

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201690508** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2016.11.30

(22) Дата подачи заявки
2014.09.03

(51) Int. Cl. *A01H 1/04* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(54) **РАСТЕНИЕ, УСТОЙЧИВОЕ К ГЕЛЬМИНТОСПОРИОЗУ**

(31) 10 2013 014 637.2; 10 2014 005 823.9

(32) 2013.09.04; 2014.04.24

(33) DE

(86) PCT/EP2014/002386

(87) WO 2015/032494 2015.03.12

(88) 2015.04.30

(71) Заявитель:

**КВС ЗААТ СЕ (DE); УНИВЕРЗИТЕТ
ЦЮРИХ (CH)**

(72) Изобретатель:

**Озунова Милена, Шойрманн Даниела
(DE), Келлер Беат, Краттингер Симон,
Викер Томас, Херрен Герхард, Харни
Северин (CH), Кессель Беттина,
Престерл Томас, Кнаак Карстен (DE)**

(74) Представитель:

**Емельянова В.А., Вашук Т.В.,
Королева С.В., Кудашов В.И. (BY)**

(57) Настоящее изобретение обеспечивает улучшенное растение, устойчивое к *Helminthosporium turcicum*, в частности растение кукурузы, которое содержит полинуклеотид, имеющий один или несколько придающих устойчивость генов, например, на усеченном фрагменте хромосомы исходного сорта Peritilla, а также его клетку, ткань, часть, зерно или семена, выделенный полинуклеотид, содержащий один или несколько генов, придающих устойчивость к *Helminthosporium turcicum*, вектор, трансгенную клетку растения и трансгенное растение, содержащее этот полинуклеотид. Изобретение также касается подходящих маркеров и их использования для интродукции устойчивости или трансгена в растение, а также для идентификации улучшенных растений кукурузы, содержащих усеченный фрагмент хромосомы.

A1

201690508

201690508

A1

Растение, устойчивое к гельминтоспориозу

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается модификации растений с использованием методов молекулярной биологии и маркерных технологий, а также генетической инженерии. Оно обеспечивает новое растение, устойчивое к *Helminthosporium turcicum*, в частности, растение кукурузы, которое содержит полинуклеотид, имеющий один или несколько придающих устойчивость генов на модифицированном фрагменте хромосомы исходного сорта Peritilla, а также его клетку, ткань, часть, зерна или семена, выделенный полинуклеотид, содержащий один или несколько генов, придающих устойчивость к *Helminthosporium turcicum*, вектор, клетку трансгенного растения и трансгенное растение, содержащее этот полинуклеотид. Изобретение также касается подходящих молекулярных маркеров и их использования для вставки локуса устойчивости или трансгена в растение, а также для идентификации улучшенных растений кукурузы, содержащих модифицированный фрагмент хромосомы.

Предпосылки создания изобретения

Существует большое количество грибных патогенов, вызывающих заболевание листьев у кукурузы (*Zea mays* L.). К известным грибам, способным причинять наибольший урон в условиях как тропического, так и умеренного климата, такого как на большей части Европы и Северной Америки, а также Африки и Индии, относится гриб *Helminthosporium turcicum*, синонимы: *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard и Suggs (телеоморфа: *Setosphaeria turcica* (Luttrell) Leonard и Suggs). *H. turcicum* является возбудителем гельминтоспориозной пятнистости листьев, известной также как «северный гельминтоспориоз листьев кукурузы» (NCLB). Заболевание может приобретать эпидемические пропорции во влажные годы, поражая чувствительные сорта кукурузы и нанося большой урон, при этом потери урожая могут достигать 30% и более на больших площадях (Perkins и Pedersen, 1987; Raymundo и Hooker, 1981a; Ullstrup и Miles, 1957). С 1970-х годов ведется поиск природных механизмов устойчивости в генетическом материале. В настоящее время известны качественные и количественные признаки устойчивости. В то время как олиго- или полигенно наследуемая качественная устойчивость представляет собой неполную и неспецифическую устойчивость, что касается расы фенотипа, и

контролируется дополнительными и частично доминантными генами, количественная устойчивость является, как правило, расоспецифической и может наследоваться посредством отдельных, по большей части доминантных генов, таких как *Ht1*, *Ht2*, *Ht3*, *Htm1* или *Htn1* (Lipps и соавт., 1997; Weiz и Geiger, 2000). При возвратных скрещиваниях многих часто используемых инбредных линий кукурузы, таких как W22, A619, B37 или B73, происходит успешная интрогрессия НТ-генов, при этом их частичное доминирование и экспрессия проявляются как функция соответствующего генетического фона (Weiz, 1998).

Несмотря на такую сложную генетическую архитектуру устойчивости кукурузы к NCLB, до настоящего времени преимущественное использование в кукурузе гена *Ht1* с частичной количественной устойчивостью было достаточным для контроля гельминтоспориоза (Weiz, 1998). Это вызвано тем, что использование расы 0 *H. turcicum* является доминирующим в мировом масштабе (приблизительно 55%) (Lipps и соавт., 1997; Ferguson и Carson, 2007), в то время как другие расы, такие как 2N и 23N, используются крайне редко и при этом географическая зона их использования также весьма ограничена (Moghaddam и Pataky, 1994; Jordan и соавт., 1983; Lipps и Hite, 1982; Thakur и соавт., 1989; Weiz, 1998). Раса 0 является авирулентной, что касается растения кукурузы с *Ht1*, поэтому при придании ему подходящей количественной устойчивости оно проявляет достаточную общую устойчивость к NCLB. Тем не менее, многочисленные исследования свидетельствуют об увеличении диссеминации менее распространенных рас (Jordan и соавт., 1983; Weiz, 1998; Pratt и Gordon, 2006). Это связано с изменчивостью популяций патогена, приводящей к изменениям вирулентности патогена за счет новых мутаций генов вирулентности и новых комбинаций имеющихся генов вирулентности. В конечном итоге это может приводить к появлению новых, подходящих, иногда более агрессивных патогенных рас. Например, в Бразилии популяция *H. turcicum* уже характеризуется значительно большим разнообразием расового состава, чем, например, в Северной Америке. Gianasi и соавт. (1996) опубликованы данные о расах *H. turcicum*, которые уже способны подавлять устойчивость, придаваемую геном *Ht1*. Кроме того, отмечается нестабильность генов устойчивости под действием определенных факторов окружающей среды, таких как температура и интенсивность света в некоторых климатических зонах (Thakur и соавт., 1989). В результате такого положения вещей в мире растет важность использования новых НТ-генов устойчивости или таких генов, которым до настоящего времени уделялось мало внимания при

создании коммерческих сортов кукурузы, с целью получения кукурузы с более широкой и более длительной устойчивостью к *H. turcicum*. Первоначальные попытки в этом направлении были предприняты Pataky и соавт. еще в 1998 г. Устойчивость к NCLB элитной кукурузы типа *sh2* была улучшена путем комбинации генов *Ht1* и *Htn1*.

Источником моногенной устойчивости *Htn1* является местный сорт кукурузы Мексики «Pepitilla» (Gevers, 1975). У интрогрессивных линий с *Htn1* ген картируется на длинном плече хромосомы 8 на расстоянии около 10 сМ от *Ht2* и на расстоянии 0,8 сМ от RFLP-маркера *umc117* (бин 8,06) (Simcox и Bennetzen, 1993). В отличие от обычных HT-генов устойчивости *Htn1* придает устойчивость, которая обеспечивает задержку наступления споруляции, и, таким образом, предотвращает развитие поражений. В результате число поражений и их размер уменьшаются, а также уменьшается объем споруляции (Raymundo и соавт., 1981b; Simcox и Bennetzen, 1993). Хлоротичные и некротические поражения, которые имеют место при таких придающих устойчивость генах, как *Ht1*, *Ht2*, или *Ht3*, не образуются (Gevers, 1975). Однако реакция устойчивости гена *Htn1* в гетерозиготном состоянии значительно менее эффективна, чем в гомозиготном состоянии (Raymundo и соавт., 1981b).

Развитие дополнительных специфических маркеров, способных еще более упростить процесс определения генотипа, улучшило бы управляемость действия гена *Htn1* при скрещивании. Таким образом, технология маркер-опосредованной (MAS) селекции делает возможным эффективный стэкинг или пирамидирование нескольких генов устойчивости (Min и соавт., 2012). Во многих исследованиях по картированию локуса устойчивости и идентификации источника устойчивости применялись интрогрессивные линии *B37Htn1* или *W22Htn1* (Raymundo и соавт., 1981b; Simcox и Bennetzen, 1993; Bar-Zur и соавт., 1998; Coates и White, 1998). Однако имеющаяся информация о маркерах, которые можно было бы использовать для отбора локуса *Htn1* устойчивости из исходного сорта *Pepitilla*, до сих пор весьма ограничена (Simcox и Bennetzen, 1993). Известные функциональные маркеры *Htn1*, которые фланкируют локус устойчивости из исходного сорта *Pepitilla*, все еще картируются на расстоянии около 22,2 сМ друг от друга, что при наилучшем сценарии развития событий позволяет осуществлять отбор большого фрагмента хромосомы. Однако часто есть риск того, что внутри этого фрагмента между маркерами может происходить двойная генетическая рекомбинация, что будет приводить к ложно позитивному отбору локуса

Htn1 устойчивости. Более того, в некоторых случаях в зависимости от размера интрогрессируемого фрагмента хромосомы возрастает вероятность внедрения в интрогрессивные линии нежелательных генетических участков и их передачи последующим поколениям элитных линий. Такие генетические участки, особенно если они тесно сцеплены с локусом *Htn1* и оказывают явно негативное воздействие на проявление одного или нескольких агрономических признаков, известны как сцепленное наследование генов. Из результатов проведенных исследований, в ходе которых изучались интрогрессивные линии с *Htn1* из *Peritilla*, такое негативное воздействие неизвестно. Даже всеобъемлющие научные исследования, осуществленные Weiz (1998), в ходе которых, помимо прочего, изучалась линия *B37Htn1*, постулировали, что, например, в отношении созревания и урожайности интрогрессия локуса *Htn1* не оказывала значительного воздействия. Таким образом, из предшествующего уровня техники следует, что в прошлом серьезных попыток преднамеренно уменьшить большой размер фрагмента хромосомы не предпринималось.

В международной публикации WO 2011/163590 раскрывается генотип РН99N в качестве альтернативного источника устойчивости к NCLB на хромосоме 8 (бин 5), который, однако, не соответствует исходному сорту *Peritilla*. Как правило, у популяций в потомстве от возвратного скрещивания РН99N идентифицировалась устойчивость, касающаяся только рас 0 и 1 *H. turcicum*. Даже фенотип устойчивости четко не определялся. Тем не менее, авторы пришли к выводу, что устойчивость вызывалась геном *Htn1*. Однако локус устойчивости в РН99N ограничивался только фрагментом хромосомы длиной ~224 Кб. Устойчивое растение кукурузы, содержащее фрагмент длиной 224 Кб и, таким образом, предполагаемый ген *Htn1*, в данной публикации не раскрывается. Более того, генотип РН99N не был доведен до всеобщего сведения путем депонирования.

Альтернативный подход, чтобы сделать ген *Htn1* полезным, заключается в идентификации и клонировании гена устойчивости и его использовании в стратегии создания трансгенного растения.

С целью идентификации гена устойчивости к NCLB в 2010 году Chung и соавт. опубликовали исследование по тонкому картированию локуса устойчивости (бин 8,06). Однако исследуемый фрагмент хромосомы был взят не из *Peritilla*, а из гибрида кукурузы DK888, который проявлял множественную устойчивость к болезням. Исследования расовой специфичности *Helminthosporium* с самого начала показали, что локус

устойчивости в DK888, обозначенный как *qNLB8.06_{dk888}*, был тесно связан или функционально связан с генами *Ht2* и *Htn1*, так как штаммы 23 и 23N *Helminthosporium* были вирулентными (Chung и соавт., 2008). Детекция присутствия *Htn1* не была, однако, позитивной, вследствие отсутствия чистого N-изолята *H. turcicum*. Более того, фенотип устойчивости с *qNLB8.06_{dk888}* не соответствовал ожидаемому фенотипу в том, что касалось появления хлоротичных поражений и задержки образования поражений. Более подробные дополнительные исследования Chung и соавт. (2010) в конечном итоге показали, что *qNLB8.06_{dk888}* был идентичным, аллельным, тесно связанным или функционально связанным с *Ht2*, а не с *Htn1*. Лocus устойчивости *qNLB8.06_{dk888}* мог располагаться на фрагменте хромосомы размером 0,46 Мб. Аннотации генома этого фрагмента хромосомы косвенно указывали на наличие 12 потенциальных открытых рамок считывания, три из которых могли быть, соответственно, тандемным протеинкиназа-подобным геном (GRMZM2G135202; GRMZM2G164612) или протеинфосфатаза-подобным геном (GRMZM2G119720), при этом каждый из них в равной степени мог быть потенциальным геном-кандидатом гена устойчивости *Ht2* (Chung и соавт., 2010). Сведения о функциональной оценке не описывались.

В международной публикации WO 2011/163590 A1 предполагаемый ген *Htn1* в источнике устойчивости PH99N также аннотирован как тандемный протеинкиназа-подобный ген (GRMZM2G451147) и раскрыта его генетическая последовательность, однако опять не определена его функциональность, например, в трансгенном растении кукурузы.

Описание изобретения

Настоящее изобретение основывается на предшествующем уровне техники, описанном выше. Целью настоящего изобретения является растение кукурузы, обладающее устойчивостью к патогену *Helminthosporium turcicum* донорного сорта Pepitilla, в котором агрономические признаки известных сортов кукурузы могут совмещаться с устойчивостью донорного сорта Pepitilla.

С одной стороны, цель изобретения достигается путем получения растения кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы донорного сорта Pepitilla, характеризующее тем, что фрагмент хромосомы содержит интервал донора (далее – первый интервал или интервал 1), который проявляет донорные аллели в соответствии с гаплотипом, представленным в Таблице 2, и полинуклеотид, который придает

устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы, при этом фрагмент хромосомы не содержит еще один интервал донора (далее – второй интервал или интервал 2) между маркером в первом маркерном участке (M1), который фланкирован маркерами SYN14136 и PZE-108076510, и маркером во втором маркерном участке (M2), который фланкирован маркерами SYN24931 и PZE-108077560. Эти и альтернативные решения проблемы, описанные ниже, могут основываться на программе скрещиваний по интеграции локуса *Htn1* из *Peritilla* в линии кукурузы. Для создания растений по данному изобретению могут также выбираться подходы генетической инженерии. Примеры стратегий генетической инженерии более подробно описаны ниже. Чтобы создать растения по данному изобретению, можно использовать различные генотипы, известные из предшествующего уровня техники. В частности, В37HTN1, включающий locus устойчивости местного сорта «*Peritilla*», был использован в качестве исходной линии. Кроме непосредственно *Peritilla* и В37HTN1 (также известного из предшествующего уровня техники как В37HtN), практически любой генотип кукурузы может быть задействован для интеграции локуса *Htn1* с целью получения растения кукурузы по данному изобретению, в геном которого, в частности, на хромосоме 8 (бин 5 или 6), путем интрогрессии встроен locus *Htn1* устойчивости *Peritilla*. В этом отношении из предшествующего уровня техники известны многочисленные примеры генотипов, например, W22Htn (Bar-Zur и соавт., 1998), H6314Htn (Bar-Zur и соавт., 1998), B73HtN (Shimoni и соавт., Journal of Phytopathology 131:4 (1991), 315-321), B68HtN и A632HtN (Carson, Plant Disease 79 (1995), 717-720) и A619HtN (Stanković и соавт., Genetika 39:2 (2007), 227-240). У растения кукурузы по данному изобретению фрагмент хромосомы происходит из донорного сорта *Peritilla*; в предпочтительном варианте получения растения кукурузы по данному изобретению фрагмент хромосомы происходит из донорного В37HTN1 или иного генотипа кукурузы, указанных выше. Например, В37HTN1 можно заказать в Maize Genetics COOP Stock Center, регистрационный номер 65749.

Фрагмент хромосомы, интегрируемый в геном растения кукурузы по данному изобретению, происходит из донорного сорта *Peritilla*, который, как известно, содержит locus HTN1 устойчивости. Интрогрессия этого локуса устойчивости локализуется на длинном плече хромосомы 8, бин 8,05 – 8,06. Интегрируемый фрагмент хромосомы содержит первый интервал донора, включающий полинуклеотид, придающий устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы по данному изобретению. Полинуклеотид содержит один или несколько придающих устойчивость генов локуса HTN1

Pepitilla (Таблица 1) или их аллели. В условиях поражения *H. turcicum* гены или аллели генов способны продуцировать устойчивый фенотип, обладающий признаками, типичными для HTN1. Предпочтительно, чтобы полинуклеотид содержал один или несколько придающих устойчивость генов локуса HTN1, предпочтительно из Pepitilla, выбираемых из RLK1 и EXT1 (см. Таблицу 1), или их аллелей, которые продуцируют устойчивый фенотип, обладающий признаками, типичными для HTN1 в условиях поражения *H. turcicum*. Наиболее предпочтительно, чтобы полинуклеотид включал нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид согласно SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6 или гомолог полипептида согласно SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6, который продуцирует устойчивый фенотип, обладающий признаками, типичными для HTN1 в условиях поражения *H. turcicum*. Примерами признаков, типичных для HTN1, являются задержка наступления споруляции, уменьшение числа поражений, уменьшение размера поражений, уменьшение объема споруляции и/или отсутствие либо лишь локальное наличие хлоротичных и некротических поражений. Структурная организация полинуклеотида характеризуется тем, что он содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая (а) включает нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 15, (b) включает нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 15, предпочтительно по всей ее длине, (c) гибридизуется с комплементарной цепью молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с (a) или (b) в жестких условиях, (d) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 или 16, (e) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой одной из аминокислотных последовательностей в соответствии с (d), или (f) включает часть последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с (a) – (e). В предпочтительном варианте осуществления полинуклеотид характеризуется тем, что содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая (aa) включает нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или 5, (bb) включает нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 или 5, предпочтительно по всей ее длине, (cc) гибридизуется с

комплементарной цепью молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с (aa) или (bb) в жестких условиях, (dd) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или 6, (ee) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой одной из аминокислотных последовательностей в соответствии с (dd), или (ff) включает часть последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с (aa) – (ee). «Часть последовательности молекулы нуклеиновой кислоты», как она здесь используется, может содержать по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или по меньшей мере 100 последовательных нуклеотидов, более того по меньшей мере 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 последовательных нуклеотидов. Полинуклеотид может находиться в гетерозиготном или гомозиготном состоянии в геноме растения кукурузы по данному изобретению. Предпочтительно, чтобы полинуклеотид находился в гомозиготном состоянии.

Таблица 1. Потенциальные гены, придающие устойчивость, локуса HTN1 из *Pepitilla*.

Название гена (графа 1); ссылка на соответствующий номер геномной кодирующей последовательности (экзоны) (графа 2); ссылка на соответствующий номер предсказанной аминокислотной последовательности/последовательности белка (графа 3); аннотированный гомологичный ген из B73 референсного генома (графа 4).

Название гена	кДНК SEQ ID NO:	Последовательность белка SEQ ID NO:	Гомологичный ген B73
RLK1	1	2	GRMZM2G451147
RLK4	3	4	GRMZM2G144028
EXT1	5	6	GRMZM2G445338
DUF1	7	8	AC209075.3_FG007
ZNF1	9	10	GRMZM2G175661
CYT1	11	12	GRMZM2G092018
RET1	13	14	GRMZM2G091973
HYD	15	16	GRMZM2G144021

Первый интервал во фрагменте хромосомы, проявляющий донорные аллели в соответствии с гаплотипом, представленным в Таблице 2, характеризуется последовательностью донорных аллелей в гаплотипе

Таблицы 2, но не ограничивается этой последовательностью донорных аллелей в соответствии с Таблицей 2. Это означает, что первый интервал проявляет по меньшей мере донорный аллель, который определяет придающий устойчивость ген, показанный в Таблице 1, как вариант, донорный аллель с маркером МА008. Кроме того, первый интервал предпочтительно проявляет по меньшей мере донорные аллели в соответствии с гаплотипом, представленным в Таблице 2, от МА0021 до МА0022 (например, МА0021, МА0007, МА0008, МА0009, МА0010, МА0011, МА0012, МА0022), либо от МА0005 до МА0022 (например, МА0005, МА0021, МА0007, МА0008, МА0009, МА0010, МА0011, МА0012 и МА0022), либо от МА0005 до МА0013 (например, МА0005, МА0021, МА0007, МА0008, МА0009, МА0010, МА0011, МА0012, МА0022 и МА0013), либо от МА0005 до МА0014 (например, МА0005, МА0021, МА0007, МА0008, МА0009, МА0010, МА0011, МА0012, МА0022, МА0013 и МА0014), либо от МА0005 до МА0015 (например, МА0005, МА0021, МА0007, МА0008, МА0009, МА0010, МА0011, МА0012, МА0022, МА0013, МА0014 и МА0015), либо от МА0005 до МА0016 (например, МА0005, МА0021, МА0007, МА0008, МА0009, МА0010, МА0011, МА0012, МА0022, МА0013, МА0014, МА0015 и МА0016), в частности, предпочтительно от МА0005 до МА0017 (например, МА0005, МА0021, МА0007, МА0008, МА0009, МА0010, МА0011, МА0012, МА0022, МА0013, МА0014, МА0015, МА0016 и МА0017), МА0005 до МА0018 (например, МА0005, МА0021, МА0007, МА0008, МА0009, МА0010, МА0011, МА0012, МА0022, МА0013, МА0014, МА0015, МА0016, МА0017 и МА0018), МА0005 до PZE-108095998 (например, МА0005, МА0021, МА0007, МА0008, МА0009, МА0010, МА0011, МА0012, МА0022, МА0013, МА0014, МА0015, МА0016, МА0017, МА0018 и PZE-108095998), МА0005 до PZE-108096011 (например, МА0005, МА0021, МА0007, МА0008, МА0009, МА0010, МА0011, МА0012, МА0022, МА0013, МА0014, МА0015, МА0016, МА0017, МА0018, PZE-108095998 и PZE-108096011) или МА0005 до МА0019 (например, МА0005, МА0021, МА0007, МА0008, МА0009, МА0010, МА0011, МА0012, МА0022, МА0013, МА0014, МА0015, МА0016, МА0017, МА0018, PZE-108095998, PZE-108096011 и МА0019), в частности, более предпочтительно от МА0005 до PZE-108096610 (например, МА0005, МА0021, МА0007, МА0008, МА0009, МА0010, МА0011, МА0012, МА0022, МА0013, МА0014, МА0015, МА0016, МА0017, МА0018, PZE-108095998, PZE-108096011, МА0019 и PZE-108096610), МА0005 до МА0020 (например, МА0005, МА0021, МА0007, МА0008, МА0009, МА0010, МА0011, МА0012, МА0022, МА0013, МА0014,

MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011, MA0019, PZE-108096610 и MA0020), MA0005 до PZE-108096791 (например, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011, MA0019, PZE-108096610, MA0020 и PZE-108096791) или MA0005 до MA0006 (например, MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011, MA0019, PZE-108096610, MA0020, PZE-108096791 и MA0006). Этот устойчивый гаплотип однозначно различает и идентифицирует источник устойчивости *Peritilla*. В частности, первый интервал локализован между маркерами MA0004 и PZE-108097482, между маркерами MA0004 и MA0022, между маркерами MA0005 и PZE-108097482 или между маркерами MA0005 и MA0022. Предпочтительно, чтобы первый интервал определял сегмент фрагмента хромосомы, способный придавать устойчивость, типичную для HTN1. Как таковой, он является носителем полинуклеотида, указанного выше.

Таблица 2. Устойчивый гаплотип из B37HTN1

Расположение в п.о. на B73 AGPv02	Аллельный донор B37HTN1	Обозначение маркера
151831049	C	MA0005
151907173	G	MA0021
152045106	T	MA0007
152045141	T	MA0008
152045402	T	MA0009
152045516	C	MA0010
152045912	T	MA0011
152046502	T	MA0012
152046529	A	MA0022
152133057	G	MA0013
152133380	A	MA0014
152144310	A	MA0015
152250992	A	MA0016
152301656	A	MA0017
152304127	A	MA0018
152433358	A	PZE-108095998
152435855	A	PZE-108096011
152630794	C	MA0019
152703579	G	PZE-108096610

152753635	A	MA0020
152887338	G	PZE-108096791
152888374	A	MA0006

Каждое растение кукурузы по данному изобретению представляет собой НТ-устойчивое растение кукурузы. НТ-устойчивость, придаваемую за счет интеграции фрагмента хромосомы, можно оценивать количественно с помощью шкалы количественных признаков согласно Таблице 3 и Примеру 1.А), получаемых в результате испытаний по фенотипированию. Как видно, степень устойчивости снижается от 1 до 9. НТ-устойчивые растения кукурузы по данному изобретению проявляют повышенную устойчивость к *H. turcicum* по меньшей мере по 1 количественному признаку, предпочтительно по меньшей мере 2 количественным признакам или по меньшей мере 3 количественным признакам, наиболее предпочтительно по меньшей мере 4 количественным признакам. Предпочтительно, чтобы растение кукурузы по данному изобретению проявляло устойчивость по меньшей мере к одной расе *Helminthosporium turcicum*, которая не соответствует специфичности расы, известной из предшествующего уровня техники. В наиболее предпочтительном варианте осуществления растение кукурузы по данному изобретению проявляет устойчивость ко всем известным расам *Helminthosporium turcicum*, т.е. придаваемая устойчивость не является расоспецифической и может больше всего подходить для формирования широкой устойчивости к *Helminthosporium turcicum*.

Таблица 3. Шкала количественных признаков по результатам фенотипических испытаний в полевых условиях в разных локациях с естественной и искусственной инокуляцией *H. turcicum* (источник – Немецкий комитет по кукурузе (DMK)); AG сорт 27.02.02; (DMK J. Rath; RP Freiburg H.J. Imgraben)

Количественный признак	Фенотип
1	Растения не проявляют симптомов заболевания, 0%
2	Начало поражения, видны первые небольшие пятна (менее 2 см). Поражено менее 5% листовой поверхности.
3	На листовой поверхности образовались пятна. Поражено 5-10% листовой поверхности.
4	Поражено 10-20% листовой поверхности. Четко видимые пятна в фазе нескольких листьев.
5	Поражено 20-40% листовой поверхности. Пятна начинают

	сливаться.
6	Поражено 40-60% листовой поверхности. Наблюдается массовое поражение листьев.
7	Поражено 60-80% листовой поверхности. Около половины листьев деформированы или засохли вследствие грибкового заболевания.
8	Поражено 80-90% листовой поверхности. Более половины листьев деформированы или засохли вследствие грибкового заболевания.
9	Поражено 90-100% листовой поверхности. Растения почти полностью засохли.

В описании изобретения раскрывается генетическая или молекулярная структура локуса HTN1 путем обеспечения гаплотипа, путем картирования ярко выраженных маркеров, а также путем определения генов-кандидатов для придания устойчивости к патогену *Helminthosporium turcicum*.

Удивительно, но агрономичность растений кукурузы по данному изобретению была подтверждена в ходе фенотипических испытаний, проведенных в полевых условиях и в условиях теплицы. Удивление вызывает то, что в отличие от других линий, преобразованных по программе скрещивания с целью интеграции локуса HTN1 из Pepitilla, а также от известных из предшествующего уровня техники, у преобразованных линий, таких как В37HTN1, в дополнение к придаваемой HT-устойчивости в условиях отсутствия поражения *H. turcicum* и в аналогичных условиях окружающей среды (температура, снабжение питательными веществами, местоположение и т.п.), проявлялась значительная задержка между периодами цветения мужских и/или женских цветков по сравнению с соответствующими линиями без интрогрессии (например, изогенными линиями или исходными линиями). У растения кукурузы по данному изобретению период цветения соответствовал периоду цветения у аналогичного изогенного растения кукурузы, в геном которого не был интегрирован фрагмент хромосомы донорного сорта Pepitilla. «Периоды цветения» совпадают, если они отличаются друг от друга не более чем на 2 дня. Степень наблюдаемой задержки в этом случае сильно зависит от вида кукурузы или генотипа кукурузы, преобладающих условий окружающей среды, таких как состояние почвы, влажность, осадки, температура и т.п., и/или биотического стресса, такого как поражение патогеном, отличным от *H. turcicum*. Задержка составляла по меньшей мере 2 дня, по меньшей мере 3 дня, по меньшей мере 5 дней или по меньшей мере 7 дней. Такая

установившаяся разница между периодами цветения вызывалась сцепленным наследованием, как часть интрогрессии, что особенно удивительно, так как подобные наблюдения не известны из предшествующего уровня техники. Период цветения является важным агрономическим признаком. Он может непосредственно и значительно влиять на потенциал урожайности растения кукурузы. Более поздний период цветения, как правило, приводит к снижению урожайности.

Чтобы прояснить генетическую причину этого негативного явления и идентифицировать сцепленное наследование, были выполнены обширные программы возвратного скрещивания, сопровождавшиеся генотипированием и фенотипированием. Работе способствовало интенсивное развитие специфических молекулярных маркеров на фрагменте хромосомы, несущем HTN1. Технологии маркер-опосредованной селекции (MAS) и методы осуществления сфокусированных программ возвратного скрещивания (например, «клонирование на основе картирования») известны из источников предыдущего уровня техники (Gupta и Varshney, 2013). Лocus количественных признаков (QTL) с геном HTN1 устойчивости из донорного B37HTN1 или Peptilla локализовался в потомстве с помощью SSR-маркеров bnlg1067, umc1121, MA0002, MA0003, bnlg1782, umc1287, umc1960 и bnlg240 на хромосоме 8 (бин 8,06) между маркерами MA0002 (Таблица 4) и umc1287 (таблица 5) в участке размером 23,1 сМ (см. Рис. 1). У растений кукурузы с задержкой периода цветения местоположение локуса донорной последовательности геномного сегмента, ответственного за идентифицированное сцепленное наследование периода цветения, было успешно определено во втором интервале донора на фрагменте хромосомы (пример 3В; Рис. 3). У растения кукурузы по данному изобретению фрагмент хромосомы интегрируется в такое растение, которое не содержит второй интервал донора. Второй интервал возникает, например, от рекуррентного родителя, который не несет сцепленное наследование периода цветения, или от экзогенно интродуцируемого фрагмента гомологичной ДНК, не являющегося носителем сцепленного наследования, в подходящем векторе для целевой гомологичной рекомбинации. Второй интервал располагается проксимально и тесно сцеплен с локусом HTN1 устойчивости или с первым интервалом. Второй интервал представляет собой интервал между маркером в первом маркерном участке (M1), который фланкирован маркерами SYN14136 и PZE-108076510, и маркером во втором маркерном участке (M2), который фланкирован маркерами SYN24931 и PZE-108077560. Фланкирующие маркеры представлены в Таблице 4. Маркеры SYN14136,

PZE-108076510, SYN24931 и PZE-108077560 являются SNP-маркерами для использования в системе биоисследований KBioscience-KASP (www.lgcgenomics.com/genotyping/KASP-genotyping-reagents/KASP-overview/). Они четко определяют маркерные участки M1 и M2 по обеим сторонам последовательности сегмента, который в донорном B37HTN1 или Peritilla несет сцепленное наследование периода цветения. Кроме того, будучи полиморфными, эти маркеры также способны дифференцировать между донорными аллелями Peritilla и, например, аллелем рекуррентного родителя. Подробные сведения, касающиеся применения этих маркеров в качестве KASP-маркера, приводятся в Таблице 4. Подходящие примерные параметры гибридизации праймеров для ПЦР даны в Примере 2. Специалист в данной области может определить другие подходящие параметры гибридизации. Более того, специалист в данной области, обладающий знаниями об описываемых маркерных участках, в дополнение к указанным маркерам может разработать другие маркеры, в частности, полиморфные маркеры, в M1 и/или M2. Используя указанные здесь маркеры, в частности, маркеры SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 и PZE-108077560, либо самостоятельно разработанные маркеры в M1 и/или M2, специалист в данной области сможет легко установить, находится или нет в растении кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы с локусом HTN1 устойчивости донорного сорта Peritilla, второй интервал донора, описанный выше. Специалист в данной области будет также знать, что, например, в ходе процесса скрещивания или стратегии генетической инженерии с целью целевой рекомбинации хромосомный интервал может удаляться из донора, который, например, содержит геномные последовательности, вызывающие сцепленное наследование, с помощью гомологичной/генетической рекомбинации интегрированного фрагмента хромосомы. В этом случае интервал донора Peritilla может замещаться на соответствующий интервал генома рекуррентного родителя или экзогенно интродуцируемый фрагмент гомологичной ДНК. В этом отношении маркеры вообще и маркеры, раскрытые в данной заявке, в частности, могут использоваться для селекции. Ниже следует пример возможного использования маркеров для детекции аллеля. Детекция аллеля может, например, проводиться путем (а) выделения по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты из генома растения или растительной клетки/растения кукурузы или растительной клетки кукурузы и (б) исследования выделенной молекулы нуклеиновой кислоты с помощью по меньшей мере одного маркера, а также, альтернативно, путем (с) секвенирования аллеля одного и/или нескольких генотипов, (д) детекции

одного и/или нескольких полиморфизмов и/или (е) рестрикции с помощью эндонуклеазы рестрикции, обеспечивающей получение фрагментов различного размера в маркерном аллеле.

Предпочтительный вариант растения кукурузы по данному изобретению представляет собой растение кукурузы, как описано выше, характеризующееся тем, что фрагмент хромосомы не содержит второй интервал донора, который фланкирован а) маркерами SYN14136 и PZE-108077560, б) маркерами PZE-108076510 и PZE-108077560, с) маркерами SYN14136 и SYN24931, либо d) маркерами PZE-108076510 и SYN24931.

В предпочтительном варианте осуществления растение кукурузы по данному изобретению проявляет отклонение от нормы периода цветения мужских и/или женских цветков по сравнению с преобразованной Pepitilla линией, или с преобразованным Pepitilla растением, таким как B37HTN1, которое содержит интервал 2 между маркером в первом маркерном участке (M1), который фланкирован маркерами SYN14136 и PZE-108076510, и маркером во втором маркерном участке (M2), который фланкирован маркерами SYN24931 и PZE-108077560, при этом «отклонение от нормы периода цветения» означает, что преобразованная линия или преобразованное растение проявляет задержку по меньшей мере в 2 дня, по меньшей мере в 3 дня, по меньшей мере в 5 дней или по меньшей мере в 7 дней.

Еще один предпочтительный вариант растения кукурузы по данному изобретению представляет собой растение кукурузы, как описано выше, характеризующееся тем, что фрагмент хромосомы больше не содержит интервал донора (далее – третий интервал или интервал 3), между маркером во втором маркерном участке M2 и маркером в третьем маркерном участке M3, который фланкирован маркерами PZE-108093423 и PZE-108093748 (Таблица 4). Маркеры PZE-108093423 и PZE-108093748 являются SNP-маркерами для использования в системе биоисследований KBioscience-KASP (www.lgcgenomics.com/genotyping/KASP-genotyping-reagents/KASP-overview/). Они однозначно определяют маркерный участок M3. Будучи полиморфными, эти маркеры также подходят для различия между донорными аллелями и, например, аллелем рекуррентного родителя. Подробные сведения, касающиеся применения этих маркеров в качестве KASP-маркеров, приводятся в Таблице 4. Подходящие примерные параметры гибридизации праймеров для ПЦР даны в Примере 2. Специалист в данной области может также определить другие подходящие параметры

гибридизации. Более того, специалист в данной области, обладающий знаниями об описанном маркерном участке, в дополнение к указанным маркерам может разработать другие маркеры, в частности, полиморфные маркеры, в М3. Используя маркеры для М2, указанные выше, и указанные здесь маркеры PZE-108093423 и PZE-108093748, либо самостоятельно разработанные маркеры в М3, для специалиста в данной области не составит труда установить, находится или нет в растении кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы с локусом HTN1 устойчивости донорного сорта Pepitilla, третий интервал донора, описанный выше.

Еще один предпочтительный вариант растения кукурузы по данному изобретению представляет собой растение кукурузы, как описано выше, характеризующееся тем, что фрагмент хромосомы не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал и третий интервал донора и фланкирован а) маркерами SYN14136 и PZE-108093423, б) маркерами PZE-108076510 и PZE-108093423, в) маркерами SYN14136 и PZE-108093748, либо д) маркерами PZE-108076510 и PZE-108093748.

Еще один аспект изобретения заключается в том, что на фрагменте хромосомы могут определяться дополнительные генетические сегменты, которые в условиях отсутствия поражения *H. turcicum* способны оказывать большое негативное влияние на потенциал урожайности растения кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы с локусом HTN1 устойчивости из донорного сорта Pepitilla. Таким образом, независимо от задержки периода цветения, описанного выше, в преобразованных линиях, а также в преобразованных линиях, известных из предшествующего уровня техники, таких как В37HTN1, в дополнение к придаваемой HT-устойчивости отмечается значительное снижение урожайности, в частности, значительное снижение урожайности силоса по сравнению с соответствующими линиями без интрогрессии (например, изогенными линиями или исходными линиями). Причем это характерно и для линий, в геноме которых генетический сегмент донора, включающий интервал 2 (между маркером из М1 и М2) или интервал 2 и 3 (между маркером из М1 и М3), больше не присутствует. Это не является очевидным для специалиста в данной области, так как в сведениях из предшествующего уровня техники отсутствуют указания на такое сцепленное наследование в интрогрессивных линиях с HTN1. С целью выяснения генетической причины такого негативного с агрономической точки зрения фактора были выполнены обширные программы возвратного скрещивания, сопровождавшиеся генотипированием и фенотипированием. В

ходе этой работы на фрагменте хромосомы, несущем HTN1, интенсивно разрабатывались более точные и более специфические молекулярные маркеры. У растений кукурузы, обладающих низкой урожайностью (урожайностью силосной массы), на фрагменте хромосомы Repitilla было успешно определено местоположение последовательности геномного сегмента в двух последующих интервалах донора (далее – четвертый интервал или интервал 4 и пятый интервал или интервал 5) (Пример 3С; Рис. 3). У растения кукурузы по данному изобретению, содержащего соответствующий интервал без сцепленного наследования, например, от рекуррентного родителя, вместо четвертого и/или пятого интервала донора, несущего сцепленное наследование, не проявляется снижение урожайности силосной массы и, таким образом, его урожайность, в частности, урожайность на силос, такая же или сопоставимая с урожайностью линии без интрогрессии (например, изогенной линии или исходной линии). Урожайность силосной массы растения кукурузы по данному изобретению без четвертого и/или пятого интервалов доноров по сравнению с урожайностью силосной массы сопоставимого растения кукурузы со сцепленным наследованием может быть выше более чем на 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15% или 20%. Четвертый интервал расположен проксимально и тесно сцеплен с локусом HTN1 устойчивости или с первым интервалом.

Таким образом, в соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления растение кукурузы по данному изобретению представляет собой растение кукурузы, как описано выше, в котором фрагмент хромосомы больше не содержит i) четвертый интервал донора между маркером в третьем маркерном участке M3 и маркером в четвертом маркерном участке M4, который фланкирован маркерами MA0004 и MA0005, либо ii) генетический сегмент с четвертым интервалом между маркером в третьем маркерном участке M3 и маркером в седьмом маркерном участке M7, который фланкирован маркерами MA0005 и MA0021, и/или в котором фрагмент хромосомы больше не содержит i) пятый интервал донора между маркером в пятом маркерном участке M5, который фланкирован маркерами MA0006 и PZE-108097482, и маркером в шестом маркерном участке M6, который фланкирован маркерами PZE-108107671 и SYN14196, либо ii) генетический сегмент с пятым интервалом между маркером в восьмом маркерном участке M8, который фланкирован маркерами MA0022 и MA0013, и маркером в шестом маркерном участке M6, который фланкирован маркерами PZE-108107671 и SYN14196. Фланкирующие маркеры приведены

в Таблице 4. Маркеры MA0004, MA0005, MA0006, MA0013, MA0021, MA0022, PZE-108097482, PZE-108107671 и SYN14196 являются SNP-маркерами для использования в системе биоисследований KBioscience-KASP (www.lgcgenomics.com/genotyping/KASP-genotyping-reagents/KASP-overview/). Они однозначно определяют маркерные участки M4, M5, M6, M7 и M8, которые вместе с M3 обозначают последовательности сегментов, несущих сцепленное наследование признака урожайности силосной массы донора V37HTN1 или Pepitilla. Будучи полиморфными, эти маркеры также подходят для обнаружения различий между донорными аллелями и, например, аллелем рекуррентного родителя. Подробные сведения, касающиеся применения этих маркеров в качестве KASP-маркеров, приведены в Таблице 4. Подходящие примерные параметры гибридизации праймеров для ПЦР даны в Примере 2. Специалист в данной области может также определить другие подходящие параметры гибридизации. Помимо этого, специалист в данной области, обладающий знаниями об описанном маркерном участке, в дополнение к указанным маркерам может создавать другие маркеры, в частности, полиморфные маркеры, в M4, M5, M6, M7 и/или M8. Используя указанные здесь маркеры MA0004, MA0005, MA0006, MA0013, MA0021, MA0022, PZE-108097482, PZE-108107671 и SYN14196 или самостоятельно разработанные маркеры в M4, M5, M6, M7 и/или M8 вместе с маркерами в M3, описанными выше, для специалиста в данной области не составит труда установить, содержит или нет растение кукурузы, в геном которого был интегрирован фрагмент хромосомы с локусом HTN1 устойчивости донорного сорта Pepitilla, четвертый интервал донора, как описано выше.

Согласно еще одному наиболее предпочтительному варианту осуществления растение кукурузы по данному изобретению представляет собой растение кукурузы, как описано выше, в котором фрагмент хромосомы i) не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал, третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован а) маркерами SYN14136 и MA0004, б) маркерами PZE-108076510 и MA0004, в) маркерами SYN14136 и MA0005 или д) маркерами PZE-108076510 и MA0005, либо ii) не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал и третий интервал донора и фланкирован а) маркерами SYN14136 и PZE-108093423, б) маркерами PZE-108076510 и PZE-108093423, в) маркерами SYN14136 и PZE-108093748 или д) маркерами PZE-108076510 и PZE-108093748, а также пятый интервал донора, либо iii) не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал, третий интервал и четвертый интервал донора и

фланкирован а) маркерами SYN14136 и MA0004, б) маркерами PZE-108076510 и MA0004, с) маркерами SYN14136 и MA0005 или д) маркерами PZE-108076510 и MA0005, а также пятый интервал донора.

Согласно еще одному наиболее предпочтительному варианту осуществления растение кукурузы по данному изобретению представляет собой растение кукурузы, как описано выше, в котором фрагмент хромосомы (i) не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал, третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован а) маркерами SYN14136 и MA0021 или б) маркерами PZE-108076510 и MA0021, либо (ii) не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал, третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован а) маркерами SYN14136 и MA0021 или б) маркерами PZE-108076510 и MA0021, а также пятый интервал донора, либо (iii) не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал, третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован а) маркерами SYN14136 и MA0021 или б) маркерами PZE-108076510 и MA0021, а также второй генетический сегмент, который включает пятый интервал донора и фланкирован а) маркерами MA0022 и PZE-108107671, б) маркерами MA0022 и SYN4196, с) маркерами MA0013 и PZE-108107671 или маркерами MA0013 и SYN4196, либо (iv) не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал и третий интервал донора и фланкирован а) маркерами SYN14136 и PZE-108093423, б) маркерами PZE-108076510 и PZE-108093423, с) маркерами SYN14136 и PZE-108093748 или д) маркерами PZE-108076510 и PZE-108093748, а также второй генетический сегмент, который включает пятый интервал донора и фланкирован а) маркерами MA0022 и PZE-108107671, б) маркерами MA0022 и SYN4196, с) маркерами MA0013 и PZE-108107671 или маркерами MA0013 и SYN4196, либо (v) не содержит генетический сегмент, который включает второй интервал, третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован а) маркерами SYN14136 и MA0021 или б) маркерами PZE-108076510 и MA0021, а также второй генетический сегмент, который включает пятый интервал донора и фланкирован а) маркерами MA0022 и PZE-108107671, б) маркерами MA0022 и SYN4196, с) маркерами MA0013 и PZE-108107671 или маркерами MA0013 и SYN4196.

Как вариант, поставленная цель настоящего изобретения достигается путем получения растения кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы донорного сорта *Peritilla*, характеризующееся тем, что этот фрагмент хромосомы включает первый интервал донора, который

проявляет наличие донорных аллелей в соответствии с гаплотипом, представленным в Таблице 2, и содержит полинуклеотид, придающий устойчивость к *Helminthosporium turcicum*, при этом фрагмент хромосомы не содержит i) четвертый интервал донора между маркером в третьем маркерном участке, который фланкирован маркерами PZE-108093423 и PZE-108093748, и маркером в четвертом маркерном участке, который фланкирован маркерами MA0004 и MA0005, либо ii) генетический сегмент с четвертым интервалом между маркером в третьем маркерном участке M3 и маркером в седьмом маркерном участке M7, который фланкирован маркерами MA0005 и MA0021. Вышеприведенная характеристика, например, что касается маркеров, полинуклеотида или фенотипирования, подходит как для данного случая, так и для любых иных альтернативных решений проблемы, а также раскрытых вариантов осуществления настоящего изобретения.

Предпочтительный вариант инновационного растения кукурузы представляет собой растение кукурузы, как описано выше, в котором фрагмент хромосомы i) не содержит четвертый интервал донора, который фланкирован а) маркерами PZE-108093423 и MA0004, б) маркерами PZE-108093748 и MA0004, с) маркерами PZE-108093423 и MA0005 или d) маркерами PZE-108093748 и MA0005, либо (ii) не содержит генетический сегмент, который включает четвертый интервал донора и фланкирован а) маркерами PZE-108093423 и MA0021 или б) маркерами PZE-108093748 и MA0021.

Еще одним предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является описанное здесь растение кукурузы, в котором фрагмент хромосомы более не содержит третий интервал донора между маркером во втором маркерном участке M2 и маркером в третьем маркерном участке M3.

Еще одним предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является растение кукурузы, как описано выше, в котором фрагмент хромосомы не содержит генетический сегмент, который включает третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован а) маркерами SYN24931 и MA0004, б) маркерами PZE-108077560 и MA0005, с) маркерами SYN24931 и MA0005, d) маркерами PZE-108077560 и MA0005, e) маркерами SYN24931 и MA0021 или f) маркерами PZE-108077560 и MA0021.

Еще одним предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является описанное здесь растение кукурузы, в котором фрагмент хромосомы i) более не содержит пятый интервал донора между маркером в пятом маркерном участке M5 и маркером в шестом маркерном участке M6, либо ii) не содержит генетический сегмент с пятым интервалом между маркером в восьмом маркерном участке M8 и маркером в шестом маркерном участке M6.

Еще одним наиболее предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является описанное здесь растение кукурузы, в котором фрагмент хромосомы i) не содержит генетический сегмент, который включает третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован а) маркерами SYN24931 и MA0004, б) маркерами PZE-108077560 и MA0004, с) маркерами SYN24931 и MA0005 или d) маркерами PZE-108077560 и MA0005, а также пятый интервал, либо ii) не содержит генетический сегмент, который включает третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован а) маркерами SYN24931 и MA0004, б) маркерами PZE-108077560 и MA0004, с) маркерами SYN24931 и MA0005 или d) маркерами PZE-108077560 и MA0005, а также второй генетический сегмент, который включает пятый интервал и фланкирован а) маркерами MA0022 и SYN4196, б) маркерами MA0022 и PZE-108107671, с) маркерами MA0013 и SYN4196 или маркерами MA0013 и PZE-108107671.

Еще одним наиболее предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является описанное здесь растение кукурузы, в котором фрагмент хромосомы i) не содержит генетический сегмент, который включает третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован а) маркерами SYN24931 и MA00021 или б) маркерами PZE-108077560 и MA00021, а также пятый интервал, либо ii) не содержит генетический сегмент, который включает третий интервал и четвертый интервал донора и фланкирован а) маркерами SYN24931 и MA00021 или б) маркерами PZE-108077560 и MA00021, а также второй генетический сегмент, который включает пятый интервал и фланкирован а) маркерами MA0022 и PZE-108107671, б) маркерами MA0022 и SYN4196, с) маркерами MA0013 и PZE-108107671 или маркерами MA0013 и SYN4196.

Как вариант, поставленная цель настоящего изобретения достигается путем получения растения кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы донорного сорта Peritilla, характеризующееся тем, что этот фрагмент хромосомы включает первый интервал донора, который

проявляет наличие донорных аллелей в соответствии с гаплотипом, представленным в Таблице 2, и содержит полинуклеотид, придающий устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы, при этом фрагмент хромосомы не содержит i) пятый интервал донора между маркером в пятом маркерном участке, который фланкирован маркерами MA0006 и PZE-108097482, и маркером в шестом маркерном участке, который фланкирован маркерами PZE-108107671 и SYN4196, либо ii) генетический сегмент с пятым интервалом между маркером в восьмом маркерном участке M8, который фланкирован маркерами MA0022 и MA0013, и маркером в шестом маркерном участке M6, который фланкирован маркерами PZE-108107671 и SYN4196.

Еще одним наиболее предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является описанное здесь растение кукурузы, в котором фрагмент хромосомы больше не содержит третий интервал донора между маркером во втором маркерном участке M2 и маркером в третьем маркерном участке M3.

Еще одним наиболее предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является растение кукурузы, как описано выше, в котором фрагмент хромосомы фланкирован а) маркером во втором маркерном участке M2 и маркером в шестом маркерном участке M6, б) маркером в третьем маркерном участке M3 и маркером в шестом маркерном участке M6, в) маркером в четвертом маркерном участке M4 и маркером в шестом маркерном участке M6, г) маркером в седьмом маркерном участке M7 и маркером в шестом маркерном участке M6, д) маркером в седьмом маркерном участке M7 и маркером в шестом маркерном участке M6, е) маркером в маркерном участке M1 и маркером в маркерном участке M5, ф) маркером во втором маркерном участке M2 и маркером в пятом маркерном участке M5, г) маркером в третьем маркерном участке M3 и маркером в пятом маркерном участке M5, h) маркером в четвертом маркерном участке M4 и маркером в пятом маркерном участке M5, i) маркером в седьмом маркерном участке M7 и маркером в пятом маркерном участке M5, j) маркером в маркерном участке M1 и маркером в маркерном участке M8, k) маркером во втором маркерном участке M2 и маркером в восьмом маркерном участке M8, l) маркером в третьем маркерном участке M3 и маркером в восьмом маркерном участке M8, m) маркером в четвертом маркерном участке M4 и маркером в восьмом маркерном участке M8, либо n) маркером в седьмом маркерном участке M7 и маркером в восьмом маркерном участке M8.

Еще одним наиболее предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является растение кукурузы, как описано выше, в котором фрагмент хромосомы фланкирован а) маркерами SYN24931 и SYN4196, б) маркерами PZE-108077560 и SYN4196, в) маркерами SYN24931 и PZE-108107671, д) маркерами PZE-108077560 и PZE-108107671, е) маркерами PZE-108093423 и SYN4196, ф) маркерами PZE-108093748 и SYN4196, г) маркерами PZE-108093423 и PZE-108107671, х) маркерами PZE-108093748 и PZE-108107671, и) маркерами MA0004 и SYN4196, ж) маркерами MA0005 и SYN4196, з) маркерами MA0004 и PZE-108107671, л) маркерами MA0005 и PZE-108107671, м) маркерами MA0021 и SYN4196, н) маркерами MA0021 и PZE-108107671, о) маркерами PZE-108076510 и MA0006, п) маркерами SYN14136 и MA0006, қ) маркерами PZE-108076510 и PZE-108097482, р) маркерами SYN14136 и PZE-108097482, с) маркерами SYN24931 и PZE-108097482, т) маркерами PZE-108077560 и PZE-108097482, у) маркерами SYN24931 и MA0006, в) маркерами PZE-108077560 и MA0006, ы) маркерами PZE-108093423 и PZE-108097482, э) маркерами PZE-108093748 и PZE-108097482, я) маркерами PZE-108093423 и MA0006, щ) маркерами PZE-108093748 и MA0006, ь) маркерами MA0004 и PZE-108097482, ы) маркерами MA0005 и PZE-108097482, ь) маркерами MA0004 и MA0006, э) MA0005 и MA0006, ь) маркерами MA0021 и PZE-108097482, ы) маркерами MA0021 и MA0006, ь) маркерами PZE-108076510 и MA0013, ы) маркерами SYN14136 и MA0013, ь) маркерами PZE-108076510 и MA0022, ы) маркерами SYN14136 и MA0022, ь) маркерами SYN24931 и MA0013, э) маркерами PZE-108077560 и MA0013, ы) маркерами SYN24931 и MA0022, э) маркерами PZE-108077560 и MA0022, ы) маркерами PZE-108093423 и MA0013, э) маркерами PZE-108093748 и MA0013, ы) маркерами PZE-108093423 и MA0022, э) маркерами PZE-108093748 и MA0022, ы) маркерами MA0004 и MA0013, э) маркерами MA0005 и MA0013, ы) маркерами MA0004 и MA0022, ы) маркерами MA0005 и MA0022, ы) маркерами MA0021 и MA0013, э) маркерами MA0021 и MA0022.

Еще одним наиболее предпочтительным вариантом осуществления растения кукурузы по данному изобретению является растение кукурузы, как описано выше, в котором фрагмент хромосомы локализован между а) маркером во втором маркерном участке M2 и маркером в шестом маркерном участке M6, б) маркером в третьем маркерном участке M3 и маркером в шестом маркерном участке M6, в) маркером в четвертом маркерном участке M4 и маркером в шестом маркерном участке M6, г) маркером в седьмом

маркерном участке М7 и маркером в шестом маркерном участке М6, е) маркером в первом маркерном участке М1 и маркером в пятом маркерном участке М5, ф) маркером во втором маркерном участке М2 и маркером в пятом маркерном участке М5, г) маркером в третьем маркерном участке М3 и маркером в пятом маркерном участке М5, h) маркером в четвертом маркерном участке М4 и маркером в пятом маркерном участке М5, и) маркером в седьмом маркерном участке М7 и маркером в пятом маркерном участке М5, j) маркером в маркерном участке М1 и маркером в маркерном участке М8, к) маркером во втором маркерном участке М2 и маркером в восьмом маркерном участке М8, l) маркером в третьем маркерном участке М3 и маркером в восьмом маркерном участке М8, m) маркером в четвертом маркерном участке М4 и маркером в восьмом маркерном участке М8, либо n) маркером в седьмом маркерном участке М7 и маркером в восьмом маркерном участке М8.

Таблица 4. Последовательности праймеров для KASP-маркеров и привязка к донорным аллелям В37HTN1, получаемым от местного сорта Peritilla (аллель X и аллель Y: определение доли биаллельных однонуклеотидных замен)

SNP-маркер	Позиция маркера AGPv02 [п.о.]	Аллель-специфические праймеры X(5'-3') [SEQ ID NO]	Аллель-специфические праймеры Y(5'-3') [SEQ ID NO]	Общий праймер (5'-3') [SEQ ID NO]	Донорные аллели В37HTN1 (SNP)	Маркерный участок
SYN14136	131681497	17	18	19	A	M1
PZE-108076510	131905855	20	21	22	G	M1
SYN24931	132877982	23	24	25	A	M2
PZE-108077560	133189880	26	27	28	A	M2
PZE-108093423	150279048	29	30	31	A	M3
PZE-108093748	150562764	32	33	34	G	M3
PZE-108107671	161543406	35	36	37	C	M6
SYN4196	161766769	38	39	40	C	M6
MA0004	151688652	41	42	43	A	M4
MA0005	151831049	44	45	46	C	M4/M7
MA0021	151907173	241	242	243	G	M7
MA0006	152888310	47	48	49	A	M5
PZE-108097482	153139646	50	51	52	A	M5

MA0002	147720853	53	54	55	A	
MA0003	151346184	56	57	58	C	
MA0007	152045106	59	60	61	T	
MA0008	152045141	62	63	64	T	
MA0009	152045402	65	66	67	T	
MA0010	152045516	68	69	70	C	
MA0011	152045912	71	72	73	T	
MA0012	152046502	74	75	76	A	
MA0022	152046529	244	245	246	A	M8
MA0013	152133057	77	78	79	G	M8
MA0014	152133380	80	81	82	T	
MA0015	152144310	83	84	85	A	
MA0016	152250992	86	87	88	A	
MA0017	152301656	89	90	91	A	
MA0018	152304127	92	93	94	A	
MA0019	152630794	95	96	97	C	
MA0020	152753635	98	99	100	A	
PZE-108095998	152433358	101	102	103	T	
PZE-108096011	152435855	104	105	106	A	
PZE-108096610	152703579	107	108	109	C	
PZE-108096791	152887338	110	111	112	G	

Кроме того, настоящее изобретение касается семян или зерна, ткани, органа, части и клетки растений кукурузы по данному изобретению, описанных выше. В этом отношении указанные семена или зерно представляют собой семена или зерно, в геном которых интегрирован фрагмент хромосомы согласно изобретению.

Еще один аспект настоящего изобретения касается идентификации устойчивого к *H. turcicum* растения кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы донорного сорта Peritilla, и которое содержит потомков по меньшей мере двух аллелей в своем геноме, при этом один аллель локализован в геномном сегменте, который фланкирован маркером в первом маркерном участке M1, втором маркерном участке M2, третьем маркерном участке M3, четвертом маркерном участке M4 или седьмом маркерном участке M7 и описанным выше полинуклеотидом, который придает устойчивость к *H. turcicum* растению кукурузы, и по меньшей мере один аллель локализован в геномном сегменте, который фланкирован маркером в шестом маркерном участке M6, пятом маркерном участке M5 или восьмом маркерном участке M8. Маркерные участки и приводимые в качестве

примеров маркеры в этих маркерных участках представлены выше. Предпочтительно, чтобы идентифицируемое растение кукурузы представляло собой растение кукурузы по данному изобретению. Изобретение также касается растения кукурузы, которое идентифицируется с помощью упомянутого способа идентификации.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу повышения урожайности *H. turcicum* устойчивого растения кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы донорного сорта *Peritilla*, характеризующемуся тем, что этот способ включает этап удаления второго интервала донора, четвертого интервала донора или пятого интервала донора, при этом фрагмент хромосомы содержит описанный выше первый интервал донора, который включает донорные аллели в соответствии с гаплотипом, представленным в Таблице 2, и полинуклеотид, который придает устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы. Например, удаление может осуществляться путем генетической рекомбинации в процессе скрещивания двух растений кукурузы, при этом родительское растение кукурузы несет локус HTN1 устойчивости *Peritilla*. Помимо применения традиционных методов скрещивания для осуществления генетической рекомбинации, в результате которой происходит замещение по меньшей мере одного донорного интервала со сцепленным наследованием, идентифицированным выше, геномными последовательностями рекуррентного родителя, в которых, предпочтительно, отсутствуют нежелательные гены, специалисту в данной области доступны многочисленные инструменты современной биотехнологии, открывающие путь к использованию точных методов генной инженерии. Примерами известных инструментов являются мегануклеазы (Silva и соавт., 2011), хоминг-эндонуклеазы (Chevalier, 2002), нуклеазы «цинковые пальцы», нуклеазы TALE (WO 2010/079430; WO 2011/072246) или CRISPR (Gaj и соавт., 2013). Это искусственно созданные гибридные белки с нуклеазной активностью, способные расщеплять двухцепочечные молекулы нуклеиновой кислоты, такие как ДНК растений, и, таким образом, вносить двухцепочечные разрывы в целевые локусы в геноме. Используя механизмы защиты самих клеток для репарации индуцируемых двухцепочечных разрывов, можно осуществлять гомологичную рекомбинацию или «негомологичное соединение концов», что способно приводить к удалению интервалов донора, несущих сцепленное наследование. Подходящие целевые последовательности в геноме для распознавания доменов нуклеаз можно, например, брать из информации о последовательности SNP-маркеров

(Таблица 4) или в их интервалах. Специалист в данной области способен идентифицировать другие последовательности, предпочтительно, внутри или между шестью маркерными участками, описанными выше, которые являются подходящими в качестве целевых последовательностей для распознавания доменов нуклеаз.

В этом отношении далее следует более подробное описание двух подходов генной инженерии, с помощью которых облегчается или непосредственно обеспечивается удаление из генома растения нуклеотидных последовательностей, несущих сцепленное наследование. Следующие методы, наряду с традиционными методами скрещивания, могут быть использованы для создания растений кукурузы по данному изобретению.

Как уже отмечалось, современные молекулярные инструменты способны индуцировать двухцепочечные разрывы в определенных локусах ДНК генома растения. В этом отношении использование нуклеаз TALE (TALEN) или нуклеаз цинковые пальцы (ZFN) оказалось особенно успешным. TALE или ZF распознавание домена способствует его специфическому связыванию с любым локусом в геноме. Зная последовательность целевой области, TALE или ZF распознавание доменов может быть разработано таким образом, чтобы они связывались только с желаемыми локусами в геноме. Если, например, распознаваемая последовательность сплавляется с неспецифической эндонуклеазой, такой как FokI, двухцепочечный разрыв (DSB) может индуцироваться в определенных локусах генома, что вызывает целевой геномный инжиниринг (Tzfira и соавт., 2012; Li и соавт., 2011; Puchta и Hohn, 2010). Специалист в данной области будет знать, как обращаться с эндонуклеазами FokI, и как обеспечивать подходящие TALEN и ZFN из предшествующего уровня.

Индукцированный двухцепочечный разрыв может, например, вызывать гомологичную рекомбинацию между эндогенным локусом целевого гена (например, одним из вышеупомянутых маркерных участков) и экзогенно интродуцированным фрагментом гомологичной ДНК, который, например, не является носителем сцепленного наследования (например, в подходящем донорном векторе). Это так называемое замещение генов или редактирование геномов может осуществляться *in vitro* и не требует выполнения каких-либо этапов скрещивания между двумя растениями. В связи с этим растения, подлежащие модифицированию, должны быть транзистентно трансформированы, с одной стороны, нуклеиновыми кислотами, кодирующими указанные TALEN и ZFN, и, с другой стороны, фрагментами

экзогенной ДНК. Фрагмент ДНК может происходить от растения того же вида и, например, соответствовать сегменту хромосомы, который должен быть замещен, но без сцепленного наследования. После завершения индуцированной гомологичной рекомбинации клетки с модифицированным геномом можно регенерировать в растения и затем выделять, чтобы убедиться, было ли удаление сцепленного наследования успешным и не были ли снова утрачены элементы ранее трансформированной ДНК при делении клеток в ходе регенерации. Для этих целей могут использоваться маркеры, описанные выше. Методы для трансформации и регенерации известны из предшествующего уровня техники. Эти методы обсуждаются ниже.

Более того, TALEN и ZFN могут интродуцироваться трансгенным путем в процессе мейоза, в ходе которого в заранее определенных местах в геноме индуцируются двухцепочечные разрывы и, таким образом, увеличивается вероятность рекомбинации в этих местах на стадии кроссинговера. Это может способствовать исключению сцепленного наследования. Специалист в данной области знает, что после завершения мейоза, растения, у которых отсутствует сцепленное наследование и нуклеазы TALEN и ZFN, получают из гаплоидных клеток.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение касается способа получения растения кукурузы по данному изобретению, который состоит из следующих этапов: (A) получения первого растения кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы донорного сорта *Peritilla*, характеризующегося тем, что указанный фрагмент хромосомы содержит первый интервал донора, который проявляет донорные аллели в соответствии с гаплотипом, представленным в Таблице 2, и полинуклеотид, придающий устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы, при этом фрагмент хромосомы содержит второй интервал донора и/или четвертый интервал донора и/или пятый интервал донора, (B) получения второго растения кукурузы, (C) скрещивания растения кукурузы (A) с растением кукурузы (B) и (D) отбора растения кукурузы по данному изобретению, предпочтительно с использованием одного из маркеров, описанных выше. Как вариант, настоящее изобретение касается способа получения растения кукурузы по данному изобретению, состоящего из следующих этапов: (A) транзиентной трансформации клетки растения кукурузы первой нуклеотидной последовательностью, кодирующей первый белок с эндонуклеазной активностью (например, гибридный белок TALE или ZF), способный индуцировать двухцепочечный разрыв ДНК между

маркерными участками M2 и M3 в клетке растения кукурузы, и второй нуклеотидной последовательностью, кодирующей второй белок с эндонуклеазной активностью (например, гибридный белок TALE или ZF), способный индуцировать двухцепочечный разрыв ДНК в геноме клетки растения кукурузы между маркерными участками M5 и M6, (B) транзientной интродукции донорного вектора в первую клетку растения кукурузы, несущую фрагмент хромосомы донорного сорта Pepitilla, при этом фрагмент хромосомы содержит первый интервал донора, который проявляет донорные аллели в соответствии с гаплотипом, представленным в таблице 2, и полинуклеотид, придающий устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы, причем фрагмент хромосомы дополнительно содержит хромосомные сегменты донорного сорта Pepitilla между сайтами двухцепочечного разрыва (A), в результате чего между геномом первой клетки растения кукурузы и фрагментом хромосомы донорного вектора происходит гомологичная трансформация, (C) регенерации растения кукурузы из клетки растения кукурузы, (D) идентификации растения кукурузы по данному изобретению, предпочтительно с использованием по меньшей мере одного из маркеров, описанных выше. Наиболее предпочтительно, чтобы транзientно индуцированные первая и вторая последовательности нуклеиновой кислоты и донорные векторы затем утрачивались. Специалист в данной области будет знать, как это осуществить и как это детектировать.

Еще один аспект изобретения касается маркеров, описанных выше, в качестве олигонуклеотидов, в частности, олигонуклеотидов в качестве праймеров. Предпочтительно, чтобы олигонуклеотиды были выделенными олигонуклеотидами. Олигонуклеотид содержит молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую одну из нуклеотидных последовательностей, выбираемых из SEQ ID NO: 41-49, 53-100 и 229-250. Кроме того, настоящее изобретение касается использования олигонуклеотида, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую одну из нуклеотидных последовательностей, выбираемых из SEQ ID NO: 17-250, для идентификации растения кукурузы, устойчивого к *H. turcicum*. Предпочтительно, чтобы устойчивость происходила от донорного сорта Pepitilla и представляла собой HTN1.

Как вариант, проблема настоящего изобретения решается трансгенным растением, в частности, трансгенным растением кукурузы, которое содержит трансгенную клетку растения, как описано ниже. Изобретение также касается

части такого растения по данному изобретению, при этом часть может представлять собой отдельную клетку, ткань, орган или комбинацию нескольких клеток, тканей или органов. Примером комбинации нескольких органов является цветок и семена. В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления изобретение относится к семенам трансгенного растения, характеризующимся тем, что эти семена содержат полинуклеотид по данному изобретению в качестве трансгена, как показано ниже. Предпочтительно, чтобы трансгенное растение по настоящему изобретению, в частности, растение вида *Zea mays*, проявляло более высокую степень устойчивости к *H. turcicum*, чем соответствующее нетрансформированное растение (изогенное растение без трансгена). Трансгенное НТ-устойчивое растение по данному изобретению проявляет повышенную степень устойчивости к *H. turcicum* по меньшей мере по одному количественному признаку, по меньшей мере 2 количественным признакам или по меньшей мере 3 количественным признакам и наиболее предпочтительно по меньшей мере 4 количественным признакам (см. схему количественных признаков, представленную в Таблице 3).

Более того, изобретение обеспечивает способ получения трансгенного растения, который включает этап вставки полинуклеотида по данному изобретению или вектора по данному изобретению, описанному ниже, в клетку растения и, как вариант, стадию отбора трансгенной клетки растения. Указанный способ получения трансгенного растения характеризуется последующим этапом, включающим регенерацию трансгенного растения из трансгенной клетки растения, получаемой на первой стадии. Специалисту в данной области известны способы регенерации из предшествующего уровня техники.

Дополнительный аспект настоящего изобретения касается полинуклеотида, содержащего один или несколько придающих устойчивость генов локуса HTN1 из *Peritilla* (Таблица 1) или выбираемых из RLK1 и EXT1 (см. Таблицу 1) или их аллелей. Гены или аллели генов обуславливают устойчивый фенотип с признаками, типичными для HTN1 в условиях поражения *H. turcicum*. Структурная организация полинуклеотида характеризуется тем, что он содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая (а) включает нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 15, (б) включает нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой одной из

нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 15, предпочтительно по всей ее длине, (c) гибридизуется с комплементарной нитью молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с (a) или (b) в жестких условиях, (d) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 или 16, либо (e) кодирует полипептид, имеющий нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой одной из аминокислотных последовательностей в соответствии с (d). Согласно предпочтительному варианту осуществления полипептид характеризуется тем, что он содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая (aa) включает нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или 5, (bb) включает нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1 или 5, предпочтительно по всей ее длине, (cc) гибридизуется с комплементарной цепью молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с (aa) или (bb) в жестких условиях, (dd) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или 6, либо (ee) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой одной из аминокислотных последовательностей в соответствии с (dd). Предпочтительно, чтобы полинуклеотид был выделенным и/или очищенным из естественной генетической среды или находился в чистой или гомогенной форме. Предпочтительно, чтобы полинуклеотид представлял собой ДНК, наиболее предпочтительно кДНК, т.е. включал кДНК одного или нескольких генов, придающих устойчивость (Таблица 1). Однако он может также находиться в форме РНК. Специалист в данной области знает, как расшифровать последовательность геномной ДНК из информации о последовательностях, которая здесь раскрыта. Полинуклеотид по данному изобретению кодирует по меньшей мере один полипептид, способный придавать устойчивость к патогену *Helminthosporium turcicum* растению, в котором этот полипептид экспрессируется. Предпочтительно, чтобы полипептид, кодируемый полинуклеотидом по данному изобретению или его частями, придавал устойчивость к патогену *Helminthosporium turcicum*, в частности, растению рода *Zea* или растению вида *Zea mays*.

Настоящее изобретение также касается полипептида, способного придавать устойчивость к *H. turcicum* растению, в котором этот полипептид экспрессируется и который кодируется полинуклеотидом по данному изобретению или его частью. Предпочтительно, полипептид включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 или 16, наиболее предпочтительно аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или 6. Указанный полипептид может быть выделенным полипептидом.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение касается вектора, который содержит полинуклеотид по данному изобретению. Вектор может представлять собой плазмиду, космиду, фаг или экспрессирующий вектор, трансформирующий вектор, шаттл-вектор или клонирующий вектор. Он может быть двухцепочечным или одноцепочечным, линейным или кольцевым; он может трансформировать прокариотического или эукариотического хозяина либо путем внедрения в его геном, либо путем экстрахромосомной перестройки. Предпочтительно, чтобы полинуклеотид по данному изобретению был оперативно связан в экспрессирующем векторе с одной или несколькими регуляторными последовательностями, обеспечивающими транскрипцию и, как вариант, экспрессию в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Например, полинуклеотид может находиться под контролем подходящих промоторов или терминатора. Подходящими промоторами могут быть конститутивно индуцируемые промоторы (например, 35S промотор из «вируса мозаики цветной капусты» (Odell и соавт., 1985)); наиболее подходящими промоторами являются патоген-индуцируемые промоторы (например, PR1 промотор петрушки (Rushton и соавт., 1996)). Наиболее подходящими патоген-индуцируемыми промоторами являются синтетические или химерные промоторы, которые не встречаются в природе, состоят из нескольких элементов и содержат минимальный промотор, а также, вверх по течению от минимального промотора по меньшей мере один cis-регуляторный элемент, который действует как сайт связывания специальных факторов транскрипции. Химерные промоторы синтезируются под заказ и индуцируются различными факторами или повторно праймируются. Примеры таких промоторов можно найти в международных публикациях WO 2000/29592 и WO 2007/147395. Примером подходящего терминатора является pos-терминатор (Depicker и соавт., 1982).

Помимо векторов, описанных выше, настоящее изобретение обеспечивает способ встраивания вектора, как описано, в клетку-хозяина. Например, вектор может встраиваться посредством конъюгации, мобилизации, биолиственной трансформации, трансформации агробактериями, трансфекции, трансдукции, вакуумной инфльтрации или электропорации. Специалисту в данной области известны такие способы, а также способы получения описанных векторов (Sambrook и соавт., 2001).

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей полипептид или вектор по данному изобретению. В контексте настоящего изобретения клетка-хозяин может быть прокариотической клеткой (например, бактериальной) или эукариотической клеткой (например, клеткой растения или дрожжей). Предпочтительно фермент представляет собой агробактерию, например, *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes* или клетку растения, которая содержит полинуклеотид или вектор по данному изобретению. Специалисту в данной области известны многочисленные методы, например, такие как конъюгация или электропорация, для встраивания полинуклеотида или вектора по данному изобретению в агробактерию, а также различные методы трансформации (биолиственная трансформация, агробактериальная трансформация), посредством которых можно встраивать полинуклеотид или вектор по настоящему изобретению в клетку растения (Sambrook и соавт., 2001).

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к трансгенной клетке растения, содержащей полинуклеотид по данному изобретению в качестве трансгена или вектор по данному изобретению. Примером такой трансгенной клетки растения является клетка растения, которая предпочтительно стабильно трансформирована полинуклеотидом или вектором по данному изобретению. В предпочтительном варианте трансгенной клетки растения полинуклеотид оперативно связан с одной или несколькими регуляторными последовательностями, обеспечивающими транскрипцию и, как вариант, экспрессию в клетке растения. Таким образом, полный конструкт полинуклеотида по данному изобретению и регуляторная последовательность(и) могут представлять собой трансген. Примерами таких регуляторных последовательностей являются промотор или терминатор. Специалисту в данной области известны многочисленные функциональные промоторы и терминаторы, которые могут использоваться в растениях. Трансгенная клетка растения по данному изобретению, в частности, клетка растения вида *Zea mays*, предпочтительно проявляет более высокую

устойчивость к *H. turcicum*, чем соответствующая нетрансформированная клетка растения ((изогенная) клетка растения без трансгена). Трансгенные НТ-устойчивые клетки растения по данному изобретению проявляют повышенную устойчивость к *H. turcicum* по меньшей мере по одному количественному признаку, предпочтительно по меньшей мере 2 количественным признакам или по меньшей мере 3 количественным признакам и наиболее предпочтительно по меньшей мере 4 количественным признакам (см. схему количественных признаков в Таблице 3). Объектом настоящего изобретения также является способ получения трансгенной клетки растения по изобретению, включающий этап вставки полинуклеотида или вектора по изобретению в клетку растения. Например, вставка может осуществляться посредством трансформации, предпочтительно стабильной трансформации. Специалисту в данной области известны подходящие методы встройки, такие как биолистическая трансформация, агробактериальная трансформация или электропорация (Sambrook и соавт., 2001).

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу придания или повышения устойчивости к *H. turcicum* растению, предпочтительно растению вида *Zea mays*, который включает этап трансформации клетки растения полинуклеотидом или вектором по данному изобретению. Предпочтительно, чтобы указанный способ приводил к повышению устойчивости к *H. turcicum* по меньшей мере по одному количественному признаку, более предпочтительно по меньшей мере 2 количественным признакам или по меньшей мере 3 количественным признакам, наиболее предпочтительно по меньшей мере 4 количественным признакам (см. схему количественных признаков, представленную в Таблице 3).

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к способу модификации фенотипа устойчивости растения, в частности, растения кукурузы, к патогену *Helminthosporium turcicum*, который состоит из этапа мутации придающего устойчивость гена локуса HTN1 из Pepitilla или содержащегося в нем аллеля гена. Предпочтительно придающий устойчивость ген локуса HTN1 из Pepitilla кодирует полипептид согласно SEQ ID NO: 2 или гомологичный полипептид согласно SEQ ID NO: 2, который продуцирует фенотип устойчивости с признаками, типичными для HTN1 в условиях поражения *H. turcicum*. Придающий устойчивость ген локуса HTN1 из Pepitilla или его аллель может быть трансгенным или

эндогенным в геноме растения. Модификация фенотипа устойчивости может означать изменение расовой специфичности патогена и/или изменение уровня устойчивости, измеряемых по классификационной шкале на основании фенотипических характеристик, таких как пораженность поверхности листа (см. Таблицу 3) или измеряемых как значение AUDPC (см. Пример 1.С). Предпочтительно, чтобы уровень устойчивости после модификации фенотипа устойчивости находился между уровнем устойчивости растения, которое экспрессирует немутировавший ген, придающий устойчивость, локуса HTN1 из Pepitilla, и уровнем устойчивости изогенного растения, которое не экспрессирует придающий устойчивость ген локуса HTN1 из Pepitilla. Однако он может также быть выше уровня устойчивости растения, которое экспрессирует немутировавший ген, придающий устойчивость, локуса HTN1 из Pepitilla. Наиболее предпочтительно, чтобы уровень устойчивости находился между уровнем устойчивости растения, которое экспрессирует полипептид согласно SEQ ID NO: 2, и уровнем устойчивости изогенного растения, которое не экспрессирует полипептид согласно SEQ ID NO: 2; однако он может также быть выше уровня устойчивости растения, которое экспрессирует полипептид согласно SEQ ID NO: 2. Выражение «мутировать», используемой в данной заявке, может означать изменение, внесенное человеком в генетическую последовательность (мутацию). В этом отношении примерами являются растения, растительные клетки или части растения, получающие высокую дозу химических, радиологических или иных мутирующих агентов, с последующим отбором мутантов. Альтернативно, мутации могут вноситься, например, с помощью TILLING нуклеаз, TALE нуклеаз, нуклеаз «цинковые пальцы» или системы CRISPR/Cas, либо вызываться слиянием, инсерцией, делецией или заменой в последовательности ДНК или аминокислотной последовательности. Специалист в данной области может получить достаточные технические указания из предшествующего уровня техники относительно того, как вносить мутации. Предпочтительно, чтобы мутация придающего устойчивость гена локуса HTN1 из Pepitilla приводила к замене по меньшей мере одной аминокислоты, по меньшей мере двух аминокислот, по меньшей мере трех аминокислот, либо по меньшей мере пяти или более аминокислот. В случае множественности аминокислотных замен они могут происходить в различных аллелях придающего устойчивость гена локуса HTN1 из Pepitilla, т.е. мутация может быть гетерозиготной или также гомозиготной.

В предпочтительном варианте осуществления указанного способа модификации фенотипа устойчивости растения мутация придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Repitilla* приводит к точечной мутации в нуклеотидной последовательности согласно SEQ ID NO: 1 в положении 1365 с заменой основания G на A или в положении 1490 с заменой основания G на A. Кроме того, указанный вариант осуществления также касается мутации, которая приводит к замене одной аминокислоты в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2 в положении 455 M (метионина) на I (изолейцин) или в положении 497 G (глицина) на E (глутаминовую кислоту). Еще в одном предпочтительном варианте осуществления способа мутация придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Repitilla* приводит к точечной мутации, результатом которой является замена одной аминокислоты в нуклеотидной последовательности согласно SEQ ID NO: 1 между положением 1365 и положением 1490, либо, как вариант, мутация приводит к замене одной аминокислоты в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2 между положением 455 и положением 497.

Еще один аспект изобретения относится к способу получения растения, в частности, растения кукурузы, имеющего модифицированный фенотип устойчивости, что касается патогена *Helminthosporium turcicum*, который включает этап мутации придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Repitilla* или его аллеля, по меньшей мере по одной клетке растения или по меньшей мере по одной клетке, из которой это растение регенерируется. Кроме того, указанный способ может затем включать этап регенерации по меньшей мере одного растения из по меньшей мере одной мутировавшей клетки и отбор регенерированных растений по фенотипу устойчивости к патогену *Helminthosporium turcicum*. Предпочтительно, чтобы придающий устойчивость ген локуса HTN1 из *Repitilla* кодировал полипептид согласно SEQ ID NO: 2, который продуцирует фенотип устойчивости с признаками, типичными для HTN1 в условиях поражения *H. turcicum*. Придающий устойчивость ген локуса HTN1 из *Repitilla* или его аллельный ген может присутствовать в растении в трансгенной или эндогенной форме. Модификация фенотипа устойчивости может означать замену расовой специфичности патогена и/или замену уровня устойчивости, измеряемых по классификационной шкале на основании фенотипических характеристик, таких как пораженность поверхности листа (см. Таблицу 3) или измеряемых как значение AUDPC (см. Пример 1.C). Предпочтительно, чтобы уровень устойчивости модифицированного фенотипа устойчивости находился между

уровнем устойчивости растения, которое экспрессирует немутировавший ген, придающий устойчивость, локуса HTN1 из *Repitilla*, и уровнем устойчивости изогенного растения, которое не экспрессирует ген локуса HTN1 из *Repitilla*. Однако он может также быть выше уровня устойчивости растения, которое экспрессирует немутировавший ген, придающий устойчивость, локуса HTN1 из *Repitilla*. Наиболее предпочтительно, чтобы уровень устойчивости находился между уровнем устойчивости растения, которое экспрессирует полипептид согласно SEQ ID NO: 2, и уровнем устойчивости изогенного растения, которое не экспрессирует полипептид согласно SEQ ID NO: 2; однако он может также быть выше уровня устойчивости растения, которое экспрессирует полипептид согласно SEQ ID NO: 2. Выражение «мутация», используемое в данной заявке, может означать изменение (мутацию), внесенное человеком в генетическую последовательность. В этом отношении примерами являются растения, растительные клетки или части растения, получившие высокую дозу химических, радиологических или иных мутагенов, с последующим отбором мутантов. Как вариант, мутации могут вноситься, например, с помощью TILLING нуклеаз, TALE нуклеаз, нуклеаз «цинковые пальцы» или системы CRISPR/Cas, либо вызываться слиянием, инсерцией, делецией или заменами в последовательности ДНК или аминокислотной последовательности. Специалист в данной области может получить достаточные технические указания из предшествующего уровня техники относительно того, как вносить мутации. Предпочтительно, чтобы мутация придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Repitilla* приводила к замене по меньшей мере одной аминокислоты, по меньшей мере двух аминокислот, по меньшей мере трех аминокислот, либо по меньшей мере пяти или более аминокислот. В случае множественности аминокислотных замен они могут происходить в различных аллелях придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Repitilla*, т.е. мутация может быть гетерозиготной или даже гомозиготной.

В предпочтительном варианте осуществления способа получения растения, обладающего модифицированным фенотипом устойчивости к патогену *Helminthosporium turcicum*, мутация придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Repitilla* приводит к точечной мутации в нуклеотидной последовательности согласно SEQ ID NO: 1 в положении 1365 с заменой основания G на A или в положении 1490 с заменой основания G на A. Кроме того, указанный вариант осуществления также касается мутации, которая приводит к замене одной аминокислоты в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2 в положении 455 М (метионина)

на I (изолейцин) или в положении 497 G (глицина) на E (глутаминовую кислоту). Еще в одном предпочтительном варианте осуществления указанного способа мутация придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Peritilla* приводит к точечной мутации, результатом которой является замена одной аминокислоты в нуклеотидной последовательности согласно SEQ ID NO: 1 между положением 1365 и положением 1490, либо, как вариант, мутация приводит к замене одной аминокислоты в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2 между положением 455 и положением 497.

Изобретение также касается растений или их частей, которые можно получать посредством способа получения растения с модифицированным фенотипом устойчивости к патогену *Helminthosporium turcicum*.

Более того, изобретение включает растение или его часть, которое включает мутацию придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Peritilla* или его аллеля. Предпочтительно результатом такой мутации является модифицированный фенотип устойчивости, как описано выше. Предпочтительно, чтобы придающий устойчивость ген локуса HTN1 из *Peritilla* кодировал полипептид согласно SEQ ID NO: 2 или гомолог полипептида согласно SEQ ID NO: 2, который продуцирует фенотип устойчивости с признаками, типичными для HTN1 в условиях поражения *H. turcicum*. Придающий устойчивость ген локуса HTN1 из *Peritilla* или его аллельный ген может присутствовать в растении в трансгенной или эндогенной форме. В предпочтительном варианте осуществления растения или его части мутация представляет собой точечную мутацию в нуклеотидной последовательности согласно SEQ ID NO: 1 в положении 1365 с заменой основания G на A или в положении 1490 с заменой основания G на A. Кроме того, указанный вариант осуществления также касается мутации, которая приводит к замене одной аминокислоты в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2 в положении 455 M (метионина) на I (изолейцин) или в положении 497 G (глицина) на E (глутаминовую кислоту). В еще одном предпочтительном варианте осуществления указанного растения или его части мутация придающего устойчивость гена локуса HTN1 из *Peritilla* представляет собой точечную мутацию, результатом которой является замена одной аминокислоты в нуклеотидной последовательности согласно SEQ ID NO: 1 между положением 1365 и положением 1490, либо, как вариант, мутация приводит к замене одной

аминокислоты в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2 между положением 455 и положением 497.

Следующие термины, используемые в данной заявке, имеют значения, приведенные ниже.

Термин «аллель» означает одну или две или более нуклеотидных последовательностей в специфическом локусе генома. Первый аллель находится в одной хромосоме, второй аллель находится в другой хромосоме в том же положении. Если оба аллеля являются разными, они гетерозиготные, и если они одинаковые, они гомозиготные. Различные аллели гена (генные аллели) различаются, по меньшей мере, одним нуклеотидом (SNP). В зависимости от контекста описание аллель также означает единичный нуклеотидный полиморфизм SNP, который позволяет проводить различие между донорным HTN1 (Pepitilla) и рекуррентным родителем.

Выражение «фрагмент хромосомы» означает специфический сегмент хромосомной ДНК из специфической хромосомы, содержащей, по меньшей мере, один ген. Интегрируемый фрагмент хромосомы происходит из донорного источника. В контексте изобретения последовательное чередование генов внутри интегрируемого фрагмента хромосомы соответствует такой последовательности, которая существует в исходном фрагменте хромосомы из донорного источника. Таким образом, интегрируемый фрагмент хромосомы может оставаться неизменным по всей длине по сравнению с соответствующим фрагментом хромосомы в донорном источнике. Фрагмент хромосомы или его часть может представлять собой специфический «гаплотип», в котором указанный фрагмент хромосомы может содержать специфические SNP, посредством которых гаплотип также может однозначно различаться и идентифицироваться.

Термины «дистальный» и «проксимальный» описывают расположение хромосомного интервала или генетического сегмента относительно специфической референсной точки (например, специфического полинуклеотида, другого хромосомного интервала или гена) в целой хромосоме; «дистальный» означает, что интервал или сегмент локализован со стороны референсной точки на удалении от центромеры хромосомы, а «проксимальный» означает, что интервал или сегмент локализован со стороны референсной точки вблизи от центромеры хромосомы.

«Тесно сцепленный» или «тесно связанный» означает два локуса, два интервала, два генетических сегмента или два маркера (маркерные локусы), которые находятся на расстоянии менее 15 сМ, менее 12 сМ, менее 10 сМ, менее 8 сМ, менее 7 сМ, менее 6 сМ, менее 5 сМ, менее 4 сМ, менее 3 сМ, менее 2 сМ, менее 1 сМ, менее 0,5 сМ, менее 0,2 сМ, менее 0,1 сМ друг от друга на используемой IBM2 генетической карте 4 соседей, находящейся в открытом доступе на веб сайте Maize GDB.

Термин «урожайность», используемый в контексте настоящего изобретения, относится к продуктивности на единицу площади специфического растительного продукта, обладающего коммерческой ценностью. Например, урожайность кукурузы измеряется в метрических тоннах семян или зерна на гектар (га) и за посевной сезон или в метрических тоннах сухой биомассы с гектара (га) и в посевной сезон. Если специально не указано иное или контекст не требует иного, урожайность может означать зеленую массу или абсолютно сухую массу, зеленую массу или относительно сухую массу, урожайность силоса (также известную как урожайность кукурузы на силос или общая урожайность сухой массы) или урожайность зерна. На урожайность влияют генетические факторы и факторы окружающей среды. В принципе она представляет собой совокупность многих агрономических признаков, которые складываются из признаков, основывающихся на генетических элементах растения, и обеспечивают конечную урожайность в течение посевного сезона. Примерами таких агрономических признаков являются прорастание семян, жизнестойкость вегетирующего растения, устойчивость к стрессам, резистентность или устойчивость к возбудителям болезней, резистентность к действию гербицидов, тенденция к ветвлению, период цветения, число зерен, сомкнутость, стабильность и сохранность зерен, выход зерна при обмолоте (равномерное созревание семян) и т.п.

Выражение «генетический сегмент с» более точно определенным интервалом, следует понимать, как означающий генетический сегмент, который включает или содержит более точно определенный интервал, т.е. не ограниченный более точно определенным интервалом. Например, «генетический сегмент с пятым интервалом между маркером в восьмом маркерном участке M8, который фланкирован маркерами MA0022 и MA0013, а также маркером в шестом маркерном участке M6, который фланкирован маркерами PZE-108107671 и SYN4196», означает, что генетический сегмент содержит пятый интервал и что этот генетический

сегмент локализован между маркером в восьмом маркерном участке M8, который фланкирован маркерами MA0022 и MA0013, и маркером в шестом маркерном участке M6, который фланкирован маркерами PZE-108107671 и SYN4196.

Термин “гибридизировать” или “гибридизация” следует понимать как означающий процесс агломерации одноцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты с цепью нуклеиновой кислоты, которая является строго комплементарной, т.е. образует с ней пары оснований. Стандартные методы гибридизации описаны, например, Sambrook и соавт. (2001). Это должно означать, что предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80% или 85%, наиболее предпочтительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% оснований молекулы нуклеиновой кислоты спариваются с основаниями цепи нуклеиновой кислоты, которая является строго комплементарной. Возможность такой агломерации зависит от жесткости условий гибридизации. Термин “жесткость” относится к условиям гибридизации. Условия высокой жесткости гибридизации задаются в тех случаях, когда спаривание оснований является трудным, а условия низкой жесткости гибридизации задаются в случаях, когда спаривание оснований является легким. Например, жесткость условий гибридизации зависит от концентрации солей или от ионной силы и температуры. В целом, жесткость можно повышать путем увеличения температуры гибридизации и/или снижения содержания солей. Термин “условия жесткой гибридизации” следует понимать, как означающий такие условия, в которых гибридизация происходит только между преимущественно гомологичными молекулами нуклеиновых кислот. В этом отношении термин “условия гибридизации” относится не только к действительным условиям, преобладающим во время непосредственной агломерации нуклеиновых кислот, но также к условиям, преобладающим во время последующих этапов отмывки. Например, условиями жесткой гибридизации являются условия, при которых преимущественно гибридизуются только те молекулы нуклеиновых кислот, которые имеют по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%, идентичности гибридизуемых последовательностей. Примером условий жесткой гибридизации является гибридизация в 4 x SSC при 65°C и последующая многократная отмывка в 0,1 x SSC при 65°C в течение около 1 часа. Используемый здесь термин “условия жесткой гибридизации” может также означать гибридизацию при

68°C в 0,25 М фосфат натрия, рН 7,2, 7% SDS, 1 мМ EDTA и 1% BSA в течение 16 часов и последующую двукратную отмывку в 2 x SSC и 0,1% SDS при 68°C. Предпочтительно, чтобы гибридизация осуществлялась в жестких условиях.

Термин «интервал» или «хромосомный интервал» означает длинный линейный сегмент в геномной ДНК, который находится в отдельной хромосоме растения или во фрагменте хромосомы и который обычно определяется по двум маркерам, представляющим собой концевые точки интервала с дистальной и проксимальной стороны. В этом отношении маркеры, которые определяют края интервала, могут сами являться частью интервала. Более того, возможно взаимное наложение двух разных интервалов. В описании интервал характеризуется указанием «между маркером А и маркером В». Концевой маркер интервала может также локализоваться в определенном маркерном участке с одной стороны интервала. Таким образом, маркерный участок определяется двумя фланкирующими маркерами и представляет собой хромосомный сегмент, в котором возможно расположение, кроме фланкирующих маркеров, многих других маркеров. Фланкирующие маркеры определяют краевые точки маркерного участка и одновременно сами являются частью маркерного участка. Если оба концевых маркера интервала являются маркерами в разных маркерных участках с обеих сторон интервала, описание характеризует интервал указанием «между маркером в маркерном участке X, который фланкирован маркерами С и D, и маркером в маркерном участке Y, который фланкирован маркерами Е и F». Маркерный участок может быть длиной до более 500000 пар оснований (п.о.) и предпочтительно иметь размер от 100000 до 400000 п.о. или более предпочтительно от 140000 до 315000 п.о.

Термин «интрогрессия», используемый в связи с настоящим изобретением, означает перемещение, по меньшей мере, одного желаемого генного аллеля в генетическом локусе генетического фона в другой. Например, путем интрогрессии желаемый генный аллель в определенном локусе может перемещаться в потомка посредством полового скрещивания двух родителей того же вида. Как вариант, перемещение генного аллеля может также происходить путем рекомбинации между двумя донорными геномами в слившемся протопласте, в котором по меньшей мере один протопласт несет желаемый ген в своем геноме. В каждом случае потомки, составляющие желаемый генный аллель, затем могут подвергаться возвратному скрещиванию с линией, содержащей предпочитаемый

генетический фон, и отбираться по желаемому генному аллелю. Результатом является закрепление желаемого генного аллеля на выбираемом генетическом фоне.

Термин «выделенная молекула нуклеиновой кислоты» или «выделение полинуклеотида» следует понимать как означающий молекулу нуклеиновой кислоты или полинуклеотид, которые были удалены из их естественной или исходной среды. Термин также включает молекулу нуклеиновой кислоты, получаемую синтетическим путем. «Выделенный полипептид» следует понимать, как означающий полипептид, который был удален из его естественной или исходной среды. Термин также включает полипептид, получаемый синтетическим путем.

Термин «патогенное заражение» следует понимать как означающий самый ранний момент взаимодействия патогена с тканью растения-хозяина. Примером поражения грибами, такими как аскомицеты или оомицеты, является рост гифов или образование специфических структур поражения, таких как проникающие гифы и аппрессории. Более подробно поражение *Helminthosporium turcicum* можно изучать путем использования различных методик окрашивания (например, трипановым синим) (Chung и соавт., *BMC Plant Biology* 10 (2010), 103; Walsh и соавт. (2008), Poster presentation P12, 50-я Конференция по генетике кукурузы, Вашингтон).

«Донорный сорт Pepitilla», «исходный сорт Pepitilla» или «Pepitilla» означает, кроме собственно самого местного сорта кукурузы Pepitilla, другие генотипы кукурузы, в геном которых, в частности, на хромосоме 8, бин 5 и 6, осуществлена интрогрессия локус *HTN1* устойчивости, предпочтительно из Pepitilla. Примерами таких генотипов являются W22Htn (например, Bar-Zur и соавт., 1998), H6314Htn (например, Bar-Zur и соавт., 1998), B73HtN (например, Shimoni и соавт., *Journal of Phytopathology* 131:4 (1991), 315-321), B68HtN и A632HtN (например, Carson, *Plant Disease* 79 (1995), 717-720) и A619HtN (например, Stanković и соавт., *Genetika* 39:2 (2007), 227-240). Кроме того, Pepitilla включает любой источник устойчивости, придающий фенотипу устойчивости признаки, типичные для HTN1 после интрогрессии в восприимчивую линию кукурузы/растение кукурузы. Примерами таких HTN1-специфических признаков являются задержка начала споруляции, уменьшение числа поражений, уменьшение размера поражений, уменьшение объема споруляции и/или отсутствие или наличие лишь изолированных хлоротичных и некротических поражений.

«Локус» представляет собой положение на хромосоме, где находятся один или несколько генов, которые определяют агрономический признак или оказывают на него влияние. В частности, «локус», как он используется в данной заявке, означает локус HTN1 устойчивости, который придает устойчивость к *Helminthosporium turcicum* или по меньшей мере к одной расе *Helminthosporium turcicum*.

Выражение «растение кукурузы» следует понимать как означающее растение вида *Zea mays*, а также подвиды *Zea mays* ssp. *mays*, *Zea mays* ssp. *mexicana* или *Zea mays* ssp. *parviglumis*.

«Маркер» представляет собой нуклеотидную последовательность, которая используется в качестве референсной или ориентационной точки. Маркер для распознавания явления рекомбинации должен быть подходящим для контроля различий или полиморфизмов в популяции растения. Для маркеров такие различия находятся на уровне ДНК и, например, представляют собой различия в нуклеотидных последовательностях, такие как SSR (простые повторяющиеся последовательности), RFLP (полиморфизмы длин рестрикционных фрагментов), FLP (полиморфизмы длин фрагментов) или SNP (простые нуклеотидные полиморфизмы). Маркеры можно получать из геномных и экспрессирующихся нуклеиновых кислот, таких как сплайсированная РНК, кДНК или EST-последовательности, либо они могут основываться на нуклеиновых кислотах, которые используются в качестве зондов или пар праймеров и, как таковые, являются подходящими для амплификации фрагмента последовательности с применением методов на основе ПЦР. Маркеры, которые касаются генетических полиморфизмов между частями популяции, можно детектировать с помощью хорошо разработанных методов, известных из предыдущего уровня техники (An Introduction to Genetic Analysis, 7th Edition, Griffiths, Miller, Suzuki и соавт., 2000). Например, они включают секвенирование ДНК, методы на основе ПЦР, амплификацию специфических последовательностей, RFLP-анализ, анализ полинуклеотидных полиморфизмов с использованием аллель-специфической гибридизации (ASH), детектирование SSR, SNP или AFLP. Известны методы для детектирования EST (меток экспрессированных последовательностей) и RAPD (случайно амплифицированной полиморфной ДНК). В зависимости от контекста описания термин «маркер» может также означать специфическое положение хромосомы в геноме вида, где может обнаруживаться специфический маркер (например, SNP). Положение маркера указанного

типа может использоваться для контроля присутствия сцепленного локуса, который способствует проявлению специфического фенотипического признака (например, HTN1 или сцепленного наследования). Как пример, маркерный локус может также использоваться для установления сегрегации аллелей в локусе ((QTL или отдельного гена), которые генетически или физически тесно сцеплены с маркерным положением.

«Оперативно связанный» означает связанный в общей молекуле нуклеиновой кислоты таким образом, что соединенные элементы расположены и ориентированы относительно друг друга так, что обеспечивается транскрипция молекулы нуклеиновой кислоты. ДНК, оперативно связанная с промотором, находится под транскрипционным контролем этого промотора.

Примерами «органов» растений являются листья, побеги, стебли, корни, вегетативные почки, меристемы, зародыши, пыльники, семязачатки или плоды. «Части» растения означает комбинацию нескольких органов, например, цветка и семян, или часть органа, например, поперечный разрез стебля. Примерами «тканей» растения являются каллусная ткань, запасаящая ткань, меристемная ткань, ткань листьев, почки, корня, опухолевая ткань растения или репродуктивная ткань. Термин «клетки» следует понимать как означающий выделенные клетки растения, имеющие клеточную стенку, или их агрегаты, либо протопласты.

В контексте изобретения, если не указано иное, «растение» может представлять собой любой вид двудольного, однодольного или голосемянного растения. Предпочтительно, чтобы растения были однодольными растениями и представляли интерес для сельского хозяйства и растениеводства или для получения биоэнергии (биоэтанола, биогаза и т.п.). Примерами таких растений являются *Gossypium* sp., *Zea mays*, *Brachypodium distachyon*, *Triticum* sp., *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Sorghum* sp., *Musa* sp., *Saccharum officinarum*, *Secale cereal*, *Avena* sp., газонные и кормовые травы. Предпочтительным растением по данному изобретению является растение рода *Zea*, в частности, *Zea mays* или *Sorghum*.

В связи с настоящим изобретением термин «регуляторная последовательность» означает нуклеотидную последовательность, которая обуславливает специфичность и/или уровень экспрессии, например, в случае, когда регуляторная последовательность придает специфичность определенной ткани. Регуляторная последовательность указанного типа

может находиться как вверх по течению от точки инициации транскрипции минимального промотора, так и вниз по течению от нее, например, в транскрибируемой, но не транслируемой лидерной последовательности или внутри интрона.

Выражение «устойчивость» или «устойчивый» относительно патогена следует понимать как означающее способность растения или растительной клетки противостоять поражающему воздействию патогена, заключающемуся в задержке развития заболевания до его полного подавления. В связи с настоящим изобретением растение/растительная клетка являются устойчивыми или растение /растительная клетка проявляют устойчивость к патогену *Helminthosporium turcicum* (*H. turcicum* или *HT*), т.е. к северному гельминтоспориозу (NCLB). Устойчивость обеспечивается одним или несколькими белками, которые кодируются геном или генами (генами, придающими устойчивость) исходного сорта Pepitilla. Устойчивость может быть полной или частичной, специфической или неспецифической относительно рас патогена. В случае расоспецифической устойчивости к патогену вирулентные расы *Helminthosporium turcicum* могут, например, включать N, 1N, 2N, 23N или 123N, а авирулентные расы могут, например, включать 0, 1, 2, 3, 12, 23 или 123. Придаваемая устойчивость может быть вновь приобретаемой устойчивостью или повышением уже имеющейся частичной устойчивости.

«Трансгенное растение» представляет собой растение, в геном которого интегрирован по меньшей мере один полинуклеотид, предпочтительно гетерологичный полинуклеотид. Предпочтительно, чтобы интеграция полинуклеотида была стабильной, что означает, что интегрированный полинуклеотид должен оставаться стабильным в растении, стабильно экспрессироваться и стабильно передаваться потомкам. Стабильная вставка полинуклеотида в геном растения также включает интеграцию в геном растения предыдущего поколения родителей, что дополнительно способствует стабильному наследованию полинуклеотида. Термин «гетерологичный» означает, что встраиваемый полинуклеотид происходит, например, из клетки или организма иного генетического фона того же вида или другого вида, либо является гомологичным с прокариотической или эукариотической клеткой-хозяином, но в таком случае локализуется в разной генетической среде и таким образом отличается от возможного соответствующего естественно встречающегося

полинуклеотида. Гетерологичный полинуклеотид может присутствовать в дополнение к соответствующему эндогенному гену.

Далее будут описаны варианты осуществления настоящего изобретения в качестве примеров со ссылкой на прилагаемые рисунки и последовательности.

Рис. 1 – Рассчитанный QTL район размером 23,11 сМ на хромосоме 8 с использованием 8 маркеров у 528 F2 растений RP1 x RP1HTN1 скрещивания. Черные полосы (HtN) показывают *доверительный* интервал. Расстояния между маркерами вычислены в сантиморганидах (сМ).

Рис. 2 – Результаты испытаний урожайности силосной массы в 5 локациях в Германии в двух повторностях с использованием рекуррентного родителя RP3 и А-версии донорного фрагмента В37HTN1 (RP3HTNA) и К-версии донорного фрагмента В37HTN1 (RP3HTNK). Полосы показывают значительные различия при использовании t-теста, $p=0,05$.

Рис. 3 – Характеристика маркерных участков М1 – М6, определяющих хромосомные интервалы (Int. 1 – Int. 5), которые проявляют придающий устойчивость полинуклеотид у интрогрессивных линий и несут наследование, сцепленное с фрагментом хромосомы, происходящей от донора. Хромосомные сегменты донора (Pepitilla) показаны как пунктирные участки, рекуррентного родителя (без сцепленного наследования) как участки с диагональными полосками. Интервал 1 (Int. 1) покрывает локус HTN1, интервал 2 (Int. 2) покрывает районы последовательностей, отвечающих в доноре за сцепленное наследование периода цветения, интервалы 4 и 5 (Int. 4 и Int. 5) покрывают районы последовательностей, отвечающих за сцепленное наследование урожайности силосной массы у донора.

Рис. 4 – ВАС контиг на основе его RP4HTN1 ВАС библиотеки с соответствующими скаффолдами и аннотациями генов. Гены-кандидаты показаны квадратными клетками. Черными стрелками обозначены другие аннотированные гены, не являющиеся генами-кандидатами HTN устойчивости.

1. Эксперименты по фенотипированию

А) Проведение полевых испытаний для определения HT-устойчивости в условиях естественной и искусственной инокуляции/заражения и периода цветения

В локациях высаживали отдельными рядами по меньшей мере по 20 индивидуумов растений каждого испытуемого генотипа кукурузы. Проводили естественную и искусственную инокуляцию. Естественную инокуляцию/заражение осуществляли встречающимися в природе спорами *H. turcicum*. Искусственную инокуляцию/заражение осуществляли с использованием зараженного и опавшего листового материала, принадлежащего испытуемым растениям. Последний тип инокуляции позволял симулировать сравнительное заражение *H. turcicum* в различные годы проведения испытаний и в различных локациях независимо от преобладающих там условий естественного заражения. Одного чувствительного родителя и одного родителя с интрогрессией HTN1 из В37HTN1 выращивали в качестве контрольных генотипов в зависимости от популяции, испытываемой в скрещивании. Показатели количественных признаков HT-устойчивости отмечали, по меньшей мере, трижды за вегетационный период. Использовали только схему количественной шкалы, представленную в таблице 3.

Донорный В37HTN1 в качестве источника HT-устойчивости скрещивали с различным генетическим фоном элитных линий, обладающих различным уровнем чувствительности к *H. turcicum*, и получали почти изогенные линии, которые отличались от исходных чувствительных линий только наличием интрогрессии В37HTN1. В экспериментах по фенотипированию, после искусственной инокуляции, как описано выше, отбирали линии, которые проявляли улучшение HT-устойчивости по меньшей мере по 2 – 3 количественным признакам, предпочтительно 3 – 4 количественным признакам, в результате придающей устойчивость интрогрессии В37HTN1. Далее настоящее изобретение будет описано более подробно на примере двух отобранных рекуррентных родителей RP1 и RP3. Результаты экспериментов по фенотипированию суммированы в Таблице 5. Рекуррентный родитель RP1 без интрогрессии проявлял в среднем 7 – 9 количественных признаков, которые были улучшены на 3 – 4 количественных признака за счет интрогрессии В37HTN1. Рекуррентный родитель RP3 без интрогрессии проявлял 4 – 6 количественных признаков, которые были улучшены на 2 – 3 количественных признака за счет интрогрессии.

Таблица 5. Данные фенотипирования HT-устойчивости генотипов RP1, RP3 и RP4 с придающей устойчивость интрогрессией или без придающей устойчивость интрогрессии В37HTN1 (показатели количественных

признаков определялись в соответствии со схемой, представленной в Таблице 3)

Генотип	Средние количественные показатели (n=20) без интрогрессии В37НТN1	Улучшение НТ-устойчивости с интрогрессией В37НТN1
RP1	от 7 до 9	от 3 до 4
RP3	от 4 до 6	от 2 до 3
RP4	6	от 2 до 3

В дополнение к НТ-устойчивости определяли период цветения мужских и женских цветков в «днях после высева». Период цветения женских цветков определяли по появлению шелковистых нитей; период цветения мужских цветков определяли по появлению метелок. Более подробные результаты даны в Примере 3.В).

В) Проведение полевых испытаний для определения урожайности зерна и силосной массы

Кроме данных, касающихся НТ-устойчивости и периода цветения, определяли урожайность RP3, содержащей различные длины фрагменты придающей устойчивость интрогрессии В37НТN1 или Pepitilla и сравнительной элитной линии. Линии RP3, RP3НТNA и RP3НТNK опыляли тестером (кремнистая кукуруза, единичное скрещивание между пулами) дополнительного пула генов (кремнистая кукуруза) для получения запаса семян испытываемых гибридов. Эти испытываемые гибриды выращивали в двухкратной повторности в полевых условиях в пяти репрезентативных локациях возделывания кукурузы в Германии. Испытываемые гибриды были лучше приспособлены для условий выращивания в указанных регионах по срокам созревания. Полевые испытания проводили в двукратной повторности в 4-рядных делянках, длина делянки - 6 м, расстояние между рядами - 0,75 м. Густота стояния составляла 9 растений на квадратный метр в первом варианте опыта и 11 растений на квадратный метр во втором варианте опыта. В нужный срок урожай силосной массы кукурузы собирали с двух центральных рядков каждой делянки с целью минимизации «эффекта крайнего ряда». Определяли вес собранного материала из каждой делянки и содержание влаги в собранном материале для расчета урожайности кукурузы на силос (также известна как урожайность силоса или урожайность общей сухой массы) и содержания сухого вещества (общего содержания сухого вещества).

С) Проведение испытаний в условиях теплицы для определения НТ-устойчивости

По 20 индивидуальных растений каждого генотипа выращивали в горшках. Контрольными генотипами служили в зависимости от скрещивания генотипы чувствительного родителя и почти изогенного родителя (NIL) с интрогрессией придающей устойчивость В37НТN1. Через 14 дней после высева проводили искусственное заражение (см. выше). Спустя еще 2 – 3 недели появлялись первые симптомы заболевания. Со времени появления первых симптомов каждый последующий день определяли количественные показатели признака НТ-устойчивости, а также количество растений с симптомами поражения. На основе этого определяли AUDPC (зона кривой развития болезни). Для классификации исследуемых растений применяли показатели частоты поражения (как % времени \times период); в данном случае считали, что растения с AUDPC 0 – 100 были устойчивыми, с AUDPC 101 – 450 были гетерозиготными и с AUDPC > 450 были чувствительными.

2. Разработка маркеров для целевой области НТN1

В дополнение к опытам по определению количественных показателей более подробно исследовали целевую область вокруг локуса устойчивости НТN1 на хромосоме 8 (бин 8,06) многих генотипов и осуществили ее тонкое картирование с применением новых и/или оптимизированных систем молекулярных маркеров. Используемые здесь маркеры были разработаны на основе однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) или уже широко доступных маркеров простых повторяющихся последовательностей (SSR).

ДНК генотипов для использования в качестве маркеров выделяли, используя набор NucleoSpin 96 Plant II в соответствии с руководством производителя (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Германия) или набор Klear Gene DNA Extraction 384 (LGC Genomics GmbH, Германия).

Последовательности праймеров SSR-маркеров уже имеются в открытой базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) на <http://www.ncbi.nih.gov/unists>; последовательности праймеров маркеров bnlg1782, umc1960, bnlg240, umc1121, bnlg1067 и umc1287, которые использовались для исследования целевой области, приведены в Таблице 6 вместе с произведенными модификациями.

Таблица 6. Последовательности праймеров для SSR-маркера (NED: 2'-хлоро-5'-флуоро-7',8'-fusedфенил-1,4-дихлоро-6-карбоксивфлуоресцеин; FAM: 6-карбоксивфлуоресцеин; M13: коровая последовательность фага M13)

Маркер	SEQ ID NO: Прямой праймер (5'-3')	Модификация	SEQ ID NO: Обратный праймер (5'-3')	Модификация	Дополнительный праймер + модификация
bnlg1782	113	NED	114	отсут.	
umc1960	115	NED	116	отсут.	
bnlg240	117	FAM	118	отсут.	
umc1121	119	FAM	120	отсут.	
bnlg1067	121	FAM	122	отсут.	
umc1287	123	отсут.	124	отсут.	M13+FAM

Объем реакционной смеси bnlg1782, umc1960, bnlg240, umc1121 и bnlg1067 для проведения ПЦР составлял 10 мкл и состоял из одного 4-хратно концентрированного буфера В (Solis BioDyne, Эстония), 0,5 пмоль прямого праймера, 0,5 пмоль обратного праймера, 10-30 нг ДНК, 0,25 единиц ТАQ-полимеразы марки HotFirepol (Solis BioDyne, эстония). Объем реакционной смеси umc1287 составлял 10 мкл и состоял из одного 4-хкратно концентрированного буфера В (Solis BioDyne, Эстония), 0,5 пмоль прямого праймера, 2,5 пмоль обратного праймера, 0,3 пмоль дополнительного праймера M13, 10-30 нг ДНК, 0,25 единиц ТАQ-полимеразы марки HotFirepol (Solis BioDyne, Эстония).

ПЦР проводили в следующем режиме: начальная денатурация при 94°C в течение 900 секунд, 25-40 циклов амплификации при 94°C в течение 15 секунд, при 50-55°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 120 секунд, и финальная стадия при 72°C в течение 300 секунд. Затем реакционную смесь ПЦР инкубировали при 65°C в течение 2 часов. Продукты ПЦР разделяли в ABI3730xI (Life Technologies™, США) в соответствии с руководством производителя, касающемся разделения фрагментов размером 50-400 п.о.

SNP-маркеры разрабатывали и использовали из (а) открытого источника, (б) сравнительного анализа секвенирования ампликонов или (с) сравнения последовательностей ВАС-клонов RP4HTN1 (см. молекулярный анализ сегментов) и В73 референсного генома AGPv02 (www.maizesequence.org).

(а) SNP трансформировали в KASP-маркеры (LGC Genomics GmbH, Германия) из открытого SNP источника от Maize Community 50K-Illumina-Chip (Ganal и соавт., 2011). Разрабатывали новые праймеры для амплификации доминантных аллелей методом, основанным на использовании KASP-маркера (см. Таблицу 4). Все операции проводились с использованием программного обеспечения Kraken™ (LGC Genomics GmbH, Германия). Амплификацию с KASP-маркером проводили в 1536-луночном планшете в присутствии 5-20 нг ДНК, 0,02 мкл испытательной олиго смеси (12 мкМ аллель-специфичного праймера 1 (прямого); 12 мкМ аллель-специфичного праймера 2 (прямого); 30 мкМ обратного праймера) и 1,5 мкл реагента из набора 1xKASPar. Стандартная постановка ПЦР состояла из 15 минут при 94°C, 10 циклов в течение 20 секунд при 94°C, ступенчатой ПЦР в течение 1 минуты при 61-55°C, 26 циклов в течение 20 секунд при 94°C и в течение 1 минуты при 55°C. Оценку аллелей по генотипу проводили с использованием программного обеспечения Kraken™ (LGC Genomics GmbH, Германия).

(б) Сравнительное секвенирование ампликонов проводили с помощью метода Сэнгера. Каждый генотип в сравниваемых последовательностях содержал донорный В37HTN1, а также В37, RP1, RP1HTN1, RP3, RP3HTN1 (версии А, В, К) RP4, RP4HTN1. ДНК выделяли из дробленых зерен СТАВ-методом (Maniatis и соавт., 1982). Последовательности праймеров для секвенирования ампликонов перечислены в Таблице 4. Стандартный ПЦР протокол амплификации соответствующих участков состоял из денатурации при 94°C в течение 5 минут, 35 циклов при 94°C в течение 1 минуты каждый, при 60°C в течение 1 минуты и при 72°C в течение 2 минут и завершающей стадии при 72°C в течение 10 минут. Продукты ПЦР секвенировали по Сэнгеру (Sanger & Coulson, 1975). Оценку последовательностей проводили с использованием программного обеспечения DNASTar Lasergene (DNASTAR Inc., США). Детектируемые полиморфизмы трансформировали в KASP-маркеры, как показано в (а).

(с) Контиги последовательностей ВАС-клонов проектировали по В73 референсному геному AGPv02 с использованием алгоритмов Blast

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) для детекции однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Полиморфизмы детектировали при помощи программного обеспечения Lasergene (DNASTAR Inc., США). Они показаны в Таблице 4 вместе с фланкирующими последовательностями. Разрабатывали праймеры для фланкирующих последовательностей SNP и идентифицированные SNP трансформировали в KASP-маркеры, как показано в (а).

3. Локализация локуса устойчивости HTN1 на хромосоме 8 с использованием SSR-маркера

А) Локализация локуса устойчивости HTN1

Локус устойчивости HTN1 из донорных В37HTN1 скрещивали с элитными линиями, как показано в Примере 1.А), и локализовали на хромосоме 8 (бин 8,06) с помощью SNP- и SSR-маркеров по Примеру 2 (см. Рис.1). Почти изогенные линии (NIL) от скрещиваний RP1 x RP1HTN1 и RP3 x RP3HTN1 в течение нескольких лет фенотипировали в двух локациях в условиях естественного заражения, используя схему количественных признаков, приведенную в Таблице 3. NIL демонстрировали улучшение признака устойчивости в среднем по 4 количественным показателям по сравнению с исходной линией. Период развития локальных поражений на листьях сдвигался приблизительно на 2 недели по сравнению с чувствительным генотипом. QTL картирование проводили по 528 индивидуумам F2 (RP1 x RP1HTN1 скрещивание) с помощью 8 маркеров (Таблицы 4 и 6 составлены на основе маркеров для QTL картирования Рис. 1). Область QTL, которая покрывала локус устойчивости HTN1, была локализована на хромосоме 8 между маркерами MA0002 и umc1287, в участке размером 23,1 сМ.

В) Скрещивание фрагмента донорного В37HTN1 с элитной линией кукурузы и идентификация и элиминация сцепленного наследования задержки периода цветения

Донорный В37HTN1 скрещивали с KWS.элитой – элитной линией от KWS SAAT AG (Германия) и затем проводили возвратное скрещивание с KWS. элитой в течение пяти поколений. В каждом поколении возвратного скрещивания использовали молекулярные маркеры для отбора растений, гетерозиготных по целевой HTN области. Затем растение, отобранное из пятого поколения возвратного скрещивания, самоопыляли и с помощью

молекулярных маркеров идентифицировали растения, гомозиготные по целевой HTN области.

Эти линии исследовали в полевых испытаниях в нескольких локациях. Определяли фенотипические данные HT-устойчивости и периоды цветения для генотипов В37HTN1, KWS.элиты и KWS.элиты.В37HTN1, как показано в Примере 1. Генотипы с интрогрессией HTN1 проявляли ожидаемую HT-устойчивость по количественным признакам 1 – 3, в то время как исходная линия KWS.элиты – по 5 – 7 признакам. Более того, неожиданно, по сравнению с KWS.элитой, у генотипа KWS.элита.В37HTN1 было отмечено смещение на 2 дня периода цветения как женских, так и мужских цветков. Такое смещение периодов цветения является негативным агрономическим признаком, обусловленным сцепленным наследованием, которое еще не отмечалось у этой формы вследствие интрогрессии HT-устойчивости из В37HTN1. Маркерные анализы позволили обнаружить локализацию сцепленного наследования, ответственного за задержку периода цветения, в районе между двумя маркерными участками интрогрессии В37HTN1 – между M1 и M2. Для этого генотипы В37HTN1, KWS.элита и KWS.элита.В37HTN1 анализировали с помощью KASP-маркеров SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 и PZE-108077560 (см. Рис. 3 и Таблицу 4). SYN14136 и PZE-108076510 использовались для специфической детекции маркерного участка M1, SYN24931 и PZE-108077560 – для специфической детекции маркерного участка M2. В результате было установлено, что маркерный участок M1 располагается на 5'-конце локуса сцепленного наследования, а маркерный участок M2 прилегает к нему с 3'-конца. Маркерный анализ показал, что у В37HTN1 и KWS.элита.В37HTN1, характеризующихся задержкой сроков цветения на два дня, проявлялись схожие аллели в участках M1 и M2, а также интервал между этими участками, в то время как KWS.элита цвела в обычные сроки и содержала другие аллели в участках M1 и M2 и интервал между ними.

Донорный В37HTN1 скрещивали с RP3 и затем проводили возвратное скрещивание с RP3 в течение трех поколений. В каждом поколении обратного скрещивания использовали молекулярные маркеры. Сначала отбирали растения, гетерозиготные по целевой HTN1 области, затем эти растения исследовали с помощью маркеров, равномерно распределенных по всему геному, с целью отбора по донорному геному. Растение, отобранное из третьего поколения возвратного скрещивания, самоопыляли и с помощью

молекулярных маркеров идентифицировали растения, гомозиготные по целевой HTN1 области.

Далее донорный В37HTN1 скрещивали с рекуррентным родителем RP3 и RP4 и получали линии RP3HTNA и RP4HTNA в течение нескольких этапов возвратного скрещивания. Фенотипирование по HT-устойчивости показало улучшение от 5-7 количественных признаков у исходной линии RP3 до 1-3 признаков у RP3HTNA, а также улучшение от 6 количественных признаков у исходной линии RP4 до 2-3 признаков у RP4HTNA. Фенотипирование по периодам цветения показало, что периоды цветения у RP3 и RP3HTNA были сопоставимы с периодами цветения у RP4 и RP4HTNA. При помощи KASP-маркеров SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 и PZE-108077560 было показано, что RP3 и RP3HTNA несли схожие аллели в участках M1 и M2. Они не соответствовали донорному В37HTN1. В результате, таким образом, было установлено, что хромосомный сегмент интрогрессии В37HTN1, ответственный за задержку сроков цветения, располагался в хромосомном интервале между маркерными участками M1 и M2. Таким образом, у линии RP3HTNA было успешно удалено сцепленное наследование. Используемые KASP-маркеры SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 и PZE-108077560 доказали свою эффективность в качестве инструментов «способствовавших селекции».

Фенотипирование RP3 и RP3HTNA также включало регистрацию урожайности зерна и силоса. Если урожайность зерна по генотипам сильно не отличалась, то урожайность силоса RP4HTNA показала явное, статистически значимое снижение по меньшей мере на 14 децитонн с гектара (дт/га) по сравнению с RP3, или более чем на 5 %.

Использование синтезированных KASP-маркеров SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 и PZE-108077560 позволило отобрать линию RP1HTN1 по результатам скрещивания между В37HTN1 и рекуррентным родителем RP1, которая больше не проявляла сцепленного наследования задержки сроков цветения, а только снижение урожайности силосной массы, как у RP3HTNA. Для более точной молекулярной характеристики продолжили развивать RP1HTN1. Была создана популяция F2, включающая 724 индивидуума по результатам скрещивания RP1 x RP1HTN1. Затем поколение F3 самоопыляли и отбираемые растения F4 генотипировали и фенотипировали. Генотипирование проводили с помощью маркеров, приведенных в Таблице 6, в детектируемом QTL участке размером 23,1 сМ. Фенотипирование проводили в различных локациях в двукратном повторе

(см. Пример 1). Рекомбинантные растения отбирали по участку QTL и коррелировали с данными фенотипирования. С целью получения новых рекомбинантных растений отбор включал растения, которые покрывали разные участки целевой области, а также гетерозиготные растения. Каждый год проводили два возвратных скрещивания с RP1 и отбирали отдельные растения. Таким образом получали новые рекомбинанты. Новые рекомбинанты фенотипировали в ходе полевых опытов и опытов в условиях теплицы (см. 1.) и генотипировали с целью разработки новых молекулярных маркеров в соответствии с 2.

Использование этих новых маркеров в генотипе RP3HTNA позволило идентифицировать маркерный участок M3, ограничивающий интрогрессию с 5'-конца, который может быть охарактеризован фланкирующими маркерами PZE-108093423 и PZE-108093748. В связи с этим PZE-108093423 должен был проявлять аллели рекуррентного родителя RP3, а PZE-108093748 должен был проявлять аллели донорного B37HTN1. На 3'-конце интрогрессия RP3HTNA определялась маркерами PZE-108107671 и SYN4196 последующего маркерного участка M6 (см. Рис. 3). PZE-108107671 нес аллели донорного B37HTN1, SYN4196 нес аллели рекуррентного родителя RP3. Интрогрессия RP3HTNA (далее именуемая версия A) соответствовала, между маркерными участками M3 и M6, донорному B37HTN1, однако за пределами этого участка она соответствовала рекуррентному родителю или другой линии, которая не несла аллелей донорного B37HTN1 в участке между M1 и M2. Указанную версию A интродуцировали в разные другие генетические фоны и проводили новые опыты по оценке урожайности, фенотипированию устойчивости и определению периодов цветения. Полученные результаты были сопоставимы с результатами, описанными для RP3HTNA. Таким образом, период цветения не сдвигался по сравнению с соответствующей линией без интрогрессии. Линия проявляла лучшую устойчивость к *Helminthosporium turcicum* по сравнению с исходной линией, либо по меньшей мере снижение урожайности силосной массы.

С) Идентификация и элиминация сцепленного наследования, отвечающего за снижение урожайности силосной массы

Используемым донором служила линия RP3HTNA. Ее скрещивали с RP3 и самоопыляли в течение шести поколений. В каждом самоопыленном поколении в целевой области использовали молекулярные маркеры с целью уменьшения донорного фрагмента. Так как все геномные участки за пределами целевой области в геноме RP3 линии RP3HTNA уже были

селектированы, с помощью маркеров исследовали только участок вокруг целевой области HTN. Идентифицировали растения, гомозиготные по степени уменьшения целевой области HTN. Одновременно интенсивно разрабатывались маркеры в целевой области. В дополнение ко многим другим идентифицировали линию RP3HTNK, которая характеризовала донорный фрагмент V37HTN1 из маркерного участка M4, фланкированного маркерами MA0004 и MA0005, при этом MA0004 определял аллели рекуррентного родителя RP3, а маркер MA0005 определял аллели донорной V37HTN1 в RP3HTNK до маркерного участка M5, фланкированного маркерами MA0006 и PZE-108097482, где MA0006 определял аллели донорной V37HTN1, а PZE-108097482 определял аллели рекуррентного родителя RP3. У RP3HTNK интрогрессия RP3HTNK (далее называемая версия К) обуславливала улучшение количественной устойчивости HTN1 на 3-4 признака по сравнению с RP3, одинаковый период цветения с исходной линией RP3 (задержка цветения отсутствовала) и отсутствие значительного снижения урожайности силосной массы (см. Рис. 2). Более того, с помощью описанных маркеров при скрещивании с исходной линией RP1 получались линии, в которых отсутствовало сцепленное наследование, причем эти линии проявляли версию К интрогрессии.

D) Придающий устойчивость гаплотип из V37HTN1 или Pepitilla

Версия К обладала гаплотипом из V37HTN1 или Pepitilla, который нес донорные аллели, представленные в таблице 4, в физических положениях относительно V73 AGRv02, выражаемых в п.о. Например, если гаплотип по маркеру MA0008 может быть определен, как использующий маркер MA0008 для обозначения аллелей V37HTN1, RP3, RP3HTNA, RP3HTNK, тогда аллель «Т» предназначен для V37HTN1, RP3HTNA, RP3HTNK, а аллель «С» - для RP3. Для этого локуса указанный маркер также различает предполагаемый источник устойчивости HTN1 PH99N (WO 2011/163590), который также содержит аллель «С» в этом положении из описываемого здесь источника устойчивости.

4. Молекулярный анализ области тонкого картирования

Фрагмент хромосомы, который был вставлен и усечен интрогрессией, исследовали на молекулярном уровне. Локус устойчивости *Htn1* из исходного сорта Pepitilla сокращали до четкой целевой области, хромосомный интервал 700 кб, и секвенировали генотип RP4HTN1. Как более подробно будет показано ниже, выделяли ВАС-клоны из RP4HTN1,

секвенировали и собирали скаффолд. Скаффолд аннотировали и гены, аннотированные в этом интервале, сравнивали с информацией о EST/кДНК последовательностях. Затем проводили анализ дифференциальной экспрессии ряда аннотированных генов для идентификации генов-кандидатов (см. Таблицу 1).

А) Конструирование ВАС банка и пула, скрининг ВАС банка, секвенирование ВАС-клонов

ВАС банк получали из генотипа RP4HTN1. Затем конструировали ВАС банк и 3D-матрицу пула из листового материала и проводили скрининг 3D-матрицы пула. Праймеры для скрининга 3D-матрицы пула основывались на последовательности B73 AGPv01 размером от 149957158 до 152977351 п.о. на хромосоме 8 (www.maizesequence.org) и программе Primer 3 (<http://simgene.com/primer3>; Rozen & Skaletsky, 2000). Параметры для подбора праймеров: средний GC состав – 50%, длина праймера – 20-25 п.о., температура плавления – 70-90°C и длина ампликона – 70-80 п.о. Используя пары праймеров, представленные в Таблице 7, проводили скрининг 3D пулов посредством ПЦР с обратной транскрипцией. ВАС-клонам задавали два параметра, в частности, температура плавления и значение порогового цикла (СЗ). В селектируемой области смогли идентифицировать 26 ВАС-клонов. Все ВАС-клоны выбирали из ВАС банка и использовали в качестве *E. coli* культуры для выделения ДНК и секвенирования. Секвенирование проводили с использованием стандартного набора GS-FLX Titanium (454 Life Sciences, США). Информация о полученных последовательностях ВАС-клонов 144N24, 119F13, 219G11, 86N21, 16B06, 84L18, 128D02, 25M23, 96H10, 19J24, 136A01, 75H06, 135F07 суммирована в Таблице 8.

Таблица 7. Пары праймеров для детекции ВАС-клонов из ВАС банка RP4HTN

ВАС-клон ID	Пара праймеров 1	Последовательность, пары праймеров 1 (5'-3')	Тем. плавления, °С (50% ампликонов одноцепочечные), генотип RP4HTN1	Значение СЗ (пороговый цикл начала экспоненциальной фазы ПЦР)	Размер ампликона, п.о.
	Пара праймеров 2				
58A14	579ZPMO_2F;	125;	77,4	28,5	74

	579ZMPMO_2R	126			
	579ZMPMO_4F; 579ZMPMO_4R	127; 128	80,96	26,52	77
144N24	579ZMPMO_5F; 579ZMPMO_5R	129; 130	79,09	27,09	76
	579ZMPMO_17F; 579ZMPMO_17R	131; 132	83,06	25,53	78
219G11	579ZMPMO_16F; 579ZMPMO_16R	133; 134	84,07	25,96	78
	579ZMPMO_25F; 579ZMPMO_25R	135; 136	78,95	26,09	80
119F13	579ZMPMO_22F; 579ZMPMO_22R	137; 138	80,89	25,98	73
	579ZMPMO_34F; 579ZMPMO_34R	139; 140	80,1	24,43	76
86N21	579ZMPMO_35F; 579ZMPMO_35R	141; 142	80,9	25,27	70
	579ZMPMO_38F; 579ZMPMO_38R	143; 144	83,86	26,01	71
16B6	579ZMPMO_37F; 579ZMPMO_37R	145; 146	79,22	25,71	80
	579ZMPMO_41F; 579ZMPMO_41R	147; 148	75,93	26,6	74
84L18	579ZMPMO_41F; 579ZMPMO_41R	149; 150	75,93	26,6	74
	579ZMPMO_46F; 579ZMPMO_46R	151; 152	80,54	25,68	78
128D2	579ZMPMO_180F; 579ZMPMO_180R2	153; 154	84,41	25,99	77
	579ZMPMO_48F; 579ZMPMO_48R	155; 156	83,96	25,33	77
25M23	579ZMPMO_48F; 579ZMPMO_48R	157; 158	83,96	25,33	77
	579ZMPMO_56F; 579ZMPMO_56R	159; 160	77	29,12	79
19J24	579ZMPMO_51F; 579ZMPMO_51R	161; 162	87,76	27,75	77
	579ZMPMO_199F; 579ZMPMO_199R	163; 164	82,49	26,56	79
96H10	579ZMPMO_63F; 579ZMPMO_63R	165; 166	85,78	26,08	63
	579ZMPMO_208F; 579ZMPMO_208R	167; 168	79,87	26,84	79

136A1	579ZMPMO_206F; 579ZMPMO_206R	169; 170	89,81	32,09	70
	579ZMPMO_86F; 579ZMPMO_86R	171; 172	81,81	30,07	71
135F7	579ZMPMO_79F; 579ZMPMO_79R	173; 174	75,82	25,43	72
	579ZMPMO_278F; 579ZMPMO_278R	175; 176	78,13	22,69	78
75H6	579ZMPMO_209F; 579ZMPMO_209R	177; 178	75,41	24,93	77
	579ZMPMO_86F; 579ZMPMO_86R	179; 180	81,81	30,07	71
117O2	579ZMPMO_87F; 579ZMPMO_87R	181; 182	81,89	27,7	76
	579ZMPMO_91F; 579ZMPMO_91R	183; 184	80,13	26,93	75
173H23	579ZMPMO_216F; 579ZMPMO_216R	185; 186	82,3	25,76	80
	579ZMPMO_95F; 579ZMPMO_95R	187; 188	79,5	24,97	73
118N19	579ZMPMO_99F; 579ZMPMO_99R	189; 190	76,84	24,69	80
	579ZMPMO_86F; 579ZMPMO_86R	191; 192	80,07	25,38	80
42L23	579ZMPMO_241F; 579ZMPMO_241R	193; 194	81,16	25,79	79
	579ZMPMO_109F; 579ZMPMO_109R	195; 196	77,89	25,28	74
112N13	579ZMPMO_109F; 579ZMPMO_109R	197; 198	77,89	25,28	74
	579ZMPMO_247F; 579ZMPMO_247R	199; 200	80,76	24,82	71
97K23	579ZMPMO_112F; 579ZMPMO_112R	201; 202	79,22	25,2	77
	579ZMPMO_125F; 579ZMPMO_125R	203; 204	83,44	28,17	74
18J17	579ZMPMO_253F; 579ZMPMO_253R	205; 206	77,5	32,34	71
	579ZMPMO_125F; 579ZMPMO_125R	207; 208	83,44	28,17	74
5M22	579ZMPMO_128F; 579ZMPMO_128R	209; 210	77,99	24,05	77
	579ZMPMO_136F;	211;	78,65	26,46	78

	579ZMPMO_136R	212			
146I6	579ZMPMO_131F; 579ZMPMO_131R	213; 214	76,58	26,54	78
	579ZMPMO_137F; 579ZMPMO_137R	215; 216	83,7	25,42	73
147O15	579ZMPMO_138F; 579ZMPMO_138R	217; 218	79,38	24,8	79
	579ZMPMO_147F; 579ZMPMO_147R	219; 220	79,63	26,77	80
88K17	579ZMPMO_145F; 579ZMPMO_145R	221; 222	81,51	27,61	76
	579ZMPMO_262F; 579ZMPMO_262R	223; 224	75,7	25,82	80
180G22	579ZMPMO_161F; 579ZMPMO_161R	225; 226	80,21	25,16	73
	579ZMPMO_265F; 579ZMPMO_265R	227; 228	79,3	24,7	79

Таблица 8. Содержание последовательностей 13 изученных ВАС-клонов

ВАС	#Ридов	#Ридов без <i>E. coli</i>	Размер последовательности, п.о.	Размер последовательности, п.о. без <i>E. coli</i>
144N24	10967	10849	3646226	3591222
119F13	17987	17847	6033910	5957456
219G11	32904	32484	10553629	10381924
86N21	39606	39106	12991596	12750077
16B06	36198	35849	12523123	12357036
84L18	50537	34162	15991645	10776458
128D02	15998	15847	5138442	5064677
25M23	22551	22416	7864493	7786402
96H10	7723	7614	2569604	2525488
19J24	21953	21775	7327364	7234315
136A01	31998	31724	10298869	10158900
75H06	24345	24121	8021727	7920125
135F07	29702	29484	9721708	9604010

В) Сборка, аннотирование последовательностей ВАС-клонов, отбор гена-кандидата

Создание скаффолда: ВАС-клоны 144N24, 119F13, 219G11, 86N21, 16B06, 84L18, 128D02, 25M23, 96H10, 19J24, 136A01, 75H06, 135F07 секвенировали с использованием технологии «454» (Margulies и соавт., 2005).

Автоматическую сборку «сырых» последовательностей ВАС-клонов осуществляли с помощью программного обеспечения «Newbler» (454runAssembly software, версия 2.3). Получаемые таким образом пропоследовательности ВАС-клонов правильно располагали, используя следующую методику ручного анализа:

1. Последовательности перекрывающихся ВАС-клонов грубо разделяли на перекрывающиеся и неперекрывающиеся зоны.
2. В перекрывающихся зонах сравнивали контиги различных перекрывающихся ВАС-клонов. Таким образом располагали приблизительно 20% контигов и заполняли пробелы между ними (например, когда контиг одного ВАС-клона перекрывал или был связан с двумя контигами других ВАС-клонов).
3. Все контиги аннотировали вручную. Вначале аннотировались только повторяющиеся элементы (транспозоны и ретротранспозоны, сокращенно ТЕ). Поскольку пробелы в последовательностях встречаются прежде всего у ТЕ, то аннотирование ТЕ способствует правильному расположению контигов. Это означает, что если один край ТЕ находится на одном контиге, а второй край находится на другом контиге, то оба контига могут упорядочиваться соответствующим образом. В таких случаях соответственно вставляется последовательность из 100 Ns, чтобы заполнить пробелы между контигами. Кроме того, для расположения контигов использовали информацию о «гнездящихся» ТЕ (т.е., ТЕ, встроенных в другие ТЕ).
4. В некоторых зонах было невозможно использовать информацию о перекрывающихся ВАС-клонах или аннотациях ТЕ (например, в зонах, покрываемых одним ВАС-клоном). В этих зонах контиги располагали произвольно и пробелы между ними заполняли последовательностями из 200 Ns.
5. Многие ТЕ в геноме кукурузы представляют собой «длинные терминальные повторы» (LTR), фланкированные длинными (1-2 Кб) LTR-последовательностями. LTR-последовательности могут быть 100% идентичными. В некоторых случаях сырые последовательности из двух LTR-последовательностей собирали в одну консенсусную последовательность

(т.е., копия LTR отсутствовала в сборке). В таких случаях пробелы между последовательностями заполняли количеством Ns, соответствующим длине второй LTR.

6. Гены аннотировали вручную. В этом случае в качестве референсных использовали кодирующие последовательности (CDS) генома кукурузы B73 (http://www.maizegdb.org/gene_model.php). CDS выравнивали с последовательностью RP4HTN, используя DotPlot (<http://www.dotplot.org/>) и таким образом определяли положения экзонов и интронов. С одной стороны, гены-кандидаты определяли по описанию их функции (если было в открытом доступе). С другой стороны, CDS устойчивой RP4HTN сравнивали с чувствительной B73 AGPv02. Если встречались различия, соответствующий ген помещали в список кандидатов. Полученная последовательность имела длину в 1328253 п.о. Перечень генов-кандидатов приводится в Таблице 1.

5. Молекулярный анализ генов-кандидатов

Анализ экспрессии: экспрессию различных генов-кандидатов проверяли на 21 день (после высева), непораженные растения (0 дней после заражения = 0 dpi), а также на 36 день с растениями, которые были заражены и которые не были заражены *H. turcicum* (15 дней после заражения = 15 dpi inf/ni).

Из вторых листьев исследуемых растений кукурузы экстрагировали РНК, проводили обратную транскрипцию РНК в кДНК и измеряли экспрессию с помощью количественной ПЦР (кПЦР). В каждом случае второй лист собирали, замораживали и экстрагировали РНК, определяли количество и анализировали качество и чистоту с помощью набора SV Total RNA Isolation System (Z3100; Promega, Дюбендорф, Швейцария), как точно описано (Brunner и соавт., 2011; Risk и соавт., 2012).

Проводили обратную транскрипцию 1 мкг РНК с использованием iScript RT Supermix (170-8841; Bio-rad, Крессье, Швейцария) в реакционном объеме 20 мкл согласно параметрам производителя. Чтобы исключить вероятность заражения геномной ДНК (RT минус), одновременно реакционную смесь каждой пробы инкубировали без добавления обратной транскриптазы.

Количественную ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) при трехкратном или двукратном повторении циклов проводили в реакционном объеме 10мкл с добавлением 4 мкл разбавленной (1:10) кДНК (10 mM Tris

HCL pH8, 0,1 mM EDTA), 5 мкл SsoFast EvaGreen®Supermix (172-5201; BioRad, Швейцария) и праймера в концентрации 400 нМ в приборе C1000Touch Cycler (BioRad, Швейцария). Амплификацию проводили при следующих параметрах: 95°C – 30 секунд; 40 циклов: 95°C – 3 секунды, 60-63°C (см. Таблицу 2) – 5 секунд. Для анализа кривой плавления (очистки от димеров праймеров) продукт ПЦР нагревали от 65°C до 95°C с шагом 0,5°C. Кривые амплификации и кривые плавления оценивали с помощью программы CFX Manager V 3.0 (BioRad, Швейцария). Значения Cq (цикла для количественных оценок) экспортировали в базу данных программы qbasePLUS V 2.3 (Biogazelle, Zwijnaarde, Бельгия) для определения относительной экспрессии.

Праймеры генов-кандидатов определяли с помощью программы primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) с тем, чтобы, насколько возможно, исключить неспецифическую амплификацию транскриптов, которые уже были известны. Для оценки подходящих ампликонов продукты ПЦР разделяли с использованием электрофореза в агарозном геле, размер продуктов изучали с помощью изолированных полосок. Кроме того, ампликоны RP1HtN и NILHtN, представленные в Таблице 1, секвенировали. Для нормализации данных экспрессии использовали 1-3 референсных гена (LUG, MEP, FPHS) (Manoli и соавт., 2012).

Все гены-кандидаты экспрессировались в чувствительном генотипе RP1 и в устойчивом генотипе RP1HTN. Дифференциальная экспрессия наблюдалась у RLK1. RLK1 у чувствительных растений экспрессировался в 4 раза сильнее, чем у устойчивых растений.

Таблица 9. Пары праймеров генов-кандидатов (длина ампликонов в п.о.) и соответствующая температура отжига

Ген	Праймер	SEQ ID NO:	Последовательности праймеров (F=прямая; R=обратная)	Длина в RP1, п.о.	Длина в RP1HTN, п.о.	Тем. отжига
ZNF1	GH034	229	F: TGGTTGGTGTCTGAAGCTGAG	130	130	60°C
	GH033	230	R:			
HYD	GH039	231	ATTTATCCCGGCCTTTGCAT	74	74	60°C
	GH040	232	F: GATCTACAGGGAAGCCCAC TGA			

			R: TTTTTCCTTGAGGCAGTTAT ATGCT			
RLK4	GH220	233	F: TTGTGCAGCGGAGGGAA	91	85	63°C
	GH221	234	R: CCAGGGCACCAGCAAGAAT			
EXT1	GH168	235	F: CGACTACAAGACGCGTACC	103	103	60°C
	GH170	236	R: GGTGTGCGATGGTGGAGGTTC			
RLK1	GH138	237	F: TATTGTTGGTGCTGTTGCCG	121	121	60°C
	GH139	238	R: GGACTCAATCCTTGTCCCTG			
RET1	GH055	239	F: CGCTCGTTTGCCAGATAGCC	165	165	60°C
	GH056	240	R: CACGGTGTGTGTCCAGTTTGT			

Скрининг популяции TILLING и детекция мутантов. Для генов-кандидатов (Таблица 1) результаты скрининга популяции TILLING из 1000 растений, которая несла интрогрессию из *Peritilla* в хромосоме 8 в участке от 151688552 до 153139596 п.о. и проявляла устойчивость к *Helminthosporium turcicum*, сравнивали с референсной B73 AGPv02 (www.maizesequence.org) (RP3HTN1). Мутации могли представлять собой либо «молчаливые» замены нуклеотидов, либо замены аминокислот или терминирующие кодоны, и применялись для детекции генов-кандидатов.

Трансформация. Например, гены-кандидаты могли интродуцироваться в чувствительный генотип A188 посредством опосредованной *Agrobacterium tumefaciens* трансформации. Этот генотип определяется значениями AUDPC 702 в GWH-анализе³(n=18 растений). Таким образом, трансформация с геном устойчивости давала четкий ответ устойчивости.

6. Определение расовой специфичности: подтверждение, что HTN1 также придает расонеспецифическую устойчивость

Скрининг генотипов с геном HtN проводили во многих локациях всех регионов Европы, где наблюдалось заражение. До сих пор эта устойчивость не была нарушена, поэтому вначале было предположено, что до сих пор указанные генотипы были расоспецифическими, пока не была обнаружена раса N. Раса 1 преобладает в Европе, однако в некоторых отдельных

регионах обнаруживались расы 2 или 3 или их комбинация (Hanekamp и соавт., 2013).

7. Исследование фенотипа по другим рекомбинантным растениям

Новые рекомбинантные растения анализировали по признакам QTL области и результаты коррелировали с данными фенотипирования. Отбор включал растения, которые покрывали разные участки целевой области. Идентифицировались рекомбинантные растения, которые проявляли интрогрессию донорной В37НТН1 между маркерами МА0005 и МА0021 – маркерный участок М7 и между маркерами МА0013 и МА0022 – маркерный участок М8 в генетическом фоне РР1. Эта область, показанная на Рис.4, включает только три гена RLK4, EXT1 и RLK1. Указанные рекомбинантные растения, содержащие участок М7 – М8, проявляли устойчивость в фенотипе как в испытаниях в полевых условиях с искусственной инокуляцией, так и в испытаниях в условиях теплицы.

8. Идентификация гена-кандидата, придающего устойчивость

Для идентификации гена-кандидата, придающего устойчивость, проводили скрининг популяции TILLING из 1000 растений, которая несла интрогрессию из *Peritilla* в хромосоме 8 в участке от 151688552 до 153139596 п.о. и проявляла устойчивость к *Helminthosporium turcicum*, и сравнивали результаты с референсной В73 последовательностью AGPv02 (<http://www.genome.arizona.edu>) (RP3НТН1).

Создавали ампликоны генов RLK4 и RLK1 (таблица 10) и после амплификации ДНК каждого растения популяции TILLING проводили их секвенирование по Сэнгеру.

Таблица 10. Последовательности праймеров для ампликонов

Ген	Праймер	SEQ ID NO:	Последовательности праймеров (F=прямая; R=обратная)	Длина ампликонов, п.о.	Температура отжига, °С
RLK4	МА04916-6f	247	F: TGTTTCAGGAATCACG CAACTGGA	399	60
	МА04916-6r	248	R: GCACCACGCCATGAC CAACATC		
RLK1	TG10013-10.f TG10013-11.r	249	F: СТТСТТАСАСАГААС GAGAGT	804	60

		250	R: TTCCTCACGAGCTCTG TGGTC		
--	--	-----	---------------------------------	--	--

Последовательности ампликонов оценивали с использованием программного обеспечения DNASTAR Lasergene и идентифицировали мутации замены оснований. Обнаруженные мутации представлены в Таблице 11.

Таблица 11. Идентифицированные мутации генов RLK4 и RLK1

Ген	Мутация	Положение мутации в кДНК RP3HTN1, п.о.	Замена оснований	Положение мутации в последовательности белка RP3HTN1, п.о.	Эффект замены аминокислот
RLK4	RLK4d	977 в SEQ ID NO: 3	G > A	326 в SEQ ID NO: 4	G > D
	RLK4f	1169 в SEQ ID NO: 3	C > T	390 в SEQ ID NO: 4	T > I
RLK1	RLK1b	1365 в SEQ ID NO: 1	G > A	455 в SEQ ID NO: 2	M > I
	RLK1d	1490 в SEQ ID NO: 1	G > A	497 в SEQ ID NO: 2	G > E

Идентифицированные мутанты самоопыляли в условиях теплицы и собирали семена гомозиготных растений с аллелями дикого типа и аллелями, мутантными по событию мутации исследуемого фенотипа.

По 15 гомозиготных растений с аллелем дикого типа и мутантов с мутантным аллелем RLK1b, RLK1d, RLK4d и RLK4f и контрольные образцы RP1 и RP1HTN1 инокулировали *H. turcicum*, как показано выше, в условиях теплицы. Спустя 11-25 дней после инокуляции каждый день определяли поражение. Значения AUDPC всех анализируемых растений приведены в таблице 12. Ожидалось, что замена аминокислот в устойчивой родительской линии RP3HTN1 популяции TILLING будет делать гомозиготных мутантов чувствительными.

Таблица 12. Значения AUDPC гомозиготных растений с аллелем дикого типа и мутантным аллелем генов RLK1 и RLK4. В колонке, где указан фенотип, 0-

100 означает устойчивый, 101-450 означает гетерозиготный и > 450 означает чувствительный.

Наименование мутанта	Аллели	AUDPC	Фенотип
RLK4d	Гом. мутант	33,3	устойчивый
	Гом. дикого типа	0,0	устойчивый
RLK4f	Гом. мутант	46,7	устойчивый
	Гом. дикого типа	96,7	устойчивый
RLK1b	Гом. мутант	346,7	гетерозиготный
	Гом. дикого типа	46,4	устойчивый
RLK1d	Гом. мутант	406,7	гетерозиготный
	Гом. дикого типа	83,3	устойчивый
RP1		1030,0	чувствительный
RP1HTN1		0,0	устойчивый

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> КВС ЗААТ АГ

УНИВЕРЗИТЕТ ЦЮРИХ

<120> Растение, устойчивое к гельминтоспориозу

<130> KWS 0206 PCT

<150> DE 10 2013 014 637.2

<151> 2013-09-04

<150> DE 10 2014 005 823.9

<151> 2014-04-24

<160> 250

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2004

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 1

atggctgctc accagcctca cctctccgtc ctctctctcg tcctcctcgc tgcccatgtc 60

gtctccacct ccgcccattg cgagcctcct cttccgagcc cttacaaac ctccgcccatt 120

ggcagcctc ctcttccgag cacttacaac gcctccatgt gctcgtcgtt ctgggtgtggc 180

ggcgtcgaga tccgctacct gttctatctt gccaacgcaa tcgcccacta cagcggggagc 240

tactactcct gcggttacac cgacttgagc gtttcctgcg aactcgaggt cgaggggtcg	300
ccgacgacct ggaccctac catccgtctc ggcggcggcg actacaccgt caagaacatc	360
tcctacctct acgaccagca gaccatctca ctggcggaca gagatgtgct cggaggcggc	420
ggctgccccg tcgtccgcca caacgtcagc ttcgacgaga cgtggctgca cctgcacaac	480
gccagcgctt tcgacaacct caccttcttc ttcggatgcc actggggggc acggaataca	540
ccgcctgaat ttgccgacta caacatcagc tgcgccgggt tcaatactcc aactatcagc	600
ggtggaaggt ccttcgtggt caagactgga gatcttgacg aacaagagga gcaggagtgtg	660
gctttacact gcgacgaggt tttctccgtg ccagtgagaa gagatgctct gcaggcgatc	720
gtcagcaact tcagcctcac acgggacggg tacggcgagg tgcttaggca ggggttcgag	780
ttggaatgga atcggacatc ggaggatcag tgtggccgggt gcgagggatc gggctccggc	840
ggatggtgcg cctacagcca gaagagagaa ttcttgggct gcttgtgcag cggaggggaa	900
gtgggcagcc cgttctgcaa accatcgaga tcaaaaagga aagaaggacc tattgttggt	960
gctggtgccg ttgcattcct gtgtctagtc attctcacat gcttcttggc ttgtagacat	1020
ggttcgctgc cttcaaate ggagaacaaa ccagggacaa ggattgagtc ctctctacag	1080
aagaacgaga gtatacatcc gaaaagatac acctacgcgg acgtgaaaag aatgacaaaa	1140
tccttcgctg tgaagctagg ccaaggtggg tttggtgctg tatacaaagg cagcctccac	1200

gatggccgac aggtagcagt caagatgctg aaggacaccc aaggtgacgg cgaggaattc	1260
atgaacgagg tggctagcat cagcaggact tctcatgtca acgtcgtgac acttctaggg	1320
ttttgcttgc aagggtcgaa aagagcactg atctacgagt acatgcccaa tggttcgctc	1380
gaaaggtatg ccttcaccgg tgacatgaac agtgagaatt tgctaacctg ggaaaggcta	1440
tttgacatag caattggcac ggccagaggg ctcgaatacc tacaccgggg atgcaacact	1500
cggatcgtgc attttgacat caagccacac aacatcctgt tagaccagga tttctgtcct	1560
aagatctctg actttggact ggccaagcta tgtctgaaca aagagagcgc tatctocatt	1620
gctggcgcaa gagggacgat agggatatatc gccccggagg tctactcaaa gcaatttga	1680
ataataagca gcaagtctga tgtctatagc tatgggatga tggtccttga gatggttgga	1740
gcaagggaca ggaatacaag cgcagatagt gaccatagca gccaatatth ccctcagtgg	1800
ctttatgaac atttggacga ctattgtggt ggtgcttccg agattaatgg tgagaccaca	1860
gagctcgtga ggaagatgat agttgtaggt ctgtggtgca tacaagtgat tccgactgat	1920
cgaccaaaa tgacgagagt cgtcgagatg ttggaagga gcacaagtaa tctagagttg	1980
ccaccagag ttctcttgag ctga	2004

<210> 2

<211> 667

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 2

Met Ala Ala His Gln Pro His Leu Ser Val Leu Leu Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

Ala Ala His Val Val Ser Thr Ser Ala His Gly Glu Pro Pro Leu Pro
 20 25 30

Ser Pro Tyr Asn Thr Ser Ala His Gly Glu Pro Pro Leu Pro Ser Thr
 35 40 45

Tyr Asn Ala Ser Met Cys Ser Ser Phe Trp Cys Gly Gly Val Glu Ile
 50 55 60

Arg Tyr Pro Phe Tyr Leu Ala Asn Ala Ile Ala Asp Tyr Ser Gly Ser
65 70 75 80

Tyr Tyr Ser Cys Gly Tyr Thr Asp Leu Ser Val Ser Cys Glu Leu Glu
 85 90 95

Val Glu Gly Ser Pro Thr Thr Trp Thr Pro Thr Ile Arg Leu Gly Gly
 100 105 110

Gly Asp Tyr Thr Val Lys Asn Ile Ser Tyr Leu Tyr Asp Gln Gln Thr
115 120 125

Ile Ser Leu Ala Asp Arg Asp Val Leu Gly Gly Gly Gly Cys Pro Val
130 135 140

Val Arg His Asn Val Ser Phe Asp Glu Thr Trp Leu His Leu His Asn
145 150 155 160

Ala Ser Ala Phe Asp Asn Leu Thr Phe Phe Phe Gly Cys His Trp Gly
165 170 175

Pro Arg Asn Thr Pro Pro Glu Phe Ala Asp Tyr Asn Ile Ser Cys Ala
180 185 190

Gly Phe Asn Thr Pro Thr Ile Ser Gly Gly Arg Ser Phe Val Phe Lys
195 200 205

Thr Gly Asp Leu Asp Glu Gln Glu Glu Gln Glu Leu Ala Leu His Cys
210 215 220

Asp Glu Val Phe Ser Val Pro Val Arg Arg Asp Ala Leu Gln Ala Ile
225 230 235 240

Val Ser Asn Phe Ser Leu Thr Arg Asp Gly Tyr Gly Glu Val Leu Arg
245 250 255

Gln Gly Phe Glu Leu Glu Trp Asn Arg Thr Ser Glu Asp Gln Cys Gly
260 265 270

Arg Cys Glu Gly Ser Gly Ser Gly Gly Trp Cys Ala Tyr Ser Gln Lys
275 280 285

Arg Glu Phe Leu Gly Cys Leu Cys Ser Gly Gly Lys Val Gly Ser Pro
290 295 300

Phe Cys Lys Pro Ser Arg Ser Lys Arg Lys Glu Gly Pro Ile Val Gly
305 310 315 320

Ala Val Ala Val Ala Phe Leu Cys Leu Val Ile Leu Thr Cys Phe Leu
325 330 335

Ala Cys Arg His Gly Ser Leu Pro Phe Lys Ser Glu Asn Lys Pro Gly
340 345 350

Thr Arg Ile Glu Ser Phe Leu Gln Lys Asn Glu Ser Ile His Pro Lys
355 360 365

Arg Tyr Thr Tyr Ala Asp Val Lys Arg Met Thr Lys Ser Phe Ala Val
370 375 380

Lys Leu Gly Gln Gly Gly Phe Gly Ala Val Tyr Lys Gly Ser Leu His
385 390 395 400

Asp Gly Arg Gln Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Thr Gln Gly Asp
405 410 415

Gly Glu Glu Phe Met Asn Glu Val Ala Ser Ile Ser Arg Thr Ser His
420 425 430

Val Asn Val Val Thr Leu Leu Gly Phe Cys Leu Gln Gly Ser Lys Arg
435 440 445

Ala Leu Ile Tyr Glu Tyr Met Pro Asn Gly Ser Leu Glu Arg Tyr Ala
450 455 460

Phe Thr Gly Asp Met Asn Ser Glu Asn Leu Leu Thr Trp Glu Arg Leu
465 470 475 480

Phe Asp Ile Ala Ile Gly Thr Ala Arg Gly Leu Glu Tyr Leu His Arg
485 490 495

Gly Cys Asn Thr Arg Ile Val His Phe Asp Ile Lys Pro His Asn Ile
500 505 510

Leu Leu Asp Gln Asp Phe Cys Pro Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ala
515 520 525

Lys Leu Cys Leu Asn Lys Glu Ser Ala Ile Ser Ile Ala Gly Ala Arg
530 535 540

Gly Thr Ile Gly Tyr Ile Ala Pro Glu Val Tyr Ser Lys Gln Phe Gly
545 550 555 560

Ile Ile Ser Ser Lys Ser Asp Val Tyr Ser Tyr Gly Met Met Val Leu
565 570 575

Glu Met Val Gly Ala Arg Asp Arg Asn Thr Ser Ala Asp Ser Asp His
580 585 590

Ser Ser Gln Tyr Phe Pro Gln Trp Leu Tyr Glu His Leu Asp Asp Tyr
595 600 605

Cys Val Gly Ala Ser Glu Ile Asn Gly Glu Thr Thr Glu Leu Val Arg
610 615 620

Lys Met Ile Val Val Gly Leu Trp Cys Ile Gln Val Ile Pro Thr Asp
625 630 635 640

Arg Pro Thr Met Thr Arg Val Val Glu Met Leu Glu Gly Ser Thr Ser
645 650 655

Asn Leu Glu Leu Pro Pro Arg Val Leu Leu Ser
660 665

<210> 3

<211> 2133

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 3

atggctgctc acctaccacg cctccccgtc ctctctctcg tctctctcgc tgcccatgctc 60

gtctccacct cgcgccatgg cgagcctcct cttccgagca cttacaacac ctccgcccat 120

ggcgagcctc ttcttccgag cacttacaac gcctccatgt gctcggaatc gttctggtgt 180

ggcggcgtcg agatccgcta cccgttcaat cttgccaacg caaccgccga ctacagcggg 240

aactactact cctgcggtta caccgacttg agcgtttcct gcgaactcga ggtcgaaggg 300

tcgccgacga cctggacccc taccatccgt ctcggcggcg acatctacac cgtcaagaac 360

atctctacg actatcatac catctcactg gcggacaacg atgtgctcgg aggcggcgag 420

tgccccgtcg tccgccacaa cgtcagcttc aacgagacgt ggctgcacaa cgccagcgcc	480
ttcgacaacc tcaccttctt cttcggatgc cactgggggc cacggaatac accgcctgaa	540
tttgccgact acaacatcag ctgcgccggg ttcaatcctc caactatcag cggtgaggac	600
tccttcgtgt tcaagcctga atatcttgac gaacaagagg agcaggagtt ggcttcacac	660
tgcgacgagg ttttctccgt gccagtcaga agcgatgctc tgccggcgac cttcagcctc	720
acaggttacg ggtacggcga gctgcttagg caggggttcg ggttggaatg gaatcggaca	780
tcggaggatc agtgtggcca gtgcgagggg tcgggctccg gcggatggtg cgcctacagc	840
cagaagagag aattcctggg ctgcttgtgc agcggagggg aggtgggcaa cccgttctgc	900
aaaccatcga agtcaacaag gaaaccaaga attcctgctg gtgccctggg tggtggtgct	960
gctgcgctgc ttgttgggtg tgccatattt ttgttcgtca tcatgcgcaa gaggaagcag	1020
aagaagaaag tgaccaactc gtcttcgaag ctctcaagt acagcggctc tggtgggacc	1080
ccgcgcttcg gggttgggtg catggagtcc ggcagcatcg aggaccgccc aacgcaccac	1140
ttcgctacg aggagctcga ggaggcgacc aaccgcttcg acgaaagcag agaactcggc	1200
gatggcggct tcggcaccgt ctacaaaggg tacctcaggg acgggcgcgt ggtggcgggtg	1260
aagcggctgt acaacaacgg gtaccggcgc gtggagcagt tccagaacga ggcggccatc	1320
ctgtcggggc tgcgccacc c aaacctcgtc atgttctacg gctgcacgtc cagccacagc	1380

cgcgagctcc tgctggtgta cgagttcgtg gccaacggca cggtcgccga ccacctgcac	1440
gggcagcggg cccccgagcg cgccctctcg tggccgctcc gcctcagcgt cgccgtggag	1500
tccgccgagg cgctcaccta cctgcacgcc atcgagccgc ccgtcgtgca ccgcgacgtc	1560
aagaccacca acatcctcct ggacgccgac taccacgtca aggtcgccga cttcggcctc	1620
tcccgcctct tccccctcga cgtcacgcac gtctccaccg ctccgcaggg cacgccaggg	1680
tatgttgatc cagagtacca ccagtgtac cagctgacgg acaagagcga cgtgtacagc	1740
ttcgggggtg tcttgggtgga gctcatctcg tccaagccgg ccgtcgacat caccggcac	1800
cgcagcgaga tcaacctggc cagcatggcc atcagcaaga tccagaagtg ccagctggag	1860
gagctcgtcg acctcggcct gggctacgac accgaccgg ccaccaggaa gatgatgacg	1920
atggtcgcgg agctggcctt ccgctgcctg cagcagaacg gcgagatgcg cccgccgatc	1980
aaggaggtgc tcgaggtgct caggaacatc cagggcgagt gtctgacgtc ggggaaggat	2040
ggggacaaga gcaaggacgg gcccttctct cccaccacgg ttcacgctcc gtgggacagc	2100
aggtccacga cgccaacac cagcaggac tag	2133

<210> 4

<211> 710

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 4

Met Ala Ala His Leu Pro Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

Ala Ala His Val Val Ser Thr Ser Ala His Gly Glu Pro Pro Leu Pro
20 25 30

Ser Thr Tyr Asn Thr Ser Ala His Gly Glu Pro Leu Leu Pro Ser Thr
35 40 45

Tyr Asn Ala Ser Met Cys Ser Glu Ser Phe Trp Cys Gly Gly Val Glu
50 55 60

Ile Arg Tyr Pro Phe Asn Leu Ala Asn Ala Thr Ala Asp Tyr Ser Gly
65 70 75 80

Asn Tyr Tyr Ser Cys Gly Tyr Thr Asp Leu Ser Val Ser Cys Glu Leu
85 90 95

Glu Val Glu Gly Ser Pro Thr Thr Trp Thr Pro Thr Ile Arg Leu Gly
100 105 110

Gly Asp Ile Tyr Thr Val Lys Asn Ile Ser Tyr Asp Tyr His Thr Ile

115

120

125

Ser Leu Ala Asp Asn Asp Val Leu Gly Gly Gly Glu Cys Pro Val Val
130 135 140

Arg His Asn Val Ser Phe Asn Glu Thr Trp Leu His Asn Ala Ser Ala
145 150 155 160

Phe Asp Asn Leu Thr Phe Phe Phe Gly Cys His Trp Gly Pro Arg Asn
165 170 175

Thr Pro Pro Glu Phe Ala Asp Tyr Asn Ile Ser Cys Ala Gly Phe Asn
180 185 190

Pro Pro Thr Ile Ser Gly Gly Asp Ser Phe Val Phe Lys Pro Glu Tyr
195 200 205

Leu Asp Glu Gln Glu Glu Gln Glu Leu Ala Ser His Cys Asp Glu Val
210 215 220

Phe Ser Val Pro Val Arg Ser Asp Ala Leu Arg Ala Thr Phe Ser Leu
225 230 235 240

Thr Gly Tyr Gly Tyr Gly Glu Leu Leu Arg Gln Gly Phe Gly Leu Glu

245

250

255

Trp Asn Arg Thr Ser Glu Asp Gln Cys Gly Gln Cys Glu Gly Ser Gly

260

265

270

Ser Gly Gly Trp Cys Ala Tyr Ser Gln Lys Arg Glu Phe Leu Gly Cys

275

280

285

Leu Cys Ser Gly Gly Lys Val Gly Asn Pro Phe Cys Lys Pro Ser Lys

290

295

300

Ser Thr Arg Lys Pro Arg Ile Leu Ala Gly Ala Leu Gly Gly Gly Ala

305

310

315

320

Ala Ala Leu Leu Val Gly Ala Ala Ile Phe Leu Phe Val Ile Met Arg

325

330

335

Lys Arg Lys Gln Lys Lys Lys Val Thr Asn Ser Ser Ser Lys Leu Leu

340

345

350

Lys Tyr Ser Gly Ser Gly Gly Thr Pro Arg Ser Arg Val Gly Asp Met

355

360

365

Glu Ser Gly Ser Ile Glu Asp Pro Pro Thr His His Phe Ala Tyr Glu

500

505

510

Pro Pro Val Val His Arg Asp Val Lys Thr Thr Asn Ile Leu Leu Asp

515

520

525

Ala Asp Tyr His Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser Arg Leu Phe

530

535

540

Pro Leu Asp Val Thr His Val Ser Thr Ala Pro Gln Gly Thr Pro Gly

545

550

555

560

Tyr Val Asp Pro Glu Tyr His Gln Cys Tyr Gln Leu Thr Asp Lys Ser

565

570

575

Asp Val Tyr Ser Phe Gly Val Val Leu Val Glu Leu Ile Ser Ser Lys

580

585

590

Pro Ala Val Asp Ile Thr Arg His Arg Ser Glu Ile Asn Leu Ala Ser

595

600

605

Met Ala Ile Ser Lys Ile Gln Lys Cys Gln Leu Glu Glu Leu Val Asp

610

615

620

Leu Gly Leu Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Ala Thr Arg Lys Met Met Thr

atccagtacc cgttctggct caactcctcg gcgcccgact ggggcccgcg ccacgggatc 180
ggccttgtct gcgagggcaa ctcgacgctg accctcccct acatgtccca cagatacgta 240
gtgtccagca tcgactacaa gacgcgtacc gtgctggctt cggacgccga catcgggcac 300
gagtacgacg cggccggctg cccgcgcgtc cgcgtgaacc tcaccatcga caccgcctgg 360
ctgcggcccc cggcctccga cgccaacatc accttctct acgactgcaa gaagagcatc 420
accctgcctt ccgccgtgga actgagtggg tgccattgcc accagcagca gcagcagcag 480
caacaggatt attgccgtag gtcgtacgtg ctgccggacg gcgggatcac gggcgcgcgag 540
gcgaccagct acgggtgcga ggacgtgggt gtggcgcggg tgctggacgc gcacaggagg 600
gagatcctgg gcgcgcctcc ggcgaacgga tccctccgcc ggggtgctgca gggcgggttc 660
gagctgaact acgacacca ctctgagctg tgcgaccggt gcgaggcctc cggcgggtgg 720
tgcggctacc ggcgcggcga ggcgcccgcc accggcgcgg gcggcgggct gacgttcgcc 780
tgcttctgcg acggcggccc gacgacgacg ggctgtgcg gtgccggtac gtacctctc 840
ttcattcccc cagcgttaca atttattata tgtttgtaa 879

<210> 6

<211> 292

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 6

Met Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe Pro Val Gln Phe Gln
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Ala Val Ala Asp Ala Val Pro Gly Leu Cys Ala
20 25 30

Arg Ala Thr Cys Ala Gly His Val Ile Gln Tyr Pro Phe Trp Leu Asn
35 40 45

Ser Ser Ala Pro Asp Cys Gly Arg Arg His Gly Ile Gly Leu Val Cys
50 55 60

Glu Gly Asn Ser Thr Leu Thr Leu Pro Tyr Met Ser His Arg Tyr Val
65 70 75 80

Val Ser Ser Ile Asp Tyr Lys Thr Arg Thr Val Leu Val Ser Asp Ala
85 90 95

Asp Ile Gly Asp Glu Tyr Asp Ala Ala Gly Cys Pro Arg Val Arg Val
100 105 110

Asn Leu Thr Ile Asp Thr Ala Trp Leu Arg Pro Ala Ala Ser Asp Ala

115

120

125

Asn Ile Thr Phe Leu Tyr Asp Cys Lys Lys Ser Ile Thr Leu Pro Ser
130 135 140

Ala Val Glu Leu Ser Gly Cys His Cys His Gln Gln Gln Gln Gln Gln
145 150 155 160

Gln Gln Asp Tyr Cys Arg Arg Ser Tyr Val Leu Pro Asp Gly Gly Ile
165 170 175

Thr Gly Ala Glu Ala His Gln Tyr Gly Cys Glu Asp Val Val Val Ala
180 185 190

Pro Val Leu Asp Ala His Arg Arg Glu Ile Leu Gly Ala Pro Pro Ala
195 200 205

Asn Gly Ser Leu Arg Arg Val Leu Gln Gly Gly Phe Glu Leu Asn Tyr
210 215 220

Asp Thr His Ser Glu Leu Cys Asp Arg Cys Glu Ala Ser Gly Gly Trp
225 230 235 240

Cys Gly Tyr Arg Arg Gly Glu Ala Pro Ala Thr Gly Ala Gly Gly Gly

245

250

255

Leu Thr Phe Ala Cys Phe Cys Asp Gly Gly Pro Thr Thr Thr Gly Leu

260

265

270

Cys Gly Ala Gly Thr Tyr Leu Leu Phe Ile Pro Pro Ala Leu Gln Phe

275

280

285

Ile Ile Cys Leu

290

<210> 7

<211> 588

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 7

atgggggtgca cgacctccca cgacgccgtc gccgctgctg tcacctcctc cagttcccgg 60

ccccgtgctc gccgctcgtc cgcgtccgac ccctcaccac ggcgcggaga ccccgccgcg 120

ctgtgccgag agcgcgtggc gctcatccac gccgcgaccg accgccggta cgcgctcgcc 180

accgcgcacg ctgcctactt ccgctcgttc gccgccgctg gtgacgcgct gcggcgcttc 240

gtggcgctccg cgctcgcgcc cgccacgcct gggtcctcgc tgggtgctcac gctcccgcct 300

tccccgccca agctggctgc tgccgcgtcc gccagcctcc cgacgtggcc gttgtccacc 360

gtctcgtcgc tctcgcactc cctcgcagag aagcggcgga tctttagggg ggcggcggtg 420

aaggaagcg cgcgagagag gacacagtca cggactcagg ccaccgttgc tcacagctgc 480

attagaatcc gatttcgggt ccacgctcac acgtgtcaac gccggatacg ggatgctaac 540

gtgaagtgcg gacgaggctt caaaaggggt gaggttttaa taacttag 588

<210> 8

<211> 195

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 8

Met Gly Cys Thr Thr Ser His Asp Ala Val Ala Ala Ala Val Thr Ser

1 5 10 15

Ser Ser Ser Arg Pro Arg Ala Arg Arg Ser Ser Ala Ser Asp Pro Ser

20 25 30

Pro Arg Arg Gly Asp Pro Ala Ala Leu Cys Arg Glu Arg Val Ala Leu

35 40 45

Ile His Ala Ala Thr Asp Arg Arg Tyr Ala Leu Ala Thr Ala His Ala

50 55 60

Ala Tyr Phe Arg Ser Leu Ala Ala Val Gly Asp Ala Leu Arg Arg Phe
65 70 75 80

Val Ala Ser Ala Leu Ala Pro Ala Thr Pro Gly Ser Ser Leu Val Leu
85 90 95

Thr Leu Pro Pro Ser Pro Ala Lys Leu Val Ala Ala Ala Ser Ala Ser
100 105 110

Leu Pro Thr Trp Pro Leu Ser Thr Val Ser Ser Leu Ser His Ser Leu
115 120 125

Ala Glu Lys Arg Arg Ile Phe Arg Glu Ala Ala Leu Lys Gly Ser Ala
130 135 140

Arg Glu Arg Thr Gln Ser Arg Thr Gln Ala Thr Val Ala His Ser Cys
145 150 155 160

Ile Arg Ile Arg Phe Arg Val His Ala His Thr Cys Gln Arg Arg Ile
165 170 175

Arg Asp Ala Asn Val Lys Cys Gly Arg Gly Phe Lys Arg Gly Glu Val
180 185 190

Leu Ile Thr

195

<210> 9

<211> 3699

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 9

atggcgacgc cgacgcccat gcctggaggc gaggggacgc tcgcagcggg gatgccgcgg 60

tccccgtctc cgacgccggc ggaggcgggg acctcggcga ccgagacgcc cgtgctgata 120

ttcctttact ttcacaaggc gatccgcgcg gagctcgagg cgctgcacgg cgccgccgtg 180

ctcctggcca ccgagcgcac cggcgatgta gagatgctcg ccaagcgtg ccgcttcttc 240

ttcaacattt acaaacacca ctgcgacgcc gaggatgcgg tcatttttcc agcactogat 300

atccgagtaa agaatgttgc agggacctat tccttagagc ataaaggaga aagcgatctt 360

tttagccagt tatttgatct cctgcaattg gacatacata atgatgatgg tcttctgtagg 420

gagcttgctg catgcacagg cgcgatacag acatgtctca gccaacatat gtccaaggag 480

gaagaacagg tctttccatt gcttaciaaag aaatcttctg gtgaagaaca agctgattta 540

gtgtggcaat tcctatgcaa cattcctgtc aatatggtgg cagagttcct tccatggctt 600

tcaacttctg tcacatctga tgagcaccaa gatatccgta actgcttatg caaagtagtt 660

cctgatgaga aacttctcca acaggttgta ttcacatgga tggaagggaa agcaacaaga	720
gaagtggcag agagcattgc tgctggtatt tcagcaagaa atcatagtgt tgaggatgtc	780
ccagaccaag ggaagattca tatttgttta catcacaatt ctaaacttgg gagtaaaaac	840
tgtggagaat ctaatggtcc tcaggctgac aagcatccta tagatgatat tttatactgg	900
cacaatgcta ttcgtatgga gttacgtgat ataaaagagg agacaagaag ggtgcagcaa	960
tctggggatt tttctgatat atcagccttc aatgagaggc ttcagttcat tgcagatgta	1020
tgcatctacc acagtatgc tgaggatcag gttgtttttc ctgcagtcga tagtgagctg	1080
tcctttgtgc aggagcatgc tgaagaagaa tgcaggttta acaatthtag gtgtttaatt	1140
cagcaaatcc aatagcagg agccgaatca actgcattgg acttctactc aaaactgtgt	1200
tcacatgctg ataaaatatt ggaggcaatc gaaaaaact tctgcaatga agaaaccaag	1260
gtgcttctc aagctaggat gctcttctct cttgagaagc aaagggaact ttcatacaaa	1320
agtttgtgtg ttatgccatt gaaattattg gaacgtgttt tgccgtgggt ggtgtcgaag	1380
ctgagtgatg ttcaggcaac ttcatttctt cagaatatac gcttggcagc atcaccatct	1440
gaaactgcac tggtcactct tatctctggt tgggcatgca aaggccggga taaatccaaa	1500
gatggagaat atttatgctt aacatcaggc gcggcgagat gtctatcaga tgatgtagat	1560
gatctgggaa aatgccgatc attctgtcca tgtgcttcac ccaacagctc agatctttct	1620

ctgcagctac atactgagaa tgattctagg ccaggcaagc gaggaaaaga tgcagtatct	1680
ttttctcata ctaatggaat ctactgctct caaactgctg acattgaagc aattccatgt	1740
agcaaaaaac catgttgtat tcctggtttg agagtagaga gtagcaatct tggatttggg	1800
tccttggctt ctgcaaagtc ttttactct ttatcataca attcaactgc tccttcacta	1860
tattcgagcc tcttttcatg ggagacagat acatcattgt cttgttcgga cagcatttca	1920
aggccaatcg atacaatatt caaatttcat aaggcaattc gcaaggattt agaataactta	1980
gatgttgaat ctggcaagct cattgatggc aacgagtcct gccttcgcca attcattgga	2040
aggttccggt tgttatgggg tctttacagg gctcacagca atgctgagga tgaattgtg	2100
tttccagcat tggaatccag agaaacatta cacaatgtga gccattcata tactcttgac	2160
cacaagcagg aagaacagtt gtttgaagat atctcaaagc ttctctttca actttcacia	2220
ctacatgata gccagggcca tgcccagact gaagttaatg aagtaaagaa aagctgtttc	2280
cattcatcta atgatgtcga ttttgctaga aagtataatg aacttgccac aaaacttcag	2340
ggcatgtgca agtctatccg ggtcgccttg actaatcatg tccatagaga agaacttgaa	2400
ttatggccgt tgtttgataa acatttttct gtggaggagc aagataaact tgtaggctgt	2460
ataattgggt caacaggtgc tgaggttctc caatctatgt taccctgggt tacatcagtt	2520
ctcactcaag aggagcagaa caaatgctt gatatgtgga agcaagctac aaaaaataca	2580

atgtttgggg aatggctaaa cgagtgggtg aagggagctg gaacagcadc tgattottca	2640
gcagaggcgt cctctgctcc agaagatagt catttacaag ataagcttga acaaaatgac	2700
cagatgttca agcctggctg gaaggacata tttcgaatga atcagagtga acttgaggct	2760
gaggtgCGaa aggtttcacg agattctaca cttgacccaa ggcggaaggc gtatctaatt	2820
caaaatctca tgacaagccg ctggatagct gcacagcaga agttaccaga accaaattct	2880
gaagaatgta atcacgatgc cagtatacct ggatgtgcac cttcataccg agaccaggag	2940
aaacaaattt atggttgtga aactacaaa cggaactgca aacttgttgc tgcattgctgc	3000
aacaagctct tcacatgcag gttctgcat gataaagtta gtgaccatac gatggaaagg	3060
aaagcaacac aggagatgat gtgcatggta tgcctaaaga ttcaacctgt tggttcgttc	3120
tgccaaacc catcttgcaa cagactatcg atggcaaagt actactgtaa catctgtaaa	3180
ttttttgatg atgaaaggac tgtgtaccac tgtccgtttt gtaatttgtg tcgtcttggg	3240
aaaggtcttg gtgttgattt cttccattgc atgaaatgca actgctgcct tggaaatgaa	3300
ttaactgagc acaaatgtcg ggaaaaaggg ctagagacaa attgtccaat atgctgtgac	3360
ttctattta catcaagtgc cgcagtcaga gccctccctt gtggccactt catgcattca	3420
gcttgctttc aggcatacac ttgtagtcac tacacttgcc ctatctgctg caaatccttg	3480
ggagatatgg cggtttattt tggcatgctt gatgccttgt tggcggctga agagcttccg	3540

gaggaatacc gtgatcgggtg tcaggatata ctttgcaatg actgtgagag gaaaggtaga 3600

tgtcgaattc attggttata ccacaaatgc ggctcctgtg ggtcgtacaa cacccgagtt 3660

atcaagactg ccacagcaga ttgctctaca ccaaactag 3699

<210> 10

<211> 1232

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 10

Met Ala Thr Pro Thr Pro Met Pro Gly Gly Glu Gly Thr Leu Ala Ala

1 5 10 15

Val Met Pro Arg Ser Pro Ser Pro Thr Pro Ala Glu Ala Gly Thr Ser

20 25 30

Ala Thr Glu Thr Pro Val Leu Ile Phe Leu Tyr Phe His Lys Ala Ile

35 40 45

Arg Ala Glu Leu Glu Ala Leu His Gly Ala Ala Val Leu Leu Ala Thr

50 55 60

Glu Arg Thr Gly Asp Val Glu Met Leu Ala Lys Arg Cys Arg Phe Phe

65

70

75

80

Phe Asn Ile Tyr Lys His His Cys Asp Ala Glu Asp Ala Val Ile Phe

85

90

95

Pro Ala Leu Asp Ile Arg Val Lys Asn Val Ala Gly Thr Tyr Ser Leu

100

105

110

Glu His Lys Gly Glu Ser Asp Leu Phe Ser Gln Leu Phe Asp Leu Leu

115

120

125

Gln Leu Asp Ile His Asn Asp Asp Gly Leu Arg Arg Glu Leu Ala Ser

130

135

140

Cys Thr Gly Ala Ile Gln Thr Cys Leu Ser Gln His Met Ser Lys Glu

145

150

155

160

Glu Glu Gln Val Phe Pro Leu Leu Thr Lys Lys Phe Ser Cys Glu Glu

165

170

175

Gln Ala Asp Leu Val Trp Gln Phe Leu Cys Asn Ile Pro Val Asn Met

180

185

190

Val Ala Glu Phe Leu Pro Trp Leu Ser Thr Ser Val Thr Ser Asp Glu

195

200

205

His Gln Asp Ile Arg Asn Cys Leu Cys Lys Val Val Pro Asp Glu Lys
210 215 220

Leu Leu Gln Gln Val Val Phe Thr Trp Met Glu Gly Lys Ala Thr Arg
225 230 235 240

Glu Val Ala Glu Ser Ile Ala Ala Gly Ile Ser Ala Arg Asn His Ser
245 250 255

Val Glu Asp Val Pro Asp Gln Gly Lys Ile His Ile Cys Leu His His
260 265 270

Asn Ser Lys Leu Gly Ser Lys Asn Cys Gly Glu Ser Asn Gly Pro Gln
275 280 285

Ala Asp Lys His Pro Ile Asp Asp Ile Leu Tyr Trp His Asn Ala Ile
290 295 300

Arg Met Glu Leu Arg Asp Ile Lys Glu Glu Thr Arg Arg Val Gln Gln
305 310 315 320

Ser Gly Asp Phe Ser Asp Ile Ser Ala Phe Asn Glu Arg Leu Gln Phe

325

330

335

Ile Ala Asp Val Cys Ile Tyr His Ser Ile Ala Glu Asp Gln Val Val

340

345

350

Phe Pro Ala Val Asp Ser Glu Leu Ser Phe Val Gln Glu His Ala Glu

355

360

365

Glu Glu Cys Arg Phe Asn Asn Phe Arg Cys Leu Ile Gln Gln Ile Gln

370

375

380

Ile Ala Gly Ala Glu Ser Thr Ala Leu Asp Phe Tyr Ser Lys Leu Cys

385

390

395

400

Ser His Ala Asp Lys Ile Leu Glu Ala Ile Glu Lys His Phe Cys Asn

405

410

415

Glu Glu Thr Lys Val Leu Pro Gln Ala Arg Met Leu Phe Ser Leu Glu

420

425

430

Lys Gln Arg Glu Leu Ser Tyr Lys Ser Leu Cys Val Met Pro Leu Lys

435

440

445

Leu Leu Glu Arg Val Leu Pro Trp Leu Val Ser Lys Leu Ser Asp Val

450

455

460

Gln Ala Thr Ser Phe Leu Gln Asn Ile Arg Leu Ala Ala Ser Pro Ser
465 470 475 480

Glu Thr Ala Leu Val Thr Leu Ile Ser Gly Trp Ala Cys Lys Gly Arg
485 490 495

Asp Lys Ser Lys Asp Gly Glu Tyr Leu Cys Leu Thr Ser Gly Ala Ala
500 505 510

Arg Cys Leu Ser Asp Asp Val Asp Asp Leu Gly Lys Cys Arg Ser Phe
515 520 525

Cys Pro Cys Ala Ser Pro Asn Ser Ser Asp Leu Ser Leu Gln Leu His
530 535 540

Thr Glu Asn Asp Ser Arg Pro Gly Lys Arg Gly Lys Asp Ala Val Ser
545 550 555 560

Phe Ser His Thr Asn Gly Ile Tyr Cys Ser Gln Thr Ala Asp Ile Glu
565 570 575

Ala Ile Pro Cys Ser Lys Lys Pro Cys Cys Ile Pro Gly Leu Arg Val

580

585

590

Glu Ser Ser Asn Leu Gly Ile Gly Ser Leu Ala Ser Ala Lys Ser Phe

595

600

605

His Ser Leu Ser Tyr Asn Ser Thr Ala Pro Ser Leu Tyr Ser Ser Leu

610

615

620

Phe Ser Trp Glu Thr Asp Thr Ser Leu Ser Cys Ser Asp Ser Ile Ser

625

630

635

640

Arg Pro Ile Asp Thr Ile Phe Lys Phe His Lys Ala Ile Arg Lys Asp

645

650

655

Leu Glu Tyr Leu Asp Val Glu Ser Gly Lys Leu Ile Asp Gly Asn Glu

660

665

670

Ser Cys Leu Arg Gln Phe Ile Gly Arg Phe Arg Leu Leu Trp Gly Leu

675

680

685

Tyr Arg Ala His Ser Asn Ala Glu Asp Glu Ile Val Phe Pro Ala Leu

690

695

700

Glu Ser Arg Glu Thr Leu His Asn Val Ser His Ser Tyr Thr Leu Asp

705		710		715		720									
His	Lys	Gln	Glu	Glu	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Ile	Ser	Asn	Val	Leu	Phe
			725					730						735	
Gln	Leu	Ser	Gln	Leu	His	Asp	Ser	Gln	Gly	His	Ala	Gln	Thr	Glu	Val
		740						745						750	
Asn	Glu	Val	Lys	Lys	Ser	Cys	Phe	His	Ser	Ser	Asn	Asp	Val	Asp	Phe
		755					760							765	
Ala	Arg	Lys	Tyr	Asn	Glu	Leu	Ala	Thr	Lys	Leu	Gln	Gly	Met	Cys	Lys
		770					775							780	
Ser	Ile	Arg	Val	Ala	Leu	Thr	Asn	His	Val	His	Arg	Glu	Glu	Leu	Glu
785					790					795					800
Leu	Trp	Pro	Leu	Phe	Asp	Lys	His	Phe	Ser	Val	Glu	Glu	Gln	Asp	Lys
			805							810					815
Leu	Val	Gly	Arg	Ile	Ile	Gly	Ser	Thr	Gly	Ala	Glu	Val	Leu	Gln	Ser
			820							825					830
Met	Leu	Pro	Trp	Val	Thr	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Glu	Glu	Gln	Asn	Lys

835

840

845

Met Leu Asp Met Trp Lys Gln Ala Thr Lys Asn Thr Met Phe Gly Glu
850 855 860

Trp Leu Asn Glu Trp Trp Lys Gly Ala Gly Thr Ala Ser Asp Ser Ser
865 870 875 880

Ala Glu Ala Ser Ser Ala Pro Glu Asp Ser His Leu Gln Asp Lys Leu
885 890 895

Glu Gln Asn Asp Gln Met Phe Lys Pro Gly Trp Lys Asp Ile Phe Arg
900 905 910

Met Asn Gln Ser Glu Leu Glu Ala Glu Val Arg Lys Val Ser Arg Asp
915 920 925

Ser Thr Leu Asp Pro Arg Arg Lys Ala Tyr Leu Ile Gln Asn Leu Met
930 935 940

Thr Ser Arg Trp Ile Ala Ala Gln Gln Lys Leu Pro Glu Pro Asn Ser
945 950 955 960

Glu Glu Cys Asn His Asp Ala Ser Ile Pro Gly Cys Ala Pro Ser Tyr

965

970

975

Arg Asp Gln Glu Lys Gln Ile Tyr Gly Cys Glu His Tyr Lys Arg Asn

980

985

990

Cys Lys Leu Val Ala Ala Cys Cys Asn Lys Leu Phe Thr Cys Arg Phe

995

1000

1005

Cys His Asp Lys Val Ser Asp His Thr Met Glu Arg Lys Ala Thr

1010

1015

1020

Gln Glu Met Met Cys Met Val Cys Leu Lys Ile Gln Pro Val Gly

1025

1030

1035

Ser Phe Cys Gln Thr Pro Ser Cys Asn Arg Leu Ser Met Ala Lys

1040

1045

1050

Tyr Tyr Cys Asn Ile Cys Lys Phe Phe Asp Asp Glu Arg Thr Val

1055

1060

1065

Tyr His Cys Pro Phe Cys Asn Leu Cys Arg Leu Gly Lys Gly Leu

1070

1075

1080

Gly Val Asp Phe Phe His Cys Met Lys Cys Asn Cys Cys Leu Gly

1085

1090

1095

Met Lys Leu Thr Glu His Lys Cys Arg Glu Lys Gly Leu Glu Thr
1100 1105 1110

Asn Cys Pro Ile Cys Cys Asp Phe Leu Phe Thr Ser Ser Ala Ala
1115 1120 1125

Val Arg Ala Leu Pro Cys Gly His Phe Met His Ser Ala Cys Phe
1130 1135 1140

Gln Ala Tyr Thr Cys Ser His Tyr Thr Cys Pro Ile Cys Cys Lys
1145 1150 1155

Ser Leu Gly Asp Met Ala Val Tyr Phe Gly Met Leu Asp Ala Leu
1160 1165 1170

Leu Ala Ala Glu Glu Leu Pro Glu Glu Tyr Arg Asp Arg Cys Gln
1175 1180 1185

Asp Ile Leu Cys Asn Asp Cys Glu Arg Lys Gly Arg Cys Arg Phe
1190 1195 1200

His Trp Leu Tyr His Lys Cys Gly Ser Cys Gly Ser Tyr Asn Thr

1205

1210

1215

Arg Val Ile Lys Thr Ala Thr Ala Asp Cys Ser Thr Pro Asn

1220

1225

1230

<210> 11

<211> 1152

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 11

atggagagct ggggccgcgc ggtggtggag gccatccact cctctcgctc ccagacagtc 60

atctacctcg ccggcgggtgc atcccaggcg ctcggttggc tcctctccgt gcccggcgct 120

tcgggcaccg tcctcgaggt cgtcgtgcc tactctaggg cctccatggc gcagctcctt 180

ggcaagatgc ccctgcaatt cactagcaag caggctgcag aggacatggc actggccgca 240

tacaatcgag cactcaagct ttctggacca ggtctgcaag ttatgggtgt tggatttact 300

gggtcactgg cgagctcacg tccaaaacat ggtgaccaca ggttttatgt gtcaacatgg 360

acacataatt gtctcaggac atcacatggt accttgctga agggtttacg gagtagggag 420

gaagaagaca aggtttcaag ctactttttg ctttaaggcaa tagcagatac ctgcagagtt 480

tctgcaacca ttcagccaga cattcacaaa tctgaaattc cagaagaaat catggaacaa 540

tttgatgaag atcaagaact ccagcaagtt attaatgggc aagtttgcac gaaagtatat 600

Ser Gln Thr Val Ile Tyr Leu Ala Gly Gly Ala Ser Gln Ala Leu Gly
20 25 30

Trp Leu Leu Ser Val Pro Gly Ala Ser Gly Thr Val Leu Glu Val Val
35 40 45

Val Pro Tyr Ser Arg Ala Ser Met Ala Gln Leu Leu Gly Lys Met Pro
50 55 60

Leu Gln Phe Thr Ser Lys Gln Ala Ala Glu Asp Met Ala Leu Ala Ala
65 70 75 80

Tyr Asn Arg Ala Leu Lys Leu Ser Gly Pro Gly Leu Gln Val Met Gly
85 90 95

Val Gly Phe Thr Gly Ser Leu Ala Ser Ser Arg Pro Lys His Gly Asp
100 105 110

His Arg Phe Tyr Val Ser Thr Trp Thr His Asn Cys Leu Arg Thr Ser
115 120 125

His Val Thr Leu Ser Lys Gly Leu Arg Ser Arg Glu Glu Glu Asp Lys
130 135 140

Val Ser Ser Tyr Phe Leu Leu Lys Ala Ile Ala Asp Thr Cys Arg Val
145 150 155 160

Ser Ala Thr Ile Gln Pro Asp Ile His Lys Ser Glu Ile Pro Glu Glu
165 170 175

Ile Met Glu Gln Phe Asp Glu Asp Gln Glu Leu Gln Gln Val Ile Asn
180 185 190

Gly Gln Val Cys Met Lys Val Tyr Asn Phe Ala Ala Pro Ala Glu Ser
195 200 205

Asn Leu Asn Arg Lys Ile Ile Leu Pro Gly Ser Phe Asn Pro Leu His
210 215 220

Asp Gly His Leu Arg Leu Leu Glu Ala Ala Val Ser Met Cys Asp Asp
225 230 235 240

Gly Leu Pro Phe Phe Glu Ile Ser Ala Ile Asn Ala Asp Lys Pro Pro
245 250 255

Leu Ser Ile Ala Glu Ile Lys Arg Arg Val Glu Gln Phe Arg Lys Ala
260 265 270

Gly Lys Asn Val Ile Ile Ser Asn Gln Pro Tyr Phe Tyr Lys Lys Ala
275 280 285

Glu Leu Phe Pro Gly Ser Ala Phe Ile Ile Gly Ala Asp Thr Ala Ala
290 295 300

Arg Leu Val Asn Pro Lys Tyr Tyr Gly Gly Asp Tyr Asn Arg Met Leu
305 310 315 320

Glu Ile Leu Leu Glu Cys Lys Ser Ile Gly Thr Thr Phe Leu Val Gly
325 330 335

Gly Arg Lys Ile Glu Gly Asp Phe Lys Val Leu Glu Asn Leu Asp Ile
340 345 350

Pro Glu Glu Leu Arg Glu Met Phe Ile Ser Ile Pro Glu Glu Lys Phe
355 360 365

Arg Ile Asp Ile Ser Ser Thr Glu Ile Arg Lys Ser Gln Gly Leu
370 375 380

<210> 13

<211> 666

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 13

atgcacccta atttccaag cgatcatggc aacggacgag ggggtgggcgg cggcggcggc 60

catagcaggc gcaagccgat tcatcagctt ctcggtggag ggcgagccgc ggacatcttg 120

ctgtggaagg acaggaattt gtctgcaggc ctgctcgctg gggccacgct ggtatggtac 180

ctgttcgagg ttgttgagta cagcattgta ccgctcgttt gccagatagc catcctggcc 240

atgctcgtcg tcttcatctg gtcgaatgct gcgcccctct tgaacatagc ccctccaagg 300

atcccagaag tgatcatctc tgagcatgcc ttccgacaaa tagcacagat cgtccattac 360

aaactggcac acaccgtgtc tgctctttat gacattgcat gcgggaagga tctgaagaaa 420

ttcctcctgg tggctttatc actgctaata gtgtcagagg ttggaagtcc ttacagcttc 480

acaagtcttc tatactcttg atttctttgc gccacactt tgccagcgtt gtaccaaaga 540

tatgagacag aggttgacca ccttgccgca aggggtagtg aagacatcaa gaggttctac 600

aagaggattg attccaattt gctgaacaaa ataccaaggg gcccagtcaa gacaaaagtt 660

aaataa 666

<210> 14

<211> 221

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 14

Met His Pro Asn Phe Pro Ser Asp His Gly Asn Gly Arg Gly Val Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly His Ser Arg Arg Lys Pro Ile His Gln Leu Leu Gly
 20 25 30

Gly Gly Arg Ala Ala Asp Ile Leu Leu Trp Lys Asp Arg Asn Leu Ser
 35 40 45

Ala Gly Leu Leu Ala Gly Ala Thr Leu Val Trp Tyr Leu Phe Glu Val
 50 55 60

Val Glu Tyr Ser Ile Val Pro Leu Val Cys Gln Ile Ala Ile Leu Ala
65 70 75 80

Met Leu Val Val Phe Ile Trp Ser Asn Ala Ala Pro Leu Leu Asn Ile
 85 90 95

Ala Pro Pro Arg Ile Pro Glu Val Ile Ile Ser Glu His Ala Phe Arg
 100 105 110

Gln Ile Ala Gln Ile Val His Tyr Lys Leu Ala His Thr Val Ser Ala

115

120

125

Leu Tyr Asp Ile Ala Cys Gly Lys Asp Leu Lys Lys Phe Leu Leu Val

130

135

140

Val Leu Ser Leu Leu Ile Val Ser Glu Val Gly Ser Ser Tyr Ser Phe

145

150

155

160

Thr Ser Leu Leu Tyr Leu Gly Phe Leu Cys Ala His Thr Leu Pro Ala

165

170

175

Leu Tyr Gln Arg Tyr Glu Thr Glu Val Asp His Leu Ala Ala Arg Gly

180

185

190

Ser Glu Asp Ile Lys Arg Phe Tyr Lys Arg Ile Asp Ser Asn Leu Leu

195

200

205

Asn Lys Ile Pro Arg Gly Pro Val Lys Thr Lys Val Lys

210

215

220

<210> 15

<211> 1113

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 15

atggggcggcg tcacgtccac catcgccgcg cgcttcgctt tcttcccgcc gacgcgcgcg 60

tcctacaccg tcgtcgtcgc cgacgccgcc accggtcgcc tcgccatccc ggagatctcc 120

cgggcaccct cgcgccgtcg gaggcgggac ggcgccggcg ccgggggctc ctctcggcc 180

tcctccgtcg tcgcggccgc cgaggaggag gacggcgcgg aggtggtgcg cctccggacc 240

cgccgcggga acgagatcgt gggggctctac gtgcgccacg cgcggggctc cgccaccgtg 300

ctctactccc acggcaacgc cgccgacctc ggccagatgt acgggctctt cgtcgcgctc 360

agccgccgcc tccgcgtcaa cctctttggg tatgattatt ctggttatgg gagatctaca 420

gggaagccca ctgagtgtaa tacatatgca gacattgaag cagcatataa ctgcctcaag 480

gaaaaatatg gtgtagcaga tgaggatata atcttatatg gtcagtctgt tggaagtggg 540

ccaaccattg atcttgcttc gcggttgcc a gacttgcgag ctgtggtttt gcatagtctt 600

atcttatctg gactaagagt aatatatcca gtcaagcgga cgttttggtt tgacatttac 660

aagaacatcg ataaaattgg cttggtaaat tgtccgggtgc ttgtcattca tggtagcatca 720

gatgacgtgg ttgactgctc ccacggaaaa cagctatggg agcactgcaa agtaaaatat 780

tctccactgt ggttaagtgg tgggtggccac tgcaatctcg agctatatcc agattacatt 840

aagcacttga aaaagtttgt gtcaagcgtt agcaaaaaag catcatcgaa acctgaccca 900

aaagaacaa cgacaaagga tgacactacc agtaaagaaa cagaggaagc gtaccgggag 960

aaacctcaag aggccaagaa gtgcccgcag atctcgcgaa agagcctgga cagccgattc 1020

gggaaatcca aaacagtgga tgttcctgat aaaccacgga tgagctcggga cgacatcgac 1080

aagttccgga ggagcagatg cttgggtctgg tga 1113

<210> 16

<211> 370

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 16

Met Gly Gly Val Thr Ser Thr Ile Ala Ala Arg Phe Ala Phe Phe Pro

1 5 10 15

Pro Thr Pro Pro Ser Tyr Thr Val Val Val Ala Asp Ala Ala Thr Gly

20 25 30

Arg Leu Ala Ile Pro Glu Ile Ser Arg Ala Pro Ser Arg Arg Arg Arg

35 40 45

Arg Asp Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ser Ser Ser Ala Ser Ser Val Val

50 55 60

Ala Ala Ala Glu Glu Glu Asp Gly Ala Glu Val Val Arg Leu Arg Thr

65

70

75

80

Arg Arg Gly Asn Glu Ile Val Gly Val Tyr Val Arg His Ala Arg Ala

85

90

95

Ser Ala Thr Val Leu Tyr Ser His Gly Asn Ala Ala Asp Leu Gly Gln

100

105

110

Met Tyr Gly Leu Phe Val Glu Leu Ser Arg Arg Leu Arg Val Asn Leu

115

120

125

Phe Gly Tyr Asp Tyr Ser Gly Tyr Gly Arg Ser Thr Gly Lys Pro Thr

130

135

140

Glu Cys Asn Thr Tyr Ala Asp Ile Glu Ala Ala Tyr Asn Cys Leu Lys

145

150

155

160

Glu Lys Tyr Gly Val Ala Asp Glu Asp Ile Ile Leu Tyr Gly Gln Ser

165

170

175

Val Gly Ser Gly Pro Thr Ile Asp Leu Ala Ser Arg Leu Pro Asp Leu

180

185

190

Arg Ala Val Val Leu His Ser Pro Ile Leu Ser Gly Leu Arg Val Ile

195

200

205

Tyr Pro Val Lys Arg Thr Phe Trp Phe Asp Ile Tyr Lys Asn Ile Asp
210 215 220

Lys Ile Gly Leu Val Asn Cys Pro Val Leu Val Ile His Gly Thr Ser
225 230 235 240

Asp Asp Val Val Asp Cys Ser His Gly Lys Gln Leu Trp Glu His Cys
245 250 255

Lys Val Lys Tyr Ser Pro Leu Trp Leu Ser Gly Gly Gly His Cys Asn
260 265 270

Leu Glu Leu Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys His Leu Lys Lys Phe Val Ser
275 280 285

Ser Val Ser Lys Lys Ala Ser Ser Lys Pro Asp Pro Lys Glu Thr Thr
290 295 300

Thr Lys Asp Asp Thr Thr Ser Lys Glu Thr Glu Glu Ala Tyr Pro Glu
305 310 315 320

Lys Pro Gln Glu Ala Lys Lys Cys Pro Gln Ile Ser Arg Lys Ser Leu

325

330

335

Asp Ser Arg Phe Gly Lys Ser Lys Thr Val Asp Val Pro Asp Lys Pro

340

345

350

Arg Met Ser Ser Asp Asp Ile Asp Lys Phe Arg Arg Ser Arg Cys Leu

355

360

365

Val Trp

370

<210> 17

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYN14136 Primer Allel X

<400> 17

gaaggtgacc aagttcatgc tcatcttggt cggccttttc tacacta

47

<210> 18

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYN14136 Primer Allel Y

<400> 18

gaaggtcggg gtcaacggat tatcttggtc ggccttttct acactc

46

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYN14136 gemeinsamer Primer

<400> 19

agaaccaaaa attcaccagc tgtgagaa

28

<210> 20

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108076510 Primer Allel X

<400> 20

gaagtgacc aagttcatgc tagcggcggg ctttcataca attt

44

<210> 21

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108076510 Primer Allel Y

<400> 21

gaaggtcgga gtcaacggat tgcggcgggc tttcatacaa ttc

43

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108076510 gemeinsamer Primer

<400> 22

cttgtgatca cgtgaggggc tcaa

24

<210> 23

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYN24931 Primer Allel X

<400> 23

gaaggtgacc aagttcatgc tccattagat gagaaagcaa agagaacta

49

<210> 24

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYN24931 Primer Allel Y

<400> 24

gaaggtcgga gtcaacggat tcattagatg agaaagcaaa gagaactg

48

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYN24931 gemeinsamer Primer

<400> 25

attggtcgac atctcatgga ggctt

25

<210> 26

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108077560 Primer Allel X

<400> 26

gaaggtgacc aagttcatgc tgcagtggcc tgcgca

36

<210> 27

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108077560 Primer Allel Y

<400> 27

gaaggtcggg gtcaacggat tgctgcagtg gcctgcgcg

39

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108077560 gemeinsamer Primer

<400> 28

agataatgag tcatcaggct atcagcaa

28

<210> 29

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108093423 Primer Allel X

<400> 29

gaaggTgacc aagttcatgc tgtaatccat tgtgaacata tcgctatca

49

<210> 30

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108093423 Primer Allel Y

<400> 30

gaaggTcgga gtcaacggat taatccattg tgaacatatc gctatcg

47

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108093423 gemeinsamer Primer

<400> 31

gaaacggttc tgctgcagtt tggta

25

<210> 32

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108093748 Primer Allel X

<400> 32

gaaggtgacc aagttcatgc tggatagagt tgcagctaata gcttcaa

47

<210> 33

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108093748 Primer Allel Y

<400> 33

gaaggtcggg gtcaacggat tgatagagtt gcagctaata gcttcag

46

<210> 34

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108093748 gemeinsamer Primer

<400> 34

cctgcgcttt gtaaataagt taggcaaa

28

<210> 35

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108107671 Primer Allel X

<400> 35

gaagtgacc aagttcatgc ttgcacctgc acacgccg

38

<210> 36

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108107671 Primer Allel Y

<400> 36

gaagtcgga gtcaacggat tcttgacct gcacagccc

40

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108107671 gemeinsamer Primer

<400> 37

gatgccaagg atcgggcgct t

21

<210> 38

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYN4196 Primer Allel X

<400> 38

gaagtgacc aagttcatgc tctgcactct ggaatatcta taacaga

47

<210> 39

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYN4196 Primer Allel Y

<400> 39

gaaggtcggg gtcaacggat tctgcactct ggaatatcta taacagc

47

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYN4196 gemeinsamer Primer

<400> 40

tggtttatac caggaaggga cgcat

25

<210> 41

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0004 Primer Allel X

<400> 41

gaaggtgacc aagttcatgc tgcctcgtcc gcacttcacg t

41

<210> 42

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0004 Primer Allel Y

<400> 42

gaaggtcggg gtcaacggat tcctcgtccg cacttcacgg

40

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0004 gemeinsamer Primer

<400> 43

gtgtcaacgc cggatacggg at

22

<210> 44

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0005 Primer Allel X

<400> 44

gaaggtgacc aagttcatgc tccaaaattt tagaatcaca aacagattta cg

52

<210> 45

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0005 Primer Allel Y

<400> 45

gaaggtcggg gtcaacggat tccaaaattt tagaatcaca aacagattta ct

52

<210> 46

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0005 gemeinsamer Primer

<400> 46

aaacgccagt atcaaggagt tattagtatt

30

<210> 47

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0006 Primer Allel X

<400> 47

gaaggtgacc aagttcatgc tgcacacaaa cacaaattat gtcaaactg

49

<210> 48

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0006 Primer Allel Y

<400> 48

gaaggtcgga gtcaacggat tagcacacaa acacaaatta tgtcaaacta

50

<210> 49

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0006 gemeinsamer Primer

<400> 49

ggctgtctta cgatatacca gttttctta

29

<210> 50

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108097482 Primer Allel X

<400> 50

gaaggtgacc aagttcatgc tagtcgggga tgcatgcat tga

43

<210> 51

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108097482 Primer Allel Y

<400> 51

gaaggtcggga gtcaacggat tgtcggggat gcatgccatt gc

42

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108097482 gemeinsamer Primer

<400> 52

gactccagag agagacagaa aggaa

25

<210> 53

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0002 Primer Allel X

<400> 53

gaaggtgacc aagttcatgc tgcctcgtcc gcacttcacg t

41

<210> 54

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0002 Primer Allel Y

<400> 54

gaaggtcggg gtcaacggat tcctcgtccg cacttcacgg

40

<210> 55

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0002 gemeinsamer Primer

<400> 55

gtgtcaacgc cggatacggg at

22

<210> 56

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0003 Primer Allel X

<400> 56

gaaggtgacc aagttcatgc tccgtgatgc gccttgccgt a

41

<210> 57

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0003 Primer Allel Y

<400> 57

gaaggtcggg gtcaacggat tcgtgatgcg ccttgccgtc

40

<210> 58

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0003 gemeinsamer Primer

<400> 58

gcacatcaat cgactcagcc ctat

24

<210> 59

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0007 Primer Allel X

<400> 59

gaagtgacc aagttcatgc tgaaattatt ctcagcgagc atataacc

48

<210> 60

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0007 Primer Allel Y

<400> 60

gaagtcgga gtcaacggat tggaaattat tctcagcgag catataact

49

<210> 61

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0007 gemeinsamer Primer

<400> 61

cgaacaggca grcccatatg cttt

24

<210> 62

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0008 Primer Allel X

<400> 62

gaagtgacc aagttcatgc tggtaaaatg aagtaaaagc atatgggc

48

<210> 63

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0008 Primer Allel Y

<400> 63

gaaggtcggg gtcaacggat tgaggtaaaa tgaagtaaaa gcatatgggt

50

<210> 64

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0008 gemeinsamer Primer

<400> 64

tagacggagg gtgtacttat gcgaa

25

<210> 65

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0009 Primer Allel X

<400> 65

gaaggtgacc aagttcatgc tgtaacaaat ttgtgcttta tgtttctggt t

51

<210> 66

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0009 Primer Allel Y

<400> 66

gaaggtcggg gtcaacggat taacaaattt gtgctttatg tttctggtg

49

<210> 67

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0009 gemeinsamer Primer

<400> 67

gatttsagca agattaagct gattcacgt

29

<210> 68

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0010 Primer Allel X

<400> 68

gaaggtgacc aagttcatgc tgttggaag agcctatagt caataca

47

<210> 69

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0010 Primer Allel Y

<400> 69

gaaggtcgga gtcaacggat tgttggaag agcctatagt caatacc

47

<210> 70

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0010 gemeinsamer Primer

<400> 70

aattcatcay atgcttttct tctgctcttt

30

<210> 71

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0011 Primer Allel X

<400> 71

gaaggtgacc aagttcatgc tccttcctac agaagaacga gagc

44

<210> 72

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0011 Primer Allel Y

<400> 72

gaaggtcggg gtcaacggat tccttcctac agaagaacga gagt

44

<210> 73

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0011 gemeinsamer Primer

<400> 73

ttcacgtccg cgtaggtgta tcttt

25

<210> 74

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0012 Primer Allel X

<400> 74

gaaggtgacc aagttcatgc tatagacatc agacttgctg cttattg

47

<210> 75

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0012 Primer Allel Y

<400> 75

gaaggtcggg gtcaacggat tctatagaca tcagacttgc tgcttatta

49

<210> 76

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0012 gemeinsamer Primer

<400> 76

cccggaggtc tactcaaagc aattt

25

<210> 77

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0013 Primer Allel X

<400> 77

gaaggtgacc aagttcatgc tccttccgac aaatagcaca gatca

45

<210> 78

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0013 Primer Allel Y

<400> 78

gaaggtcggg gtcaacggat tcttccgaca aatagcacag atcg

44

<210> 79

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0013 gemeinsamer Primer

<400> 79

gacacggtgt gtgccagttt gtaat

25

<210> 80

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0014 Primer Allel X

<400> 80

gaaggtgacc aagttcatgc tcaacctctg acactattag cagtgat

47

<210> 81

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0014 Primer Allel Y

<400> 81

gaaggtcgga gtcaacggat taacctctga cactattagc agtgac

46

<210> 82

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0014 gemeinsamer Primer

<400> 82

tgttctgttt ctgattctaa ggtggtctt

29

<210> 83

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0015 Primer Allel X

<400> 83

gaagtgacc aagttcatgc tacaggtatg ccttgctcat aagc

44

<210> 84

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0015 Primer Allel Y

<400> 84

gaagtcgga gtcaacggat tcacaggtat gccttgctca taaga

45

<210> 85

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0015 gemeinsamer Primer

<400> 85

catarccact gttctaggct ggtgaa

26

<210> 86

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0016 Primer Allel X

<400> 86

gaagtgacc aagttcatgc tcgagcaacc ggagataacc aca

43

<210> 87

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0016 Primer Allel Y

<400> 87

gaaggtcggg gtcaacggat tgagcaaccg gagataacca cg

42

<210> 88

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0016 gemeinsamer Primer

<400> 88

tttcggtaac ttgagacctc taattctttt

30

<210> 89

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0017 Primer Allel X

<400> 89

gaaggtgacc aagttcatgc tcccaaacac gtcgcacg

38

<210> 90

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0017 Primer Allel Y

<400> 90

gaaggtcggg gtcaacggat tatgctccca aacacgtcgc aca

43

<210> 91

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0017 gemeinsamer Primer

<400> 91

cgcccgtcac ctaacaacag caa

23

<210> 92

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0018 Primer Allel X

<400> 92

gaaggtgacc aagttcatgc tattctagag tatagatgtc taaacaaacc

50

<210> 93

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0018 Primer Allel Y

<400> 93

gaaggtcgga gtcaacggat tctagagtat agatgtctaa acaaact

47

<210> 94

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0018 gemeinsamer Primer

<400> 94

cgacgggtga cgagtgacga tt

22

<210> 95

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0019 Primer Allel X

<400> 95

gaaggtgacc aagttcatgc tataaatatc tactcggcgc caatac

46

<210> 96

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0019 Primer Allel Y

<400> 96

gaaggtcggg gtcaacggat tataaatatc tactcggcgc caatag

46

<210> 97

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0019 gemeinsamer Primer

<400> 97

ygagatctag gtgtcatctt ctagtca

27

<210> 98

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0020 Primer Allel X

<400> 98

gaaggtgacc aagttcatgc ttgcccagca tctctctgct cc

42

<210> 99

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0020 Primer Allel Y

<400> 99

gaaggtcggg gtcaacggat taatcttgcc agcatctctc tgctca

46

<210> 100

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0020 gemeinsamer Primer

<400> 100

gtgaatcggg gaccaaggat tgctt

25

<210> 101

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108095998 Primer Allel X

<400> 101

gaaggtgacc aagttcatgc ttcaacaag caagaggagc agcat

45

<210> 102

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108095998 Primer Allel Y

<400> 102

gaaggtcggg gtcaacggat tcaacaagc aagaggagca gcag

44

<210> 103

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108095998 gemeinsamer Primer

<400> 103

ttgtctcggg tgtaggtcg ccaat

25

<210> 104

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108096011 Primer Allel X

<400> 104

gaagtgacc aagttcatgc tccactaatg cagagatgga gacta

45

<210> 105

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108096011 Primer Allel Y

<400> 105

gaagtcgga gtcaacggat tcactaatgc agagatggag actg

44

<210> 106

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108096011 gemeinsamer Primer

<400> 106

catttacaca ctttgcaagg gcccta

26

<210> 107

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108096791 Primer Allel X

<400> 107

gaagtgacc aagttcatgc tagcacgaat cagcttccaa gagt

44

<210> 108

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108096791 Primer Allel Y

<400> 108

gaaggtcgga gtcaacggat tgcacgaatc agcttccaag agc

43

<210> 109

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108096791 gemeinsamer Primer

<400> 109

attcgaagtg cactgcattc tttgtcaaa

29

<210> 110

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108096791 Primer Allel X

<400> 110

gaagtgacc aagttcatgc tgtcaaacad ataagagggc aaagtca

47

<210> 111

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108096791 Primer Allel Y

<400> 111

gaaggtcgga gtcaacggat tgtcaaacat ataagagggc aaagtcg

47

<210> 112

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PZE-108096791 gemeinsamer Primer

<400> 112

tgttccggtc tacatdddga tgtacctct

29

<210> 113

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> bnlgl782 forward Primer

<400> 113

cgatgctccg ctaggaatag

20

<210> 114

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> bnlg1782 reverse Primer

<400> 114

tgtgttggaa attgacccaa

20

<210> 115

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> umc1960 forward Primer

<400> 115

ctgctggact acatggtgga ctt

23

<210> 116

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> umc1960 reverse Primer

<400> 116

gagctgtagc acccccaaaa c

21

<210> 117

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> bnlg240 forward Primer

<400> 117

aagaacagaa ggcatgata cataa

25

<210> 118

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> bnlg240 reverse Primer

<400> 118

tgacagtgta tggcagcta

20

<210> 119

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> umc1121 forward Primer

<400> 119

aaaacgacat gtcacgtct tcaa

24

<210> 120

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> umc1121 forward Primer

<400> 120

ggggtcaggt acagggctag tagt

24

<210> 121

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> bnlg1067 forward Primer

<400> 121

ggcttgcttt tgcttcactt

20

<210> 122

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> bnlg1067 reverse Primer

<400> 122

ctcatcccat tcgttccact

20

<210> 123

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> umc1287 forward Primer

<400> 123

tgtaaaacga cggccagtat gggatgatca gtcgtttcag tc

42

<210> 124

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> umc1287 reverse Primer

<400> 124

aacgcacttc ttgtagctgt aggg

24

<210> 125

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_2F Primer

<400> 125

actcgcttgt ctgtgtcacg

20

<210> 126

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_2R Primer

<400> 126

cttgtcgatt ctccgatctc a

21

<210> 127

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_4F Primer

<400> 127

cttccagacc gacgtgagat

20

<210> 128

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_4R Primer

<400> 128

aatactatgc aaggtcggcg

20

<210> 129

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_5F Primer

<400> 129

ggcattatta gctaggcgca

20

<210> 130

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_5R Primer

<400> 130

ttgggaaact caggttctgc

20

<210> 131

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_17F Primer

<400> 131

tgtaccccag ctacgacgtt

20

<210> 132

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_17R Primer

<400> 132

aaccttcacg caaagaatcg

20

<210> 133

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_16F Primer

<400> 133

aaacatatgc gtgatcggct

20

<210> 134

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_16R Primer

<400> 134

atggctcggt tcttcaggtg

20

<210> 135

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_25F Primer

<400> 135

ttggaccaaa cactatcgat cc

22

<210> 136

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_25R Primer

<400> 136

cgttggcaaa acctaggaat c

21

<210> 137

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_22F Primer

<400> 137

actggaactg caggaaggtg

20

<210> 138

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_22R Primer

<400> 138

gacgtttaac cggcagtcag

20

<210> 139

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_34F Primer

<400> 139

tgaattgcaa gcccacacta

20

<210> 140

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_34R Primer

<400> 140

cctggtttgc tgctcttcat

20

<210> 141

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_35F Primer

<400> 141

ccaaatgaac acgaacacca

20

<210> 142

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_35R Primer

<400> 142

ggcgtggtga ctttttgtct

20

<210> 143

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_38F Primer

<400> 143

cccaagatga agatccgatg

20

<210> 144

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_38R Primer

<400> 144

caaaccaaag aactcgagcg

20

<210> 145

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_37F Primer

<400> 145

gtaatggggc agatgtttgg

20

<210> 146

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_37R Primer

<400> 146

gcgactcttc gctacacacc

20

<210> 147

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_41F Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 147

nnccctggt catgtaactt caat

24

<210> 148

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_41R Primer

<400> 148

tgcacacgat aaggacatgc

20

<210> 149

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_41F Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 149

nnnccctggt catgtaactt caat

24

<210> 150

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_41R Primer

<400> 150

tgcacacgat aaggacatgc

20

<210> 151

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_46F Primer

<400> 151

tcaagagaac tctgggtggc

20

<210> 152

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_46r Primer

<400> 152

ggccaacaat gacgagagtc

20

<210> 153

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_180F Primer

<400> 153

gggaggggttg ttctggtttt

20

<210> 154

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_180R2 Primer

<400> 154

ggtccttgtc aatgtcaccc

20

<210> 155

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_48F Primer

<400> 155

atgaccccc gttggttatct

20

<210> 156

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_48R Primer

<400> 156

gcctgcagac aaattcctgt

20

<210> 157

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_48F Primer

<400> 157

atgaccccc gttggtatct

20

<210> 158

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_48R Primer

<400> 158

gcctgcagac aaattcctgt

20

<210> 159

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_56F Primer

<400> 159

cctgtcatgg tgggaacaat

20

<210> 160

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_56R Primer

<400> 160

ctcatcagcg aagcgaaaaa

20

<210> 161

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_51F Primer

<400> 161

accctctcct tgctattggc

20

<210> 162

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_51R Primer

<400> 162

ctccagctct tcgttcgttc

20

<210> 163

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_199F Primer

<400> 163

gcaggctgga caaaagtgtt

20

<210> 164

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_199R Primer

<400> 164

ttctttttgc ggcctatctg

20

<210> 165

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_63F Primer

<400> 165

atttgcttgg cgtaatcctg

20

<210> 166

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_63R Primer

<400> 166

cagccgtggt tttctttgct

20

<210> 167

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_208F Primer

<400> 167

cgcacggatc aagaagagtt

20

<210> 168

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_208R Primer

<400> 168

caatcgccat gcatactttg

20

<210> 169

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_206F Primer

<400> 169

atggtacaag tgtcgatccc tc

22

<210> 170

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_206R Primer

<400> 170

aatgaatcga tgtcgctggt

20

<210> 171

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_86F Primer

<400> 171

cacaactaaa gaggaaaccg ga

22

<210> 172

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_86R Primer

<400> 172

ggctgacggg ctagtcttcg

20

<210> 173

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_79F Primer

<400> 173

aaccaaattg ggtcttagcc

20

<210> 174

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_79R Primer

<400> 174

atccgccact ggtcaaaata

20

<210> 175

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_278F Primer

<400> 175

catcgcaaca tcagcaacat

20

<210> 176

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_278R Primer

<400> 176

acgtttgttc cttcatcca

20

<210> 177

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579zmpm0_209F Primer

<400> 177

ctgtgcttct ggtgctgaaa

20

<210> 178

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579zmpm0_209R Primer

<400> 178

ctttcccgcc tgtaaatgaa

20

<210> 179

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579zmpm0_86F Primer

<400> 179

cacaactaaa gaggaaccg ga

22

<210> 180

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579zmpm0_86F

<400> 180

cacaactaaa gaggaaccg ga

22

<210> 181

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579zmpm0_87F Primer

<400> 181

ctcaccac cctaccctat

20

<210> 182

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579zmpm0_87R Primer

<400> 182

ggggagctgt tgaaggaaat

20

<210> 183

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579zmpm0_91F Primer

<400> 183

acgtcgatct gcttgctacc

20

<210> 184

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579zmpm0_91R Primer

<400> 184

gagacctagc gatccaacga

20

<210> 185

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579zmpm0_216F Primer

<400> 185

ctccatagtg tttcggcctt t

21

<210> 186

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579zmpm0_216R Primer

<400> 186

gccctcagga cttaccgact

20

<210> 187

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_95F Primer

<400> 187

gtcactatac ggagacggcg

20

<210> 188

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_95R Primer

<400> 188

ctcggccttc aatttgat

20

<210> 189

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_99F Primer

<400> 189

agagcaacat gccttgaacc

20

<210> 190

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_99R Primer

<400> 190

gttttgatcc cgaagccttt

20

<210> 191

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_244F Primer

<400> 191

attcaatgga cacgcaaca t

21

<210> 192

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_244R Primer

<400> 192

tgtggtgggg attttagtgg

20

<210> 193

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_241F Primer

<400> 193

cattcgaaaa tctggccact

20

<210> 194

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_241R Primer

<400> 194

gccaatggaa tggagaacag

20

<210> 195

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_109F Primer

<400> 195

gagcaaatca gatgcagcaa

20

<210> 196

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_109R Primer

<400> 196

tgatgatggt ctggtgccag

20

<210> 197

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_109F Primer

<400> 197

gagcaaatca gatgcagcaa

20

<210> 198

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_109R Primer

<400> 198

tgatgatggg ctggtgccag

20

<210> 199

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_247F Primer

<400> 199

tgcaaccata tggatgatggg

20

<210> 200

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_247R Primer

<400> 200

cagcttgaga caaacgctga

20

<210> 201

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_112F Primer

<400> 201

tgaaaaccct acctgaagcg

20

<210> 202

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_112R Primer

<400> 202

actgactga tccggacttc

20

<210> 203

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_125F Primer

<400> 203

tcgaggctaa catggtctct g

21

<210> 204

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_125R

<400> 204

catacacttc atgtcgtccc g

21

<210> 205

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_253F Primer

<400> 205

ggccgggacg tactagtgta

20

<210> 206

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_253R Primer

<400> 206

tggttgatcat catttgac

20

<210> 207

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_125F Primer

<400> 207

tcgaggctaa catggtctct g

21

<210> 208

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_125R Primer

<400> 208

catacacttc atgctgtccc g

21

<210> 209

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_128F Primer

<400> 209

gctcaaggcg atacatgctt

20

<210> 210

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_128F

<400> 210

gctcaaggcg atacatgctt

20

<210> 211

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_136F Primer

<400> 211

ggcttgactg taatgg

16

<210> 212

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_136R Primer

<400> 212

tttctgctca cacttcggtg

20

<210> 213

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_131F Primer

<400> 213

tcaagcaaac gagactcttc ttgta

25

<210> 214

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_131R Primer

<400> 214

tagccatgga cagatcgaca

20

<210> 215

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_137F Primer

<400> 215

cggaccttgt actccgtcac

20

<210> 216

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_137R Primer

<400> 216

agaatgtgga ggctacggtg

20

<210> 217

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_138F Primer

<400> 217

tgaaatttag gacttgcccg

20

<210> 218

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_138R Primer

<400> 218

acatctgaac accgcattga

20

<210> 219

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_147F Primer

<400> 219

cttgtgtcc cactccactt

20

<210> 220

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_147R Primer

<400> 220

ttactttcca tggcctccaa

20

<210> 221

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_145F Primer

<400> 221

tgtgctcggg tattgacgta

20

<210> 222

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_145R Primer

<400> 222

ccgtcaactt cctcccctat

20

<210> 223

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_262F Primer

<400> 223

ttgctggctt gttatcctcc

20

<210> 224

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_262R Primer

<400> 224

ccctgctcgtt caaggaaaa

20

<210> 225

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_161F Primer

<400> 225

taggtaacag aattgcgggc

20

<210> 226

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_161R Primer

<400> 226

tttctaaggc atgggagtgc

20

<210> 227

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_265F Primer

<400> 227

catttcatgg catatgagcg

20

<210> 228

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 579ZMPM0_265R Primer

<400> 228

ctaaaggccc tgttcccagt

20

<210> 229

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZNF1_GH034_F_Primer

<400> 229

tggttggtgt cgaagctgag

20

<210> 230

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZNF1_GH033_R_Primer

<400> 230

atttatccccg gcctttgcat

20

<210> 231

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HYD_GH039_F_Primer

<400> 231

gatctacagg gaagcccact ga

22

<210> 232

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HYD_GH040_R_Primer

<400> 232

tttttccttg aggcagttat atgct

25

<210> 233

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RLK4_GH220_F_Primer

<400> 233

ttgtgcagcg gagggaa

17

<210> 234

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RLK4_GH221_R_Primer

<400> 234

ccagggcacc agcaagaat

19

<210> 235

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EXT1_GH168_F_Primer

<400> 235

cgactacaag acgcgtacc

19

<210> 236

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EXT1_GH170_R_Primer

<400> 236

ggtgtcgatg gtgaggttc

19

<210> 237

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RLK1_GH138_F_Primer

<400> 237

tattgttggt gctgttgccg

20

<210> 238

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RLK1_GH139_R_Primer

<400> 238

ggactcaatc cttgtccctg

20

<210> 239

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RET1_GH055_F_Primer

<400> 239

cgctcgtttg ccagatagcc

20

<210> 240

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RET1_GH056_R_Primer

<400> 240

cacggtgtgt gccagtttgt

20

<210> 241

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0021 Primer Allel X

<400> 241

gaaggtgacc aagttcatgc tgagctcatc tcgtccaagc cc

42

<210> 242

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0021 Primer Allel Y

<400> 242

gaaggtcgga gtcaacggat tgagctcatc tcgtccaagc cg

42

<210> 243

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0021 gemeinsamer Primer

<400> 243

cgctgcggtg ccgggtgat

19

<210> 244

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0022 Primer Allel X

<400> 244

gaaggtgacc aagttcatgc tcaccaacac aatagtcgtc caaatgt

47

<210> 245

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0022 Primer Allel Y

<400> 245

gaaggtcgga gtcaacggat taccaacaca atagtcgtcc aatgc

46

<210> 246

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA0022 gemeinsamer Primer

<400> 246

cagccaatat ttccctcagt ggctt

25

<210> 247

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA04916-6f Primer

<400> 247

tgtttcagga atcacgcaac tgga

24

<210> 248

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MA04916-6r Primer

<400> 248

gcaccagcc atgaccaaca tc

22

<210> 249

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TG10013-10.f Primer

<400> 249

cttcctacag aagaacgaga gt

22

<210> 250

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TG10013-11.r Primer

<400> 250

ttcctcacga gctctgtggt c

21

Формула изобретения

1. Растение кукурузы, в геном которого интегрирован фрагмент хромосомы донорного сорта Pepitilla, характеризующееся тем, что фрагмент хромосомы содержит интервал донора, проявляющий донорные аллели в соответствии с гаплотипом, представленным в Таблице 2, и проявляет полинуклеотид, придающий устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы, при этом данный фрагмент хромосомы
 - a) не содержит интервал донора между маркером в первом маркерном участке, который фланкирован маркерами SYN14136 и PZE-108076510, и маркером во втором маркерном участке, который фланкирован маркерами SYN24931 и PZE-108077560, и/или
 - b) не содержит интервал донора между маркером в третьем маркерном участке, который фланкирован маркерами PZE-108093423 и PZE-108093748, и маркером в четвертом маркерном участке, который фланкирован маркерами MA0004 и MA0005, и/или
 - c) не содержит интервал донора между маркером в пятом маркерном участке, который фланкирован маркерами MA0006 и PZE-108097482, и маркером в шестом маркерном участке, который фланкирован маркерами PZE-108107671 и SYN4196.
2. Растение кукурузы по п. 1, отличающееся тем, что фрагмент хромосомы также не содержит интервал донора между маркером во втором маркерном участке и маркером в третьем маркерном участке.
3. Растение кукурузы по п. 1, отличающееся тем, что период цветения растения кукурузы и/или урожайность растения кукурузы на силос соответствует периоду цветения и/или урожайности сравниваемого растения кукурузы, в геном которого не был встроено фрагмент хромосомы донорного сорта Pepitilla.
4. Растение кукурузы по одному из пп. 1-3, отличающееся тем, что полинуклеотид содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая:
 - a) включает нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 15,
 - b) включает нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична любой одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 15, предпочтительно по всей ее длине,
 - c) гибридизуется с комплементарной цепью молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с (a) или (b) в жестких условиях,
 - d) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 или 16,

- e) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична любой одной из аминокислотных последовательностей в соответствии с (d), или
 - f) включает часть последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с (a) - (e).
5. Клетки, ткани или части растения кукурузы по любому из пп. 1-4.
 6. Зерна или семена растения кукурузы по любому из пп. 1-4.
 7. Способ идентификации растения кукурузы, устойчивого к *Helminthosporium turcicum*, геном которого содержит интегрированный в него фрагмент хромосомы донорного сорта Pepitilla, состоящий из детекции по меньшей мере двух аллелей в геноме растения, характеризующийся тем, что по меньшей мере один аллель локализован в геномном сегменте, который фланкирован маркером в первом маркерном участке, втором маркерном участке, третьем маркерном участке или четвертом маркерном участке и полинуклеотидом, который придает устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы, и по меньшей мере один аллель локализован в геномном сегменте, который фланкирован полинуклеотидом и маркером в шестом маркерном участке или пятом маркерном участке.
 8. Способ повышения урожайности растения кукурузы, устойчивого к *H. turcicum*, геном которого содержит интегрированный в него фрагмент хромосомы донорного сорта Pepitilla, характеризующийся тем, что фрагмент хромосомы содержит интервал донора, проявляющий донорные аллели в соответствии с гаплотипом, представленным в Таблице 2, и содержит полинуклеотид, придающий устойчивость к *Helminthosporium turcicum* растению кукурузы, при этом способ включает этапы удаления
 - a) интервала донора между маркером в первом маркерном участке, который фланкирован маркерами SYN14136 и PZE-108076510, и маркером во втором маркерном участке, который фланкирован маркерами SYN24931 и PZE-108077560, и/или
 - b) интервала донора между маркером в третьем маркерном участке, который фланкирован маркерами PZE-108093423 и PZE-108093748, и маркером в четвертом маркерном участке, который фланкирован маркерами MA0004 и MA0005, и/или
 - c) интервала донора между маркером в пятом маркерном участке, который фланкирован маркерами MA0006 и PZE-108097482, и маркером в шестом маркерном участке, который фланкирован маркерами PZE-108107671 и SYN4196.
 9. Олигонуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, которая имеет нуклеотидную последовательность, выбираемую из любой одной из SEQ ID NO: 41-49, 53-100 или 229-250.

10. Использование олигонуклеотида, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, которая имеет нуклеотидную последовательность, выбираемую из любой одной из SEQ ID NO: 17-250, для идентификации растения кукурузы, устойчивого к *Helminthosporium turcicum*.
11. Полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, которая
- a) включает нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 15,
 - b) включает нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична любой одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 или 15, предпочтительно по всей ее длине,
 - c) гибридизуется с комплементарной цепью молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с (a) или (b) в жестких условиях,
 - d) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 или 16, или
 - e) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична любой одной из аминокислотных последовательностей в соответствии с (d).
12. Вектор или мобильный генетический элемент, содержащий полинуклеотид по п. 11.
13. Трансгенная клетка растения, содержащая полинуклеотид по п. 11 в качестве трансгена, либо вектор или мобильный генетический элемент по п. 12.
14. Трансгенное растение, содержащее полинуклеотид по п. 11 в качестве трансгена, либо вектор или мобильный генетический элемент по п. 12, либо клетку растения по п. 13.
15. Зерна или семена растения по п. 14, характеризующиеся тем, что эти зерна или семена содержат полинуклеотид по п. 11 в качестве трансгена.

Рис. 1

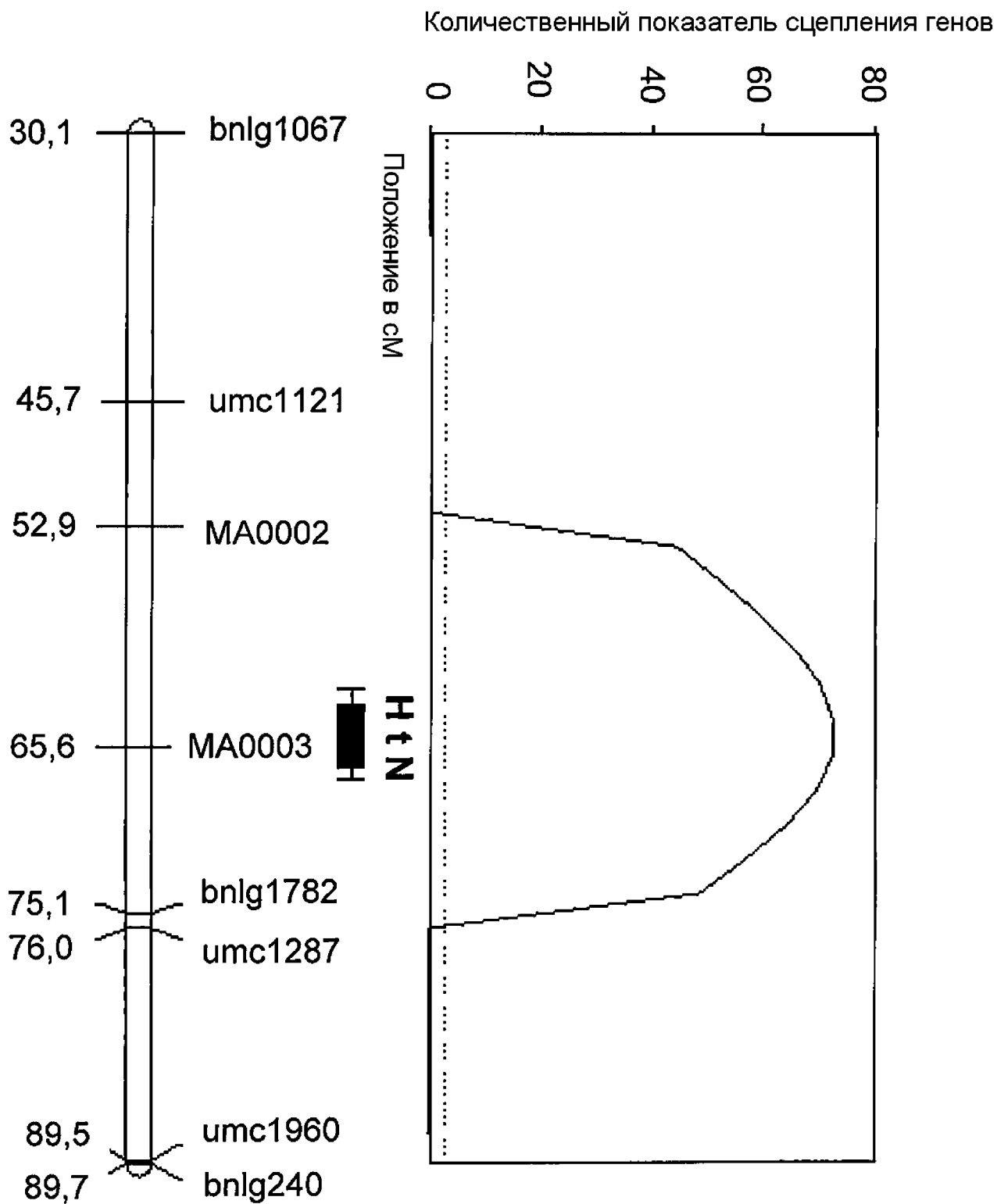
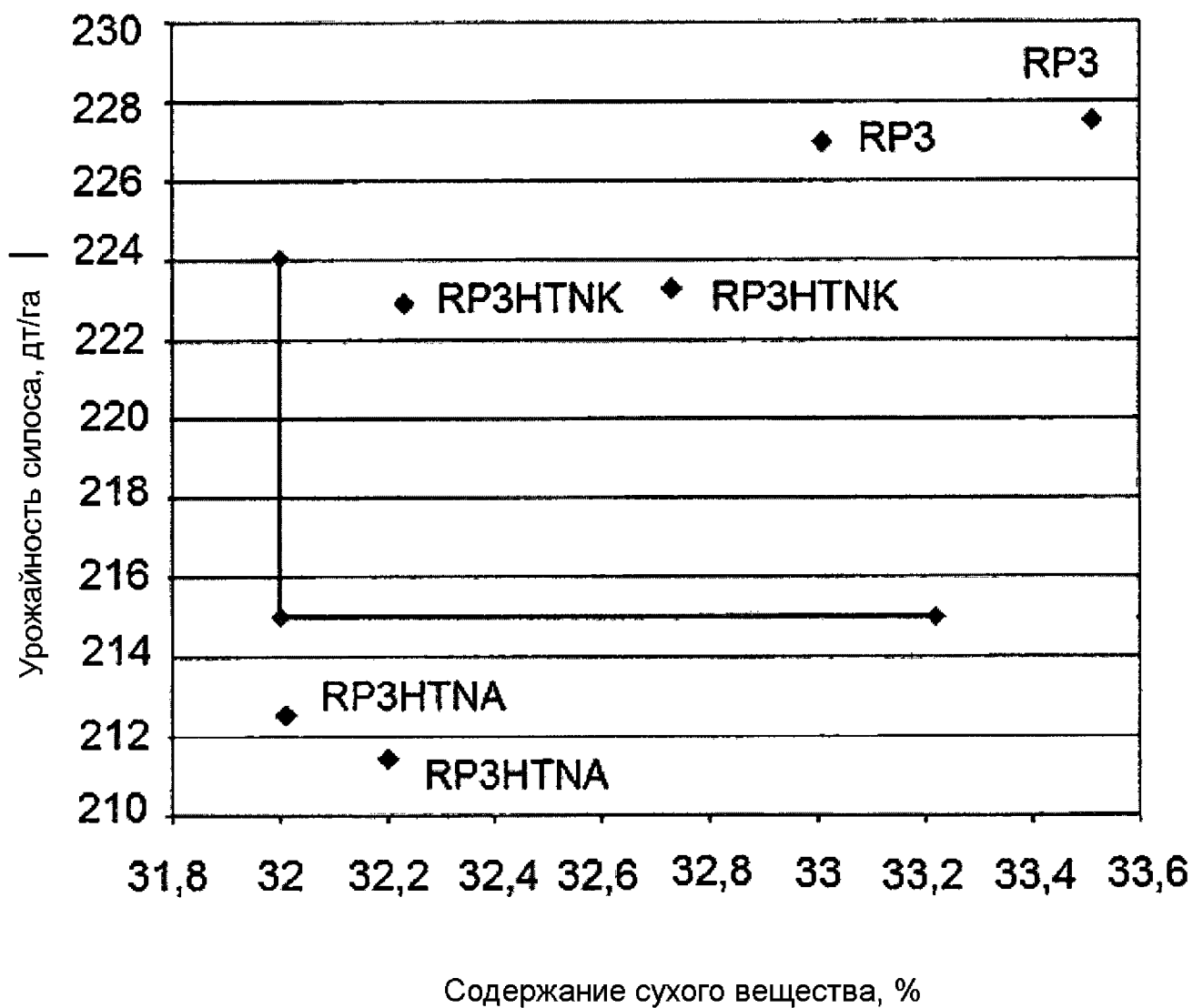


Рис. 2



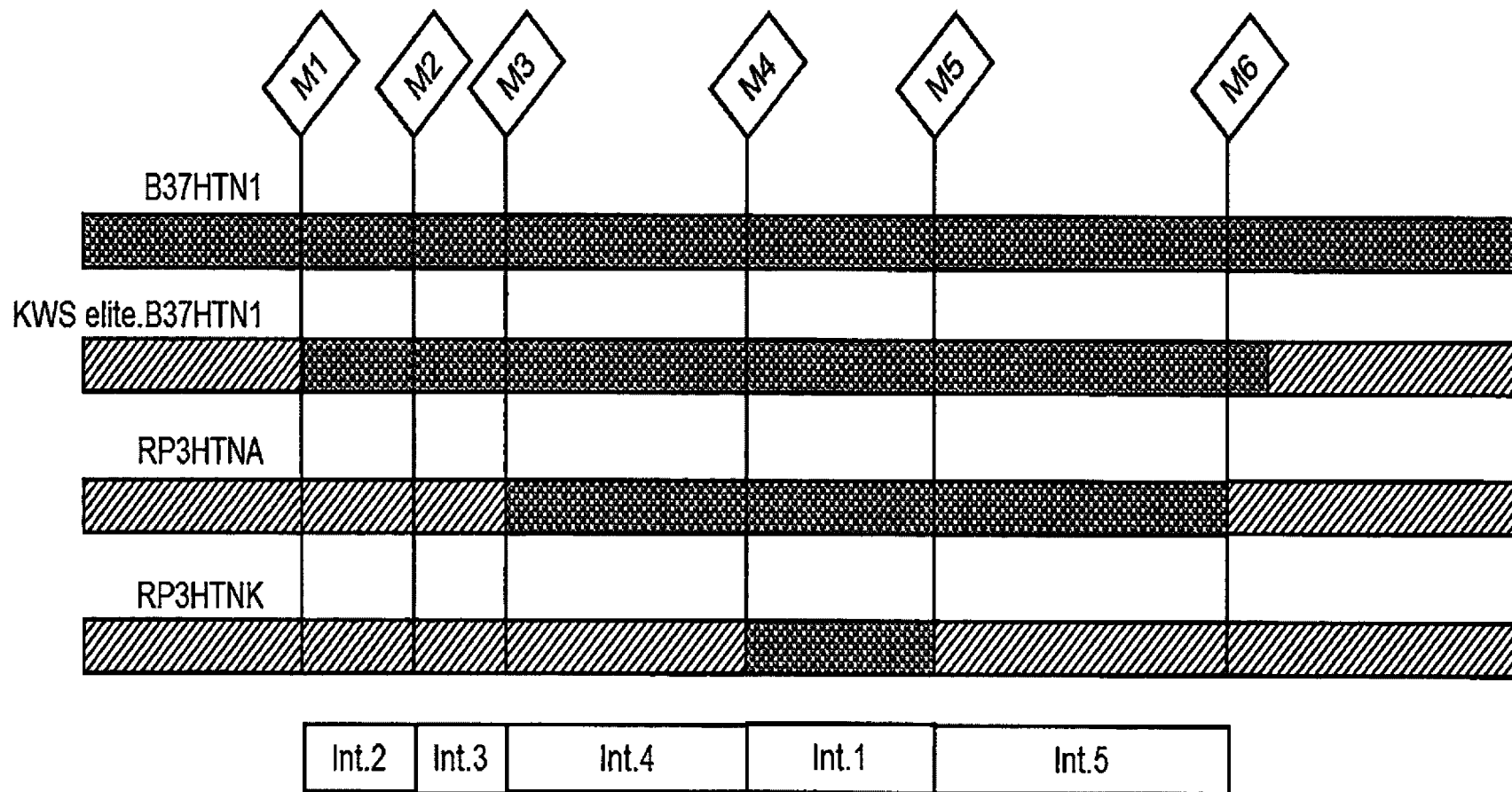


FIG. 3

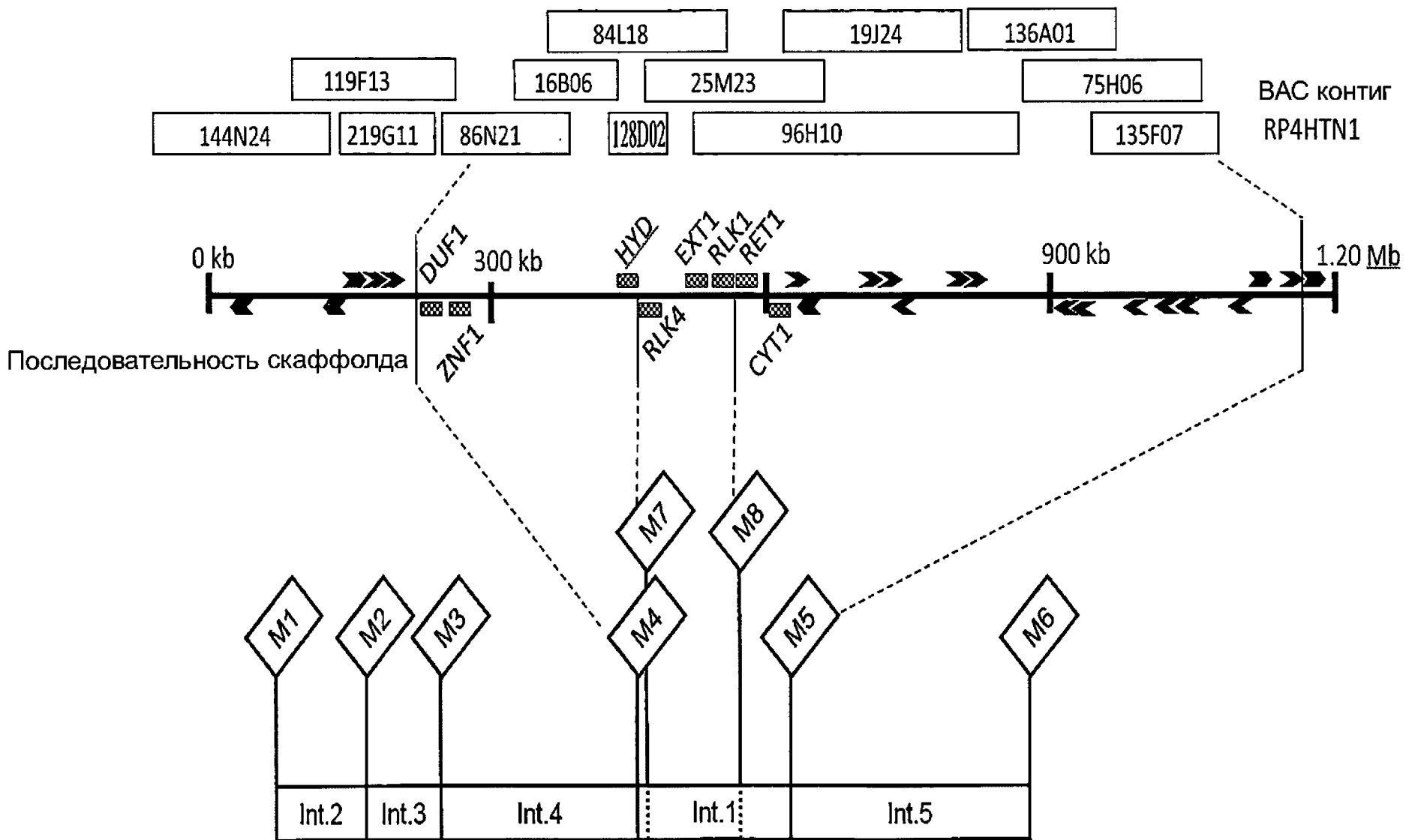


Рис. 4