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43997, или к его потомству. В одном из аспектов изобретение относится к растению или части растения, например, предпочтительно к вегетативной массе, включающему ma61134d16 (на хромосоме 9), детектируемый молекулярным маркером SEQ ID №: 124, присутствующим в семенах *Zea mays*, переданных на хранение в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43997, или к его потомству. Следует понимать, что при ссылке на потомство растения, полученного из семян, переданных на хранение в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43997, указанный молекулярный маркер (ma61134d16), полинуклеотид, последовательность, QTL, SEQ ID NO (4 или 124) или ген F35H в соответствии с изобретением присутствуют (т.е. присутствуют в семенах,

переданных на хранение под регистрационным номером NCIMB 43997 и приводят к улучшенной переваримости вегетативной массы), т.е. по меньшей мере они являются гетерозиготными. Аспекты и варианты осуществления изобретения дополнительно подтверждаются следующими неограничивающими примерами.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

Ген F35H (последовательность дикого типа: SEQ ID №: 7-9) был ранее идентифицирован как основной фактор, влияющий на переваримость кукурузы при силосовании (WO 2019/206927). В указанной патентной заявке был описан нокаутный аллель гена, который содержит длинную инсерцию в экзоне 1 гена f35h (SEQ ID №: 10-12). Кроме того, в этой первой патентной заявке был описан новый аллель с благоприятным усилением функции, идентифицированный методом TILLING. Доминантные и кодоминантные маркеры KASP и KPE (маркеры KPE означают капиллярный электрофорез и показывают полиморфизмы длины. Эта технология ранее (а иногда и сейчас) использовалась для SSR (сайт-специфической рекомбинации) для обнаружения нативной инсерции и мутанта TILLING. Эти маркеры регулярно применялись для маркерной селекции в отборе и интеграции признаков, а также для диагностического анализа новых двойных гаплоидных (DH) линий на наличие благоприятных аллелей. Удивительно, но было выявлено большое количество линий, у которых эти маркеры показали противоречивые данные (см. табл. 1).

Таблица 1

	Фланкирующий маркер	Доминирующая инсерция	Доминирующая делеция	Кодоминанта	KPE
	ma60405s01 (SEQ ID №: 120)	ma61134d04 (SEQ ID №: 204-206)	ma61134d01 (SEQ ID №: 198-200)	ma61134d02 (SEQ ID №: 201-203)	ma61134xx (SEQ ID №: 196)
non-SILO-line (PH207)	ade	-	Дел.	Дел.	107
SIL0-line	gua	Инс.	-	Инс.	295
new lines	gua	-	-	Дел.	112 или 115

Эти новые линии были секвенированы с помощью 40X Illumina, и был собран gene space. Сравнение этих линий с PH207 как эталонной не-SILO линией и SILO линиями, несущими первоначально идентифицированный аллель Silo-09-02, показало, что инсерция размером ~ 200 п.о. была утрачена. Однако были обнаружены инсерции размером 7-8 п.о. в экзоне 1 гена f35h. Это не исключалось, так как проверка исходной инсерции длиной ~200 п.н. (длинная инсерция) по базе данных повторов кукурузы (http://maize.jcvi.org/repeat_db.shtml) не выявила аннотированного транспозона. Были разработаны маркеры для инсерции длиной 8 п.о. и инсерции длиной 7 п.о. (ma61134d15; SEQ ID №: 125 и ma61134d16; SEQ ID №: 124).

Линии шести ДН популяций с инсерцией 8 п.о. (короткая инсерция; SEQ ID №: 1-3) были протестированы на переваримость нейтрально-детергентной клетчатки (ПНДК) с помощью БИК-спектроскопии. Популяции разделили либо на дикий тип F35H и на мутанта с инсерцией 8 п.о., либо на мутантов с длинной и короткой инсерцией. В первом случае разница в переваримости была значительной, во втором - нет, что говорит о том, что инсерция длиной 8 п.о. оказывает такое же влияние на ПНДК, как и исходная транспозоноподобная инсерция. Все протестированные линии демонстрируют положительный фенотип улучшенной переваримости вегетативной массы (табл. 2).

Таблица 2: Фенотипический анализ шести ДН популяций с инсерцией 8 п.о.

Популяция	Повтор.	ПНДК значение			Значение
		Дикий тип	Длинная инсерция	Инсерция 8 п.о.	
1	6 vs 4	53,44		61,15	разница в значении
2	6 vs 4	56,15		65,71	разница в значении
3	8 vs 6	52,02		58,32	разница в значении
4	2 vs 2		65,81	63,25	нет разницы
5	6 vs 4		61,28	63,78	нет разницы
6	4 vs 2		61,08	64,57	нет разницы

Линия кукурузы, содержащая инсерцию длиной 7 п.о. (SEQ ID №: 4-6), была широко протестирована как инбредная линия сама по себе и в гибридной комбинации и показала высокую продуктивность и высокую переваримость (Фигура 1).

В то время, как в WO 2019/206927 перечислены только маркеры, которые являются полиморфными между линией SILO-09-02 и пулом 5 кукурузы, настоящее изобретение предоставляет больше маркеров в диапазоне +/-20сМ (10сМ), которые являются полиморфными с пулом 1, пулом 4 или пулом 9, которые являются новыми пулами-мишенями для признака. (Таблица 3).

Таблица 3. Избранный список маркеров в геномном регионе +/- 20 сМ, относящемся к карте пула 5. Маркеры имеют максимальные значения MAF (Minor Allele Frequency) для использования в максимально возможном количестве других селекционных пулов.

SEQ ID №:	Маркер	хромосома	Положение [сМ]	Донор аллель	Комментарий
13	SYN38529	9	56,38		полиморфный
14	SYN5866	9	57,20		полиморфный
15	SYN11764	9	57,72		полиморфный
16	PZE-109015136	9	59,42		полиморфный
17	PZE-109015397	9	59,62		полиморфный
18	PZE-109016177	9	60,98		полиморфный
19	PZE-109017276	9	62,41		полиморфный
20	PZE-109017407	9	62,60		полиморфный
21	PZE-109018614	9	63,85		полиморфный
22	SYN32168	9	64,27		полиморфный
23	PZE-109021152	9	65,02		полиморфный
24	PZE-109021389	9	65,09		полиморфный
25	zm06133s02	9	65,12		полиморфный
26	PZE-109022641	9	65,23		полиморфный
27	Affx-90814890	9	65,25		полиморфный
28	SYN34181	9	65,35		полиморфный
29	SYN29297	9	65,77		полиморфный
30	PZE-109026962	9	65,77		полиморфный
31	SYN13048	9	65,93		полиморфный
32	PZE-109063861	9	66,35		полиморфный
33	PZE-109029427	9	66,49		полиморфный
34	zm08444s04	9	66,90		полиморфный
35	zm08444s03	9	66,90		полиморфный
36	PZE-109031125	9	66,93		полиморфный
37	PZE-109033123	9	67,41		полиморфный
38	SYN18776	9	67,82		полиморфный
39	PZE-109035519	9	68,13		полиморфный

40	PZE-109035852	9	68,26		полиморфный
41	PZE-109036977	9	68,69		полиморфный
42	zm10851s01	9	68,69		полиморфный
43	PZE-109041138	9	69,81		полиморфный
44	PZE-109040213	9	70,11		полиморфный
45	PZE-109043990	9	70,80		полиморфный
46	PZE-109045856	9	71,23		полиморфный
47	PZE-109048885	9	71,60		полиморфный
48	SYN32492	9	72,05		полиморфный
49	SYN32488	9	72,05		полиморфный
50	zm11758s02	9	72,25		полиморфный
51	PZE-109051621	9	72,35		полиморфный
52	PZE-109053851	9	72,72		полиморфный
53	PZE-109053885	9	72,72		полиморфный
54	PZE-109053887	9	72,72		полиморфный
55	PZE-109053906	9	72,73		полиморфный
56	PZE-109054050	9	72,77		полиморфный
57	PZE-109054055	9	72,77		полиморфный
58	PZE-109054205	9	72,81		полиморфный
59	PZE-109054458	9	72,85		полиморфный
60	PZE-109054723	9	72,90		полиморфный
61	PZE-109054729	9	72,90		полиморфный
62	PZE-109054805	9	72,92		полиморфный
63	PZE-109054812	9	72,93		полиморфный
64	PZE-109054943	9	72,96		полиморфный
65	SYN32299	9	73,04		полиморфный
66	PZE-109058460	9	73,40		полиморфный
67	Affx-91355778	9	73,49		полиморфный
68	PZE-109061769	9	73,80		полиморфный
69	SYN36472	9	74,01		полиморфный
70	PUT-163a- 4646495-2099	9	74,08		полиморфный
71	PZE-109065712	9	74,20		полиморфный
72	Affx-91059234	9	74,24		полиморфный
73	PZE-109066188	9	74,28		полиморфный
74	PZE-109067522	9	74,36		полиморфный
75	PZE-109067146	9	74,43		полиморфный
76	PZE-109066949	9	74,44		полиморфный
77	PZE-109066773	9	74,47		полиморфный
78	PZE-100001123	9	74,50		полиморфный
79	PZE-100000965	9	74,52		полиморфный
80	ZM011231-0277	9	74,53		полиморфный
81	PZE-109067561	9	74,56		полиморфный
82	PZE-109067890	9	74,58		полиморфный
83	PZE-109068071	9	74,60		полиморфный
84	SYN21877	9	74,93		полиморфный
85	PZE-109071755	9	75,08		полиморфный
86	PZE0008250961	9	75,15		полиморфный
87	SYN29013	9	75,18		полиморфный

88	PZE-109072798	9	75,19		полиморфный
89	SYN23066	9	75,26		полиморфный
90	PZE-109073024	9	75,26		полиморфный
91	PZE-109073894	9	75,43		полиморфный
92	SYN30845	9	75,50		полиморфный
93	ma60054s01	9	75,50		полиморфный
94	PZE-109074314	9	75,51		полиморфный
95	SYN22542	9	75,51		полиморфный
96	PZE-109074671	9	75,55		полиморфный
97	PZE-109074676	9	75,55		полиморфный
98	PZE0004090171	9	75,58		полиморфный
99	PZE-100001246	9	75,58		полиморфный
100	PZE-100001337	9	75,61		полиморфный
101	PZE-100001338	9	75,61		полиморфный
102	SYN4635	9	75,65		полиморфный
103	PZE-109075140	9	75,66		полиморфный
104	PZE-109075353	9	75,70		полиморфный
105	PZE-109075487	9	75,72		полиморфный
106	PZE-109075564	9	75,74		полиморфный
107	PZE-109075835	9	75,78		полиморфный
108	PZE-109075980	9	75,79		полиморфный
109	PZE-109076467	9	75,85	ade	
110	PZE-109076558	9	75,87	gua	
111	PZE-109076739	9	75,91	ade	
112	PZE-109076761	9	75,92	ade	
113	PZE-109077374	9	75,97	ade	
114	ma61126d01	9	75,98	del	
116	PZE-109077509	9	75,98	ade	
117	PZE-109077598	9	75,98	gua	
118	PZE-109077976	9	76,04	ade	
119	PZE-109078320	9	76,09	ade	
120	ma60405s01	9	76,11	gua	
121	PZE-109078814	9	76,16	gua	
122	PZE-109078789	9	76,16	cyt	
123	PZE-109079170	9	76,18	ade	
124	ma61134d16	9	76,19	Ins	Инсерция 7 п.о.
125	ma61134d15	9	76,19	ins	Инсерция 8 п.о.
126	Affx-91110408	9	76,27	ade	
127	PUT-163a-16926216-1143	9	76,28	cyt	
128	Affx-91121762	9	76,32	ade	
129	PZE-109080508	9	76,32	ade	
130	PZE-109080569	9	76,32	gua	
131	ma60182s01	9	76,35	ade	
132	PZE-109080822	9	76,35	ade	
133	ma61125s01	9	76,36	ade	
134	SYN29273	9	76,41	ade	
135	PZE-109081405	9	76,41	gua	
136	PZE-109081479	9	76,44	ade	

137	Affx-90937015	9	76,45	thy	
138	PZE-109081680	9	76,46	gua	
139	SYN29834	9	76,47	gua	
140	PZE-109082046	9	76,50	gua	
141	PZE-109082004	9	76,51	gua	
142	Affx-90383113	9	76,55	cyt	
143	SYN34099	9	76,61	gua	
144	Affx-91186901	9	76,61	gua	
145	SYN33659	9	76,62	ade	
146	PZE-109082918	9	76,62	ade	
147	PZE-109083369	9	76,67	ade	
148	PZE-109083328	9	76,67	gua	
149	SYN29817	9	76,75	gua	
150	ma60360s01	9	76,91	ade	
151	ma61158s01	9	76,91	thy	
152	ma61036s01	9	76,95	thy	
153	PZE-109086494	9	76,96	cyt	
154	ma61161s01	9	77,04	ade	
155	ma60806s03	9	77,05		полиморфный
156	ma61071s01	9	77,07		полиморфный
157	SYN38267	9	77,08		полиморфный
158	PZE-109088808	9	77,11		полиморфный
159	PUT-163a-60348412-2592	9	77,41		полиморфный
160	PHM1599.84	9	77,69		полиморфный
161	PZE-109090188	9	77,92		полиморфный
162	ma60984s01	9	78,25		полиморфный
163	PZE-109091377	9	78,45		полиморфный
164	PZE-109092033	9	78,99		полиморфный
165	PZE-109092182	9	79,20		полиморфный
166	SYN27192	9	79,39		полиморфный
167	PZE-109093491	9	80,11		полиморфный
168	PZE-109093846	9	80,44		полиморфный
169	PZE-109094238	9	81,06		полиморфный
170	PZE-109094399	9	81,41		полиморфный
171	ZM013688-0470	9	81,72		полиморфный
172	PZE-109096103	9	83,49		полиморфный
173	SYN22829	9	83,67		полиморфный
174	SYN22625	9	84,92		полиморфный
175	PZE-109097654	9	86,06		полиморфный
176	PZE-109097752	9	86,10		полиморфный
177	PZE-109098108	9	86,63		полиморфный
178	zm00728s04	9	88,24		полиморфный
179	PZE-109098623	9	88,27		полиморфный
180	SYN27711	9	88,51		полиморфный
181	SYN27709	9	88,51		полиморфный
182	PZE-109099670	9	90,07		полиморфный
183	Affx-91229917	9	90,79		полиморфный
184	PZE-109100755	9	91,22		полиморфный

185	SYN25124	9	92,28		полиморфный
186	SYN25123	9	92,28		полиморфный
187	PZE-109101695	9	93,29		полиморфный
188	PZE-109101698	9	93,29		полиморфный
189	PZE-109102054	9	94,16		полиморфный
190	PZE-109102157	9	94,36		полиморфный
191	zm02908s02	9	94,81		полиморфный
192	Affx-90454668	9	94,81		полиморфный
193	PUT-163a-60357079-2822	9	95,11		полиморфный
194	Affx-90988936	9	95,27		полиморфный
195	PZE-109103504	9	96,06		полиморфный
196	ma61134xxx	9	76,19	INS (295 н.о.)	KPE маркер
198-200	ma61134d01	9	76,19	NULL	Доминантный дикий тип
201-203	ma61134d02	9	76,19	INS	Кодоминантный полиморфный
204-206	ma61134d04	9	76,19	INS	Доминантный аллель QTL

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации растения или части растения кукурузы, включающий скрининг на наличие или обнаружение полинуклеотида, который включает (молекулярный) маркер (аллель) ma61134d15 и/или ma61134d16 в растении или части растения кукурузы (геноме); где ma61134d15 представляет собой инсерцию 8 нуклеотидов между положениями 134254381 и 134254382 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, или в положении 76,19 сМ на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, и/или обнаруживается молекулярным маркером SEQ ID №: 125; предпочтительно инсерцию, указанную в SEQ ID №: 1, и ma61134d16 представляет собой инсерцию 7 нуклеотидов между положениями 134254381 и 134254382 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, или в положении 76,19 сМ на хромосоме 9, относящейся к линии PH207, и/или обнаруживается молекулярным маркером SEQ ID №: 124; предпочтительно инсерцию, указанную в SEQ ID №: 4.

2. Способ по пункту 1, включающий скрининг на наличие одного или нескольких (молекулярных) маркеров (аллелей), выбранных из таблицы В или С.

3. Растение или часть растения кукурузы, включающие в геноме растения или части растения кукурузы полинуклеотид, имеющий последовательность, выбранную из:

а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;

б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;

в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 7 или 8;

г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 9;

где нуклеотидная последовательность, указанная в пунктах а) - г) имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов не кратного трем, более предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тиминном в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8; или

д) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcgggtct, в положении,

соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

е) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgttct, более предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

ж) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, где нуклеотидная последовательность предпочтительно включает gcsgttct, более предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

4. Растение или часть растения по пункту 3, где указанное растение или часть растения происходит из растения, содержащего указанный полинуклеотид, полученного путем интродукции или интрогрессии, или где указанное растение или часть растения, подвергнутое(ая) мутагенизации, опосредованной транспозоном или транспозируемым элементом, является трансгенным(ой) или генно-редактированным(ой).

5. Способ создания или производства растения, или части растения кукурузы, и/или улучшения переваримости (вегетативной массы), включающий введение в геном растения или части растения кукурузы полинуклеотида, определенного в любом из пунктов 1 - 3.

6. Способ по пункту 5, включающий введение в геном растения или части растения кукурузы полинуклеотида, имеющего последовательность, выбранную из:

а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;

б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;

в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 7 или 8;

г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 9;

где нуклеотидная последовательность, указанная в пунктах а) - г) имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов, не кратного трем, более предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем положению между тиминном в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8; или

д) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

е) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

ж) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, причем нуклеотидная последовательность предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

7. Способ по пункту 5 или 6, включающий (а) получение первого растения кукурузы, имеющего полинуклеотид или один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей), определенных в любом из пунктов 1 - 3, или первого растения, полученного из семян *Zea mays*, переданных на хранение под регистрационным номером NCIMB 43997 (или их потомства), (b) скрещивание указанного первого растения кукурузы со вторым растением кукурузы, и (с) отбор потомства, имеющего полинуклеотид или один или несколько (молекулярных) маркеров (аллелей), определенных в любом из пунктов 1 - 3.

8. Способ по пункту 5 или 6, где введение включает стабильную или транзиторную интеграцию посредством трансформации, включая трансформацию, опосредованную *Agrobacterium*, трансфекцию, микроинъекцию, метод баллистической трансформации, инсерцию с использованием технологии редактирования генов, такой как системы CRISPR (например, CRISPR/Cas, в частности CRISPR/Cas9 или CRISPR/Cas12), CRISPR/CasX или CRISPR/CasY), TALENs, нуклеазы цинковых пальцев или мегануклеазы, гомологичной рекомбинации, необязательно с помощью одной из технологий редактирования генов, включая предпочтительно репарационную матрицу, модификации эндогенного гена с помощью случайного или направленного мутагенеза, например TILLING или вышеуказанных технологий редактирования генов, или мутагенеза, опосредованного транспозоном или транспозируемым элементом.

9. Растение кукурузы или часть растения, полученное(ая) способом по любому из пунктов 5-8.

10. Применение молекулярного маркера, определенного в пункте 1 или 2, для идентификации или отбора растения или части растения кукурузы.

11. Применение полинуклеотида, определенного в пункте 6, для создания или производства растения или части растения кукурузы.

12. (Выделенный) полинуклеотид, включающий полинуклеиновую кислоту, имеющую последовательность, выбранную из:

а) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 7;

б) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 8;

в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 7 или 8;

г) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 9;

где нуклеотидная последовательность, указанная в пунктах а) - г) имеет инсерцию одного или нескольких нуклеотидов, предпочтительно числа нуклеотидов, не кратного трем, более предпочтительно 8 или 7 нуклеотидов в положении, соответствующем

положению между тимином в положении 102 и гуанином в положении 103 в SEQ ID №: 7 или соответствующему положению в SEQ ID №: 8; или

д) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 или 4 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 1 или 4, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

е) нуклеотидной последовательности, имеющей кодирующую последовательность SEQ ID №: 2 или 5 или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 2 или 5, которая предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1;

ж) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID №: 3 или 6 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID №: 3 или 6, где нуклеотидная последовательность предпочтительно включает gcsgtct, более предпочтительно gcggtct, в положении, соответствующем положению 103-109 SEQ ID №: 4, или gcsgttct, предпочтительно gcggttct, в положении, соответствующем положению 103-110 SEQ ID №: 1.

13. (Выделенный) полинуклеотид, включающий (молекулярный) маркер (аллель), определенный в пункте 1 или 2, его комплемент или обратный комплемент, или его фрагмент; или специфически гибридизирующий с молекулярным маркером, определенным в пункте 1 или 2, его комплементом или обратным комплементом, или его фрагментом.

14. (Выделенная) полинуклеиновая кислота по пункту 13, в частности пригодная для применения в качестве молекулярного маркера, включающая по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 18, более предпочтительно по меньшей мере 20, смежных нуклеотидов любой из SEQ ID №: 109-154, или нуклеотидов, комплементарных к смежным нуклеотидам любой из SEQ ID №: 109 - 154, или нуклеотидов, обратно комплементарных смежным нуклеотидам любой из SEQ ID №: 109-154, и предпочтительно включающая по меньшей мере один нуклеотид соответствующего полиморфизма, представленного в таблице В или С.

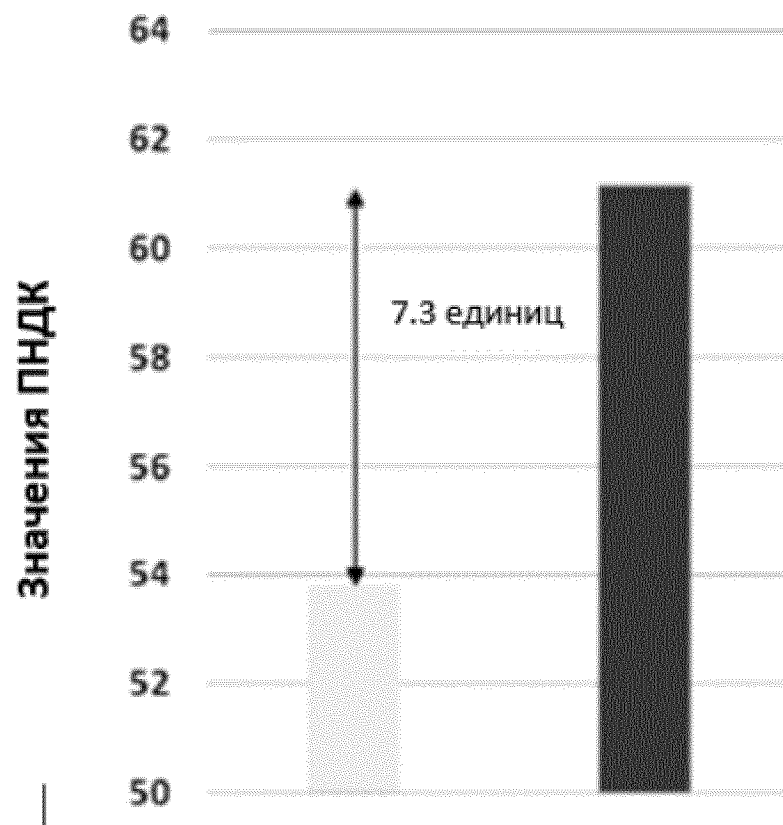
15. (Выделенная) полинуклеиновая кислота по пункту 13 или 14, которая представляет собой праймер или зонд, предпочтительно аллель-специфический праймер, более предпочтительно KASP-праймер.

16. Семя *Zea mays*, переданное на хранение в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43997.

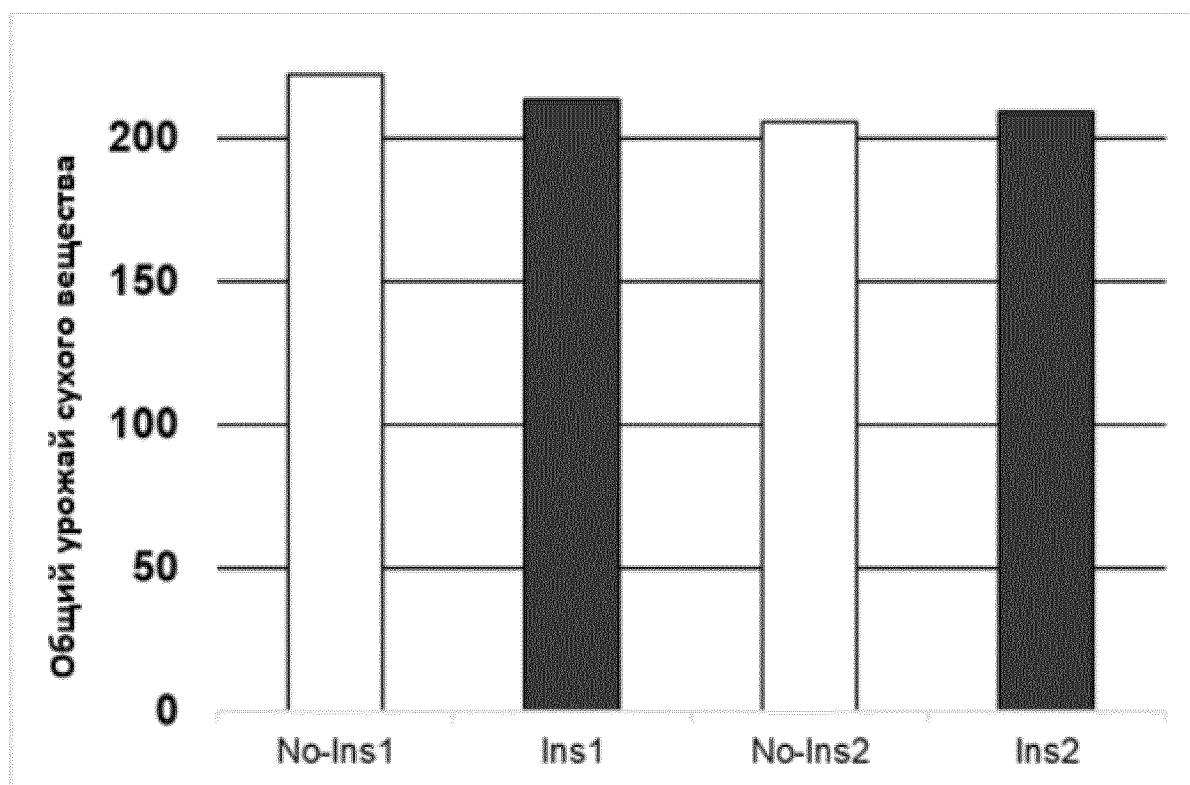
17. Растение *Zea mays*, выращенное или полученное из семя по пункту 16, или его потомство.

18. Часть растения *Zea mays*, полученная из растения по пункту 17.

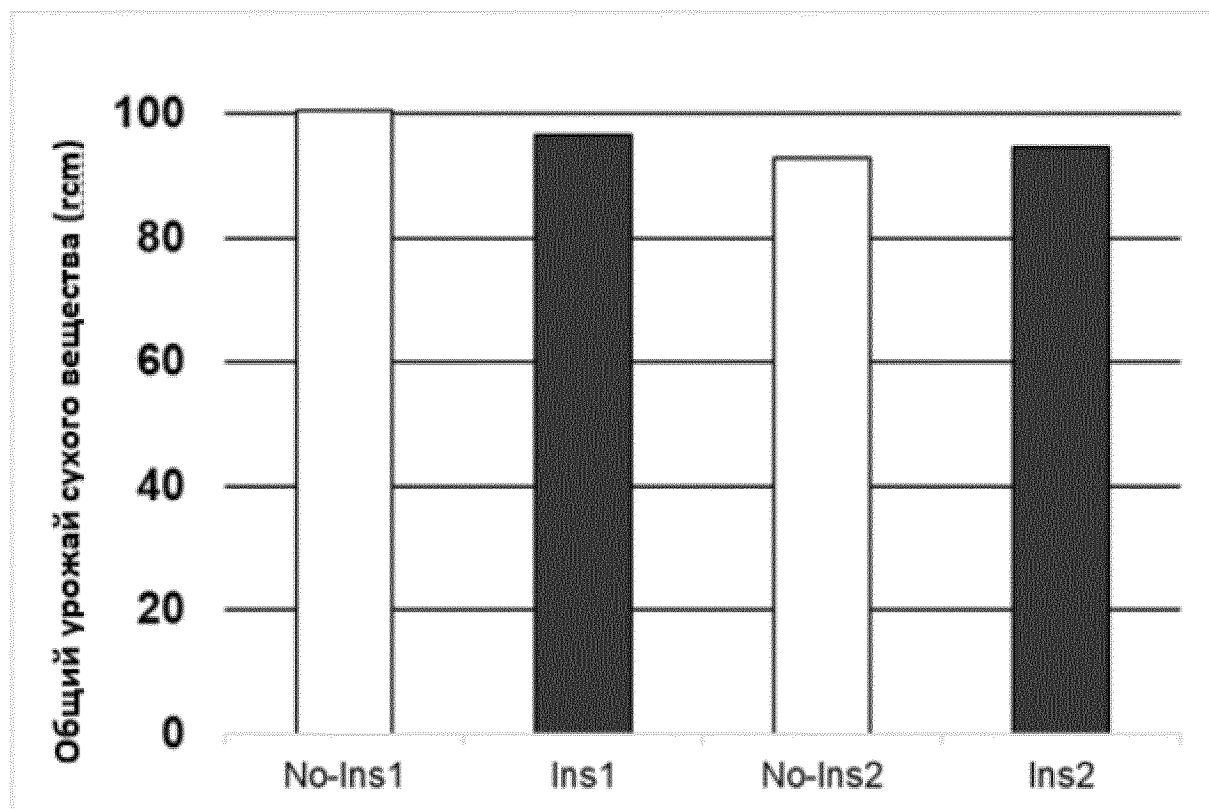
19. Часть растения *Zea mays* по пункту 18, где указанная часть растения представляет собой вегетативную массу.



Фигура 1



Фигура 2



Фигура 3