

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047274**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.06.26

(21) Номер заявки
202092499

(22) Дата подачи заявки
2019.04.24

(51) Int. Cl. *A01H 1/04* (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
C12N 9/14 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(54) **РАСТЕНИЯ С УЛУЧШЕННОЙ ПЕРЕВАРИВАЕМОСТЬЮ И МАРКЕРНЫМИ
ГАПЛОТИПАМИ**

(31) **18169122.1**

(32) **2018.04.24**

(33) **EP**

(43) **2020.12.25**

(86) **PCT/EP2019/060411**

(87) **WO 2019/206927 2019.10.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КВС ЗААТ СЕ & КО. КГАА (DE)

(72) Изобретатель:
**Клойбер-Майц Моника, Больдуан
Терезе, Оуцунова Милена, Мейер
Нина, Лопец-Дуран Каролина (DE)**

(74) Представитель:
Зуйков С.А. (RU)

(56) **WO-A1-2010054191**
MAURICE BOSCH ET AL. "Identification of genes involved in cell wall biogenesis in grasses by differential gene expression profiling of elongating and non-elongating maize internodes", *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY*, vol. 62, no. 10, 14 March 2011 (2011-03-14), pages 3545-3561, XP055498299, GB ISSN: 0022-0957, DOI: 10.1093/jxb/err045, page 3553, column 1, paragraph 1 – page 3554, column 2, paragraph 1; table 4

RIBOULET C. ET AL. "QTL mapping and candidate gene research from lignin content and cell wall digestibility in a top-cross of a flint maize recombinant inbred line progeny harvested at silage stage", *MAYD, ISTITUTO SPERIMENTALE PER LA CEREALICOLTURA, BERGAMO, IT*, vol. 53, no. 1, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 1-9, XP009131360, ISSN: 0025-6153 page 6, column 1, paragraph 2 – page 7, column 1, paragraph 2; figure 1

BARRIERE YVES ET AL. "Genetic variation and breeding strategies for improved cell wall digestibility in annual forage crops. A review", *ANIMAL RESE, EDP SCIENCES, LES ULIS, FR*, vol. 52, no. 3, 1 May 2003 (2003-05-01), pages 193-228, XP009131402, ISSN: 1627-3583, DOI: 10.1051/ANIMRES:2003018, page 195, column 2, paragraph 2

GUILLAUMIE SABINE ET AL. "MAIZEWALL. Database and developmental gene expression profiling of cell wall biosynthesis and assembly in maize", *PLANT PHYSIO, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, USA*, vol. 143, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 339-363, XP009131349, ISSN: 0032-0889, DOI: 10.1104/PP.106.086405, [retrieved on 2006-11-10], page 341, column 1, paragraph 1 page 356, column 1, paragraph 2 – page 359, column 2, paragraph 2; table II

(57) Изобретение относится к растениям, таким как кукуруза, сорго или сахарный тростник, обладающим улучшенной перевариваемостью, в частности улучшенной перевариваемостью стерни. Изобретение относится к аллелю QTL, ассоциированному с улучшенной перевариваемостью, и к специфическим маркерным аллелям, ассоциированным с аллелем QTL. Изобретение также относится к таким растениям, у которых ген F35H мутирован или у которых экспрессия F35H изменена. Изобретение также относится к способам идентификации растений, обладающих повышенной перевариваемостью, и к способам получения таких растений.

047274 B1

047274 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к локусам количественных признаков (QTL) и к маркерам, ассоциированным с ними, участвующим и/или ассоциированным с улучшенной перевариваемостью растений и частей растений, таких как кукуруза. Изобретение также относится к использованию таких QTL или маркеров для целей идентификации и/или выбора, а также для трансгенных или нетрансгенных растений.

Предпосылки создания изобретения

Кукуруза (*Zea mays* L.) является самой важной однолетней кормовой культурой в мире. Ежегодно силосуют более 3 миллионов гектаров кукурузы, главным образом в Северной Европе. Благодаря высокому содержанию энергии и эффективности конверсии кормов, кормовая кукуруза является важной продовольственной сельскохозяйственной культурой для молочного и мясного скота и оказывает значительное влияние на производство молока и мяса. Характеристики корма, с точки зрения как растения кукурузы в целом, так и стерни, имеют широкий спектр генетической вариации (Гейгер и др. 1992; Баррьер и др. 2003).

Поэтому, улучшение перевариваемости является главной целью программ селекции кормовой кукурузы. Энергия, поступающая с кормом в рацион жвачных или травоядных животных, связана с усвояемостью и перевариваемостью корма. Перевариваемость любого компонента корма (сухого вещества, органического вещества или клеточной стенки) измеряется в процентном содержании силоса, усвоенного в пищеварительном тракте животного (Баррьер и др. 2003). На общую перевариваемость кормовой кукурузы оказывает влияние легкоперевариваемые фракции зерна и стерни. Композиция стерни и ее перевариваемость ограничивают качество кормовой кукурузы. Основными фракциями стерни являются гемицеллюлозы, целлюлоза и лигнины. Современные сорта кормовой кукурузы сочетают высокую продуктивность сухого вещества с высокой перевариваемостью стерни.

Проведение измерений перевариваемости у животных, особенно при проведении крупномасштабной оценки зародышевой плазмы в программах селекции растений, обходится слишком дорого. Для проведения количественного анализа перевариваемости кукурузы и других кормовых культур были разработаны биологические и химические методы (Ван Соест и др. 1963). Нейтрально-детергентная клетчатка (NDF), представляющая собой остаток после удаления растворимого содержимого клеток, является важным индикатором клеточной стенки растений и целлюлозы. Перевариваемость NDF кормов в условиях *in vitro* (IVNDFD) - это оценка перевариваемости клеточных стенок, исходя из предположения, что часть растительного материала, не содержащаяся NDF, была полностью переварена (Мешин и др. 2000). Кроме того, сообщалось, что использование ближней инфракрасной спектроскопии (NIRS) позволяет точно измерить признаки перевариваемости у многих кормовых культур, включая кукурузу (Любберштедт и др. 1997a, b; Циммер и др. 1990).

Любберштедт и др. (1997a, b) впервые опубликовали информацию о QTL, относящихся к агрономическим и качественным признакам у кормовой кукурузы, а также о QTL, относящихся к перевариваемости целого растения. Использование доступной генетической вариации для перевариваемости стерни посредством маркерной селекции (MAS) представляется перспективным способом улучшения перевариваемости корма. Помимо генетической вариации, причиной этих изменчивых признаков могут быть изменения под влиянием окружающей среды. QTL-анализы признаков у кормовых культур в четырех различных популяциях кукурузы выявили лишь несколько QTL, демонстрирующих эпистатические взаимодействия или взаимодействия с окружающей средой (Любберштедт и др. 1998). Были определены семь QTL для перевариваемой нейтрально-детергентной клетчатки (DNDF), посредством использования популяций 242 RIL, полученных из кросса F838 × F286, которые были оценены в экспериментах по оценке *per se* в шести разных условиях окружающей среды, и были обнаружены два основных QTL (Баррьер и др. 2010). Были проведены дополнительные QTL-анализы, посредством использованием потомства RIL, полученного из кросса между старой линией зубовидной кукурузы и новой линией Iodent, и впервые были зарегистрированы новые QTL в парах оснований 2.06 и 5.04 для ADL/NDF и DNDF (Баррьер и др. 2012).

Поэтому целью настоящего изобретения является устранение, по меньшей мере, одного недостатка предшествующего уровня техники. Существует постоянная потребность в улучшении перевариваемости кормовых культур, а также в идентификации растений, в том числе отдельных частей растений или их производных, обладающих повышенной перевариваемостью. В частности, целью настоящего изобретения является предложение новых основных QTL для перевариваемости и причинного гена(ов), а также предложение маркеров, которые позволяют экономно использовать эти QTL в развитии и селекции кукурузы.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение основано на идентификации основного QTL для перевариваемости растений, а также на идентификации гена F35H, сцепленного с QTL и ответственного за QTL для перевариваемости растений, и на описании уникального маркерного гаплотипа для улучшенной перевариваемости.

Были идентифицированы молекулярные маркеры, ассоциированные с перевариваемостью растений, и были описаны маркерные аллели, ассоциированные с улучшенной перевариваемостью. Одним из опи-

санных маркерных аллелей является мутированный ген F35H.

Настоящее изобретение, в частности, относится к способам определения идентифицированного аллеля QTL, ассоциированного с улучшенной перевариваемостью, а также к определению любого из описанных маркерных аллелей. Настоящее изобретение также относится к описанным маркерным аллелям и полинуклеиновым кислотам, подходящим для определения маркерных аллелей, таких как праймеры и зонды, и к содержащим их наборам. Настоящее изобретение также относится к способам улучшения перевариваемости растений, в частности, путем естественного или искусственного введения в растения и/или путем выбора растений, содержащих описанные в настоящем документе маркерные аллели, таким как, в частности, индуцирование мутаций F35H, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутаций, изменяющих экспрессию F35H или ферментативную активность F35H, например, уменьшающих или элиминирующих экспрессию F35H, или активность F35H, или иным образом уменьшающих экспрессию F35H, или активность F35H, или повышающих активность F35H. Настоящее изобретение также относится к растениям, обладающим улучшенной перевариваемостью, а также к частям растений, в частности к стерне, обладающим улучшенной перевариваемостью.

Настоящее изобретение, в частности, включает любой или любую комбинацию из, по меньшей мере, одного из приведенных ниже пронумерованных пунктов [01] - [25] с любым другим пунктом и/или вариантами осуществления настоящего изобретения.

[01] Способ идентификации растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, или выбора растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, содержащий

(i) необязательно, выделение генетического материала, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - генетического материала, из, по меньшей мере, одной клетки растения или части растения;

(ii) а) скрининг на присутствие аллеля QTL, такого как аллель QTL, ассоциированный с улучшенной перевариваемостью, причем упомянутый аллель QTL содержит нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутацию, приводящую к измененной экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получению белка F35H, обладающего измененной ферментативной активностью при трансляции, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутацию, приводящую к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H (например, мутацию нокдаун или нокаут), или мутацию, приводящую к получению нефункционального белка F35H (например, усеченного белка F35H), или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или белка F35H, обладающего повышенной ферментативной активностью при трансляции, или

(ii) b) скрининг на измененную экспрессию мРНК гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), и/или белка F35H, или на белок F35H, обладающий измененной ферментативной активностью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - на уменьшенную или отсутствующую экспрессию мРНК гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), и/или белка F35H, или на нефункциональный белок F35H (например, усеченный белок F35H), или на белок F35H, обладающий уменьшенной ферментативной активностью, или на белок F35H, обладающий повышенной ферментативной активностью, или

(ii) c) скрининг на присутствие мутации, приводящей к измененной экспрессии мРНК гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), и/или белка F35H, или мутации, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутации, приводящей к получению белка F35H, обладающего измененной ферментативной активностью при трансляции, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, приводящей к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), и/или белка F35H (например, мутации нокдаун или нокаут), или мутации, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутации, приводящей к получению нефункционального белка F35H (например, усеченного белка F35H), или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или белка F35H, обладающего повышенной ферментативной активностью при трансляции;

(iii) необязательно, выбор растения или части растения, в котором присутствует QTL или мутация, или в котором изменена экспрессия мРНК F35H и/или белка, или изменена ферментативная активность F35H, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - экспрессия мРНК F35H и/или белка уменьшена или элиминирована, или ферментативная активность F35H уменьшена или повышена.

[02] Способ по пункту [01], в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, упомянутое растение представляет собой растение кукурузы, способ, содержащий скрининг на присутствие молекулярного маркерного аллеля таb1134xxx и/или, по меньшей мере, одного молекулярного маркерного аллеля, расположенного на хромосомном интервале на хромосоме 9, фланкированной маркерными аллелями таb1070s01 и та30168s02, в предпочтительном варианте осуществления настоя-

шего изобретения - маркерными аллелями ma50827s01 и ma16983s02, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma17117s01 и ma61125s01, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, по меньшей мере, один молекулярный маркерный аллель определяется полинуклеиновой кислотой, например, аллель-специфической полинуклеиновой кислотой (молекулярным маркером), подходящей для гибридизации в качестве прямого праймера и обратного праймера для локуса на хромосомном интервале, который совместно сегрегируется с улучшенной перевариваемостью.

[03] Растение или часть растения, содержащее аллель QTL, такой как аллель QTL, ассоциированный с улучшенной перевариваемостью, причем упомянутый аллель QTL содержит нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутацию, приводящую к измененной экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получению белка F35H, обладающего измененной ферментативной активностью при трансляции, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутацию, приводящую к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получению нефункционального белка F35H (например, усеченного белка F35H), или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или белка F35H, обладающего повышенной ферментативной активностью при трансляции; или растение, или часть растения, содержащее нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутацию, приводящую к измененной экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получению белка F35H, обладающего измененной ферментативной активностью при трансляции, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутацию, приводящую к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получению нефункционального белка F35H (например, усеченного белка F35H) или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или белка F35H, обладающего повышенной ферментативной активностью при трансляции; или растение или часть растения, содержащее нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), обладающее уменьшенной или отсутствующей экспрессией мРНК гена и/или белка F35H, или обладающее уменьшенной ферментативной активностью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - обладающее уменьшенной ферментативной активностью или обладающее повышенной ферментативной активностью; или растение, или часть растения, содержащее молекулу интерферирующей РНК (RNAi), такую как dsРНК, siРНК, shРНК или miРНК, направленную на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, нацеливающуюся на нее или гибридизирующуюся с ней, или содержащее полинуклеотидную последовательность, кодирующую (и экспрессирующую или способную экспрессировать) молекулу RNAi, направленную на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, нацеливающуюся на нее или гибридизирующуюся с ней; или растение, или часть растения, содержащее РНК-специфическую систему CRISPR/Cas, такую как система CRISPR/Cas13a, направленную или нацеливающуюся на нуклеотидную последовательность, кодирующую цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), или, по меньшей мере, одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую (и экспрессирующую или способную экспрессировать) упомянутую РНК-специфическую систему CRISPR/Cas.

[04] Растение или часть растения по пункту [03], в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, упомянутое растение представляет собой растение кукурузы, содержащее маркерный аллель ma61134xxx.

[05] Растение или часть растения по пункту [03] или [04], при этом, упомянутое растение содержит упомянутый аллель QTL, упомянутый маркерный аллель и/или упомянутую нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию в виде интрогрессии.

[06] Растение или часть растения по пункту [03] или [04], при этом, упомянутое растение содержит упомянутый аллель QTL, упомянутый маркерный аллель, упомянутую нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, упомянутую молекулу RNAi или упомянутую полинуклеотидную последовательность, кодирующую (и экспрессирующую или способную экспрессировать) молекулу RNAi, упомянутую РНК-специфическую систему CRISPR/Cas и/или упомянутую, по меньшей мере, одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую (и экспрессирующую или способную экспрессировать) РНК-специфическую систему CRISPR/Cas в качестве трансгена или в качестве (генно-) отредактированного эндогена.

[07] Способ улучшения перевариваемости растения или части растения, содержащий введение или интрогрессирование в геном растения или части растения

(а) нуклеотидной последовательности гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, в предпочтительном варианте осуществления настоящего

изобретения - мутацию, приводящую к измененной экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получению белка F35H, обладающего измененной ферментативной активностью при трансляции, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутацию, приводящую к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H (например, мутацию нокдаун или нокаут), или мутацию, приводящую к получению нефункционального белка F35H (например, усеченного белка F35H), или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или белка F35H, обладающего повышенной ферментативной активностью при трансляции, или

(b) аллеля QTL, такого как аллель QTL, ассоциированный с улучшенной перевариваемостью, и содержащего нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутацию, приводящую к измененной экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получению белка F35H, обладающего измененной ферментативной активностью при трансляции, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутацию, приводящую к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H (например, мутацию нокдаун или нокаут), или мутацию, приводящую к получению нефункционального белка F35H (например, усеченного белка F35H), или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или белка F35H, обладающего повышенной ферментативной активностью при трансляции.

[08] Способ улучшения перевариваемости растения или части растения, содержащий изменение экспрессии мРНК гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), и/или белка F35H, изменение ферментативной активности цитохром P450-содержащего флавоноида 3',5'-гидроксилазы (F35H), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - уменьшение, элиминирование или ингибирование экспрессии мРНК гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), и/или белка F35H, уменьшение ферментативной активности цитохром P450-содержащего флавоноида 3',5'-гидроксилазы (F35H), ингибирование белка F35H или повышение ферментативной активности цитохром P450-содержащего флавоноида 3',5'-гидроксилазы (F35H).

[09] Способ по пункту [08], содержащий

(a) введение в нуклеотидную последовательность эндогенного гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), (в геном растения или часть растения) мутации, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутации, приводящей к измененной экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутации, приводящей к получению белка F35H, обладающего измененной ферментативной активностью при трансляции, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутации, приводящей к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H (например, мутации нокдаун или нокаут), или мутации, приводящей к получению нефункционального белка F35H (например, усеченного белка F35H), или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или белка F35H, обладающего повышенной ферментативной активностью при трансляции, или

(b) введение в растение или часть растения молекулы RNAi, такой как dsРНК, siРНК, shРНК или miРНК, направленной на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, нацеливающуюся на нее или гибридирующуюся с ней, или полинуклеотидной последовательности, кодирующей (и экспрессирующей или способной экспрессировать) молекулу RNAi, направленную на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, нацеливающуюся на нее или гибридирующуюся с ней, или

(c) введение в растение или часть растения РНК-специфической системы CRISPR/Cas, такой как система CRISPR/Cas13a, направленной или нацеливающейся на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, или, по меньшей мере, одной полинуклеотидной последовательности, кодирующей (и экспрессирующей или способной экспрессировать) упомянутую РНК-специфическую систему CRISPR/Cas, или

(d) введение в растение или часть растения химического соединения или антитела, изменяющего (или способного изменять) ферментативную активность белка F35H при взаимодействии с упомянутым белком F35H, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - уменьшающего (или способного уменьшать) ферментативную активность белка F35H или ингибирующего (или способного ингибировать) ферментативную активность белка F35H, или повышающего (или способного повышать) ферментативную активность белка F35H при взаимодействии с упомянутым белком F35H.

[10] Способ продуцирования растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, содержащий

(a) введение или интрогрессирование в геном растения или часть растения нуклеотидной последовательности гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутацию, приводящую к измененной экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получе-

нию белка F35H, обладающего измененной ферментативной активностью при трансляции, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутацию, приводящую к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H (например, мутацию нокдаун или нокаут), или мутацию, приводящую к получению нефункционального белка F35H (например, усеченного белка F35H), или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или белка F35H, обладающего повышенной ферментативной активностью при трансляции, или

(b) введение или интрогрессирование в геном растения или часть растения аллеля QTL, такого как аллель QTL, ассоциированный с улучшенной перевариваемостью, и содержащего нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутацию, приводящую к измененной экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получению белка F35H, обладающего измененной ферментативной активностью при трансляции, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутацию, приводящую к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H (например, мутацию нокдаун или нокаут), или мутацию, приводящую к получению нефункционального белка F35H (например, усеченного белка F35H), или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или белка F35H, обладающего повышенной ферментативной активностью при трансляции.

(c) введение в нуклеотидную последовательность эндогенного гена, кодирующую цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), (в геном растения или часть растения) мутации, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутации, приводящей к измененной экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутации, приводящей к получению белка F35H, обладающего измененной ферментативной активностью при трансляции, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутации, приводящей к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H (например, мутации нокдаун или нокаут), или мутации, приводящей к получению нефункционального белка F35H (например, усеченного белка F35H), или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или белка F35H, обладающего повышенной ферментативной активностью при трансляции, или

(d) введение в растение или часть растения молекулы RNAi, такой как dsРНК, siРНК, shРНК или miРНК, направленной на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, нацеливающуюся на нее или гибридирующуюся с ней, или полинуклеотидной последовательности, кодирующей (и экспрессирующей или способной экспрессировать) молекулу RNAi, направленную на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, нацеливающуюся на нее или гибридирующуюся с ней, или

(e) введение в растение или часть растения РНК-специфической системы CRISPR/Cas, такой как система CRISPR/Cas13a, направленной или нацеливающейся на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, или, по меньшей мере, одной полинуклеотидной последовательности, кодирующей (и экспрессирующей или способной экспрессировать) упомянутую РНК-специфическую систему CRISPR/Cas, или

(f) введение в растение или часть растения химического соединения или антитела, изменяющего (или способного изменять) ферментативную активность белка F35H при взаимодействии с упомянутым F35H, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - уменьшающего (или способного уменьшать) ферментативную активность белка F35H или ингибирующего (или способного ингибировать) ферментативную активность белка F35H, или повышающего (или способного повышать) ферментативную активность белка F35H при взаимодействии с упомянутым белком F35H; и

(g) необязательно, регенерирование растения из части растения по любому из пунктов (a)-(e).

[11] Растение или часть растения, продуцированное способом по пункту [10].

[12] Потомство растения по любому из пунктов [03]-[06] или [11].

[13] Способ, растение или часть растения по любому из предыдущих пунктов, при этом, упомянутое растение представляет собой растение кукурузы, QTL расположен на хромосоме 9 и содержит, и/или фланкирован маркерными аллелями ma61070s01 и ma30168s02, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma50827s01 и ma16983s02, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma17117s01 и ma61125s01.

[14] Способ, растение или часть растения по любому из предыдущих пунктов, при этом

ma61134xxx представляет собой инсерцию, по меньшей мере, одного нуклеотида между положениями 134254381 и 134254382 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - инсерция, представленная в SEQ ID NO: 12; и/или

ma61070s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 121588825 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом, упомянутый нуклеотид представляет собой А или Т, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 13; и/или

ma30168s02 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 139452428

хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом, упомянутый нуклеотид представляет собой А или G, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 14; и/или

ma50827s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 127454426 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом, упомянутый нуклеотид представляет собой А или G, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 15; и/или

ma16983s02 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 137363784 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом, упомянутый нуклеотид представляет собой А или G, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 16; и/или

ma17117s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 132038900 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом, упомянутый нуклеотид представляет собой А или G, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 17; и/или

ma61125s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 135947973 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом, упомянутый нуклеотид представляет собой А или G, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 18.

[15] Способ, растение или часть растения по любому из предыдущих пунктов, при этом, нуклеотидная последовательность немутированного гена F35H содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(i) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, 4 или 7;

(ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 2, 5 или 8;

(iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 6 или 9;

(iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 или 8.

(v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, 6 или 9;

(vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и

(vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью из пунктов (i)-(vi).

[16] Способ, растение или часть растения по любому из предыдущих пунктов, при этом, мутация представляет собой мутацию сдвига рамки считывания или нонсенс мутацию, приводит к измененной экспрессии нуклеотидной последовательности или измененной ферментативной активности кодируемого белка, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - к уменьшенной или отсутствующей экспрессии нуклеотидной последовательности, или уменьшенной ферментативной активности кодируемого белка, или повышенной ферментативной активности кодируемого белка, приводит к измененной последовательности белка, кодируемого нуклеотидной последовательностью, или представляет собой инсерцию, делецию или замещение, по меньшей мере, одного нуклеотида в кодирующей области, в сигнале сплайсинга или в регуляторном элементе упомянутой нуклеотидной последовательности.

[17] Способ, растение или часть растения по любому из предыдущих пунктов, при этом, мутация представляет собой инсерцию, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - в экзон, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - инсерцию в первый экзон, по меньшей мере, одного нуклеотида, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - инсерцию со сдвигом рамки считывания, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - инсерция состоит из 187 нуклеотидов или из, примерно, 187 нуклеотидов, и/или инсерция находится между положениями 97 и 98 гена F35H, представленного нуклеотидной последовательностью в SEQ ID NO: 1. В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, мутированный ген F35H содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, мутация представляет собой замещение, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - замещение, по меньшей мере, одной нуклеиновой кислоты, приводящее к обмену, по меньшей мере, одной аминокислоты, или приводящее к превращению кодирующего аминокислоту кодона в стоп-кодон. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, мутированный ген F35H содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 или 40. Такая нуклеотидная последовательность

довательность может быть выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 или 39.

[18] Способ, растение или часть растения по любому из предыдущих пунктов, при этом, упомянутая часть растения не представляет собой материал для размножения.

[19] Способ, растение или часть растения по любому из предыдущих пунктов, при этом, упомянутая часть растения не представляет собой стерню.

[20] Способ, растение или часть растения по любому из предыдущих пунктов, при этом, упомянутое растение или часть растения происходит из кукурузы, сорго или сахарного тростника.

[21] Полинуклеиновая кислота, такая как аллель-специфическая полинуклеиновая кислота (молекулярный маркер), специфически гибридизующаяся с любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18, или с ее комплементом, или обратным комплементом.

[22] Использование полинуклеиновой кислоты по пункту [21] или полинуклеиновой кислоты, такой как аллель-специфическая полинуклеиновая кислота (молекулярный маркер), для идентификации растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, или для выбора растения, или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, по любому из пунктов [03]-[06], в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - способом по пункту [01] или [02], при этом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, полинуклеиновая кислота подходит для гибридизации в качестве прямого праймера и обратного праймера для локуса на хромосомном интервале, который совместно сегрегируется с улучшенной перевариваемостью, при этом, хромосомный интервал находится на хромосоме 9 и фланкирован маркерными аллелями ma61070s01 и ma30168s02, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma50827s01 и ma16983s02, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma17117s01 и ma61125s01.

[23] Способ продуцирования силосованного растительного материала или корма для животных, обладающего улучшенной перевариваемостью, содержащий

(a) выращивание растения по любому из пунктов [03] - [06] или [11],

(b) сбор растения или его части,

(c) необязательно, измельчение и/или дробление растения или его части, и

(d) силосование растения или его части по пункту (b) или (c), необязательно, путем добавления стимулятора, такого как бактериальный инокулянт, сахар и фермент.

[24] Силосованный растительный материал или корм для животных, продуцированный способом по пункту [23].

[25] Способ продуцирования биогаза или биоэтанола, содержащий следующие этапы:

(a) предложение растения по любому из пунктов [03]-[06] или [11], или силосованного растительного материала по пункту [24], и

(b) продуцирование биогаза или биоэтанола из растения или силосованного растительного материала.

Краткое описание фигур

Фиг. 1: DNDF (перевариваемая нейтрально-детергентная клетчатка)-эффекты QTL на хромосоме 9 кукурузы (*Zea mays*). Идентификация сильного QTL для перевариваемости на хромосоме 9. Указано процентное содержание DNDF стерни кукурузы.

Фиг. 2: Положения маркерных локусов для QTL силоса. Маркеры были обнаружены методом захвата последовательностей (SeqCapture) на основе AGPv02 и WGS (полногеномное секвенирование) линии QTL и сравнения с эталонной линией PH207.

Фиг. 3: Область тонкого генетического картирования QTL силоса, проведенного посредством молекулярных маркеров в различных рекомбинантных генотипах.

Фиг. 4: Выравнивание нуклеотидной последовательности эталонного гена F35H и мутированного гена F35H в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

Фиг. 5: Функциональная валидация посредством эксперимента по секвенированию РНК. Стрелка показывает, что инсерция экспрессирована и вызывает сдвиг рамки считывания.

Фиг. 6: Вегетационный опыт для быстрой валидации Мутантов гена F35H: Результаты перевариваемости мутантных растений и растений дикого типа для идентифицированного QTL. В среднем, мутант PH207m023a и дикий тип показали разницу, составляющую 7,3 единицы DNDF.

Подробное описание вариантов осуществления изобретения

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

В контексте настоящего документа, формы единственного числа охватывают как единственное, так и множественное число, если иное явно не следует из контекста.

В контексте настоящего документа, термины "содержащий", "содержит" и "состоящий из" являются

синонимами терминов "включающий", "включает" или "содержащий в себе", "содержит в себе" и охватывают или являются многовариантными, и не исключают использование дополнительных, перечисленных членов, элементов или этапов способов. Следует понимать, что термины "содержащий", "содержит" и "состоящий из", в контексте настоящего документа, содержат термины "состоящий из", "состоит" и "состоит из", а также термины "состоящий по существу из", "состоит по существу" и "состоит по существу из".

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

В контексте настоящего документа, термин "примерно" или "приблизительно", относящийся к измеряемому значению, такому как параметр, величина, временная длительность и тому подобное, предусматривает включение вариаций +/-20% или менее, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - +/-10% или менее, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - +/-5% или менее и в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - +/-1% или менее от указанного значения, в той мере, в какой такие вариации подходят для использования в раскрытом изобретении. Следует понимать, что значение, к которому относится обстоятельство "примерно" или "приблизительно", само также определенным образом и преимущественно раскрыто.

Хотя термин "по меньшей мере, один", такой как, по меньшей мере, один член из группы членов, ясен *per se*, посредством дальнейшего пояснения на примерах будет понятно, что этот термин включает, в частности, ссылку на любой один из упомянутых членов или на любые, по меньшей мере, два из упомянутых членов, такие как, например, любые ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 или ≥ 7 и так далее из упомянутых членов, и вплоть до всех упомянутых членов.

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

Если не дано иное определение, все термины, раскрытые в настоящем документе, включая технические и научные термины, имеют значения, которые, как правило, понятны специалисту средней квалификации в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Посредством дополнительных разъяснений, включены определения терминов для того, чтобы лучше понять идею настоящего изобретения.

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

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

Ссылка, приводимая на протяжении всего данного описания на "один вариант осуществления настоящего изобретения" или "вариант осуществления настоящего изобретения" означает, что особый признак, структура или характеристика, описанные в связи с этим вариантом осуществления настоящего изобретения, включена, по меньшей мере, в один вариант осуществления настоящего изобретения. Таким образом, выражения "в одном варианте осуществления настоящего изобретения" или "в варианте осуществления настоящего изобретения", присутствующие в различных местах настоящего описания, необязательно все относятся к одному и тому же варианту осуществления настоящего изобретения, однако это может иметь место. Кроме того, особые признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим образом, как это было бы очевидно из настоящего изобретения специалисту в данной области техники, по меньшей мере, в одном варианте осуществления настоящего изобретения. Кроме того, хотя некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, включают некоторые, но не другие признаки, включенные в другие варианты осуществления настоящего изобретения, предполагается, что комбинации признаков различных вариантов осуществления настоящего изобретения находятся в пределах объема настоящего изобретения и образуют различные варианты его осуществления, что было бы понятно специалистам в данной области техники. Например, в прилагаемой формуле изобретения, любой из заявленных вариантов осуществления на-

стоящего изобретения может быть использован в любой комбинации.

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

Предпочтительные пункты (признаки) и варианты осуществления настоящего изобретения изложены ниже. Каждый из пунктов и вариантов осуществления настоящего изобретения, определенных таким образом, может быть объединен с любым другим пунктом и/или вариантом осуществления настоящего изобретения, если явно не указано обратное. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или имеющий преимущество, может быть объединен с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительные или имеющие преимущество.

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

В контексте настоящего документа, термин "сорго" относится к растению рода *Sorghum* и включает без ограничения *Sorghum bicolor*, *Sorghum sudanense*, *Sorghum bicolor* × *Sorghum sudanense*, *Sorghum* × *almum* (*Sorghum bicolor* × *Sorghum halepense*), *Sorghum arundinaceum*, *Sorghum* × *drummondii*, *Sorghum halepense* и/или *Sorghum propinquum*.

В контексте настоящего документа, термин "сахарный тростник" относится к растению вида *Saccharum officinarum*.

Термин "растение" включает целые растения, включая их потомков или потомство. Термин "часть растения" включает любую часть или производное растения, включая определенные ткани или структуры растения, растительные клетки, растительный протопласт, растительную клетку или культуру ткани, из которой можно регенерировать растения, каллусы растения, скопления растительных клеток и растительные клетки, находящиеся в интактном состоянии в растениях или частях растений, такие как семена, зерна, початки, цветки, семядоли, листья, стебли, почки, корни, корневые кончики, стерня и тому подобное. Части растения могут включать обработанные части растения или его производные, включая цветки, масла, экстракты и так далее. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения или его производное, упомянутое в настоящем документе, представляет собой стерню.

Термин "стерня", в контексте настоящего документа, использован в своем обычном значении, известном в данной области техники. Посредством дополнительных разъяснений и без ограничения, стерня может содержать, состоять или состоять по существу из листьев и стеблей полевых культур, таких как кукуруза или сорго, которые обычно оставляют в поле после сбора зерна, или в виде сахарного тростника. Стерня может также включать початки (например, сердцевину ушка кукурузы, без зерен). Стерня может также не содержать початки. Стерня может также включать шелуху или оболочки (например, листовидный наружный покров ушка кукурузы). Стерня может также не содержать шелуху или оболочки. Стерня подобна соломе, это остаток, оставшийся после сбора зерен любых злаковых или травы в состоянии зрелости на семена. Ее можно использовать непосредственно для выпаса скота, или ее можно высушить для использования в качестве фуража. Стерню (кукурузную) можно использовать в качестве корма либо в качестве грубого корма при выпаса скота, в измельченном виде, как силос, для последующего использования в качестве фуража, или ее можно собирать для непосредственного (в несилосованном виде) использования в качестве фуража. Кормовую кукурузу обычно силосуют в более прохладных регионах, но ее урожай можно собирать круглый год в тропиках и скармливать животным в качестве зеленого корма. При использовании в качестве силоса, как правило, растение целиком (вместе с зерном и стерней) измельчают на куски, которые затем дробят между валками во время сбора урожая. Кроме стеблей, листьев, шелухи и початков, оставшихся в поле, зерна также могут остаться после сбора урожая. Эти оставшиеся зерна, наряду с кукурузной стерней, служат дополнительным источником корма при выпаса скота.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения или его производное содержит, состоит или состоит по существу из, по меньшей мере, одного, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - из всех стеблей, листьев и початков. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения или его производное представляет собой листья. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения или его производное представляет собой стебли. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения или его производное представляет собой початки. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, часть растения или его производное содержит, состоит или состоит по существу из, по меньшей мере, одного, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - из всех стеблей и листьев. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения

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

В контексте настоящего документа, термин "перевариваемость" относится к продукту и измеряется в процентном содержании продукта (такого, как растение кукурузы, сорго или сахарного тростника, или часть растения, или его производное, включая, например, сухое вещество, органическое вещество или клеточную стенку продукта), усвоенного в пищеварительном тракте животного (Баррьер и др. 2003). Для проведения количественного анализа перевариваемости кукурузы и других кормовых культур были разработаны биологические и химические методы (Ван Соест и др. 1963). Нейтрально-детергентная клетчатка (NDF), представляющая собой остаток после удаления растворимого содержимого клеток, является важным индикатором клеточной стенки растения и целлюлозы. Перевариваемость NDF кормов в условиях *in vitro* (IVNDFD) - это оценка перевариваемости клеточных стенок, исходя из предположения, что часть растительного материала, не содержащая NDF, была полностью переварена (Мешин и др. 2000). Кроме того, сообщалось, что использование ближней инфракрасной спектроскопии (NIRS) позволяет точно измерить признаки перевариваемости у многих кормовых культур, включая кукурузу (Любберштедт и др. 1997a, b; Циммер и др. 1990). В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, животное представляет собой млекопитающее. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, животное представляет собой жвачное животное. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, животное представляет собой травоядное животное. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, животное представляет собой травоядное млекопитающее.

Улучшенная перевариваемость, упомянутая в настоящем документе, относится к повышенной перевариваемости растения или части растения, или к его производному, имеющему характерные особенности по настоящему изобретению, такие как мутация, маркер, SNP или QTL, как описано в другом месте настоящего документа, по сравнению с растением или частью растения, или с его производным, не имеющим таких характерных особенностей. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, улучшенная или повышенная перевариваемость относится к повышению среднего значения DNDF, по меньшей мере, на 1%, например, по меньшей мере, на 2%, по меньшей мере, на 3%, по меньшей мере, на 4%, по меньшей мере, на 5%, по меньшей мере, на 6%, по меньшей мере, на 7%, по меньшей мере, на 8%, по меньшей мере, на 9% или, по меньшей мере, на 10%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на 2%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на 3%, например, по меньшей мере, на 4%.

Термин "локус" (локусы - мн.ч.) означает определенное место или места, или сайт на хромосоме, где обнаружен, например, QTL, ген или генетический маркер. В контексте настоящего документа, термин "локус количественных признаков", или "QTL", используется в своем обычном значении, известном в данной области техники. Посредством дополнительных разъяснений и без ограничения, QTL может относиться к области ДНК, которая ассоциирована с дифференциальной экспрессией количественного фенотипического признака, по меньшей мере, в одном генетическом фоне, например, по меньшей мере, в одной племенной популяции. Область QTL включает или тесно сцеплена с геном или генами, которые оказывают влияние на рассматриваемый признак. "Аллель QTL" может содержать множество генов или других генетических факторов в пределах области функционально сцепленных генов или группы сцепления, такой как гаплотип. Аллель QTL может означать гаплотип в пределах указанного окна, при этом, указанное окно представляет собой область функционально сцепленных генов, которую можно определить и отследить с помощью набора из, по меньшей мере, одного мономорфного и/или полиморфного маркера. Гаплотип можно определить по уникальному отпечатку аллелей на каждом маркере в указанном окне. QTL может кодировать, по меньшей мере, один аллель, который оказывает влияние на экспрессивность непрерывно распределенного (количественного) фенотипа. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, QTL, как описано в настоящем документе, может быть гомозиготным. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, QTL, как описано в на-

стоящем документе, может быть гетерозиготным.

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

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

В контексте настоящего документа, термины "интрогрессия", "интрогрессированный" и "интрогрессирование" относятся как к естественному, так и к искусственному процессу, благодаря которому хромосомные фрагменты или гены одного вида, разновидности или сорта перемещаются в геном другого вида, разновидности или сорта путем скрещивания этих видов. Этот процесс может быть необязательно завершен обратным скрещиванием с рекуррентным родителем. Например, интрогрессия желаемого аллеля в указанном локусе может быть передана, по меньшей мере, одному потомству посредством полового скрещивания между двумя родителями одного и того же вида, где, по меньшей мере, один из родителей имеет желаемый аллель в своем геноме. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, например, передача аллеля может происходить путем рекомбинации между двумя донорскими геномами, например, в слитом протопласте, где, по меньшей мере, один донорский протопласт имеет в своем геноме желаемый аллель. Желаемый аллель может быть, например, определен маркером, который ассоциирован с фенотипом, в QTL, трансгене или тому подобном. В любом случае, потомство, содержащее желаемый аллель, может быть повторно обратно скрещено с линией, имеющей желаемый генетический фон, и выбрано для желаемого аллеля, чтобы получить аллель, зафиксированный в выбранном генетическом фоне. Термин "фрагмент интрогрессии" или "сегмент интрогрессии", или "область интрогрессии" относится к фрагменту хромосомы (или к части хромосомы, или области), который был введен в другое растение одного и того же или родственного вида либо искусственным, либо естественным путем, например, путем скрещивания или традиционными методами селекции, такими как обратное скрещивание, то есть, фрагмент интрогрессии является результатом способов селекции, обозначаемых глаголом "интрогрессировать" (например, обратное скрещивание). Следует понимать, что термин "фрагмент интрогрессии" никогда не включает целую хромосому, а только часть хромосомы. Фрагмент интрогрессии может быть большим, например, он может составлять даже три четверти или половину хромосомы, но в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - менее, например, примерно, 50 млн.п.о. или менее, например, примерно, 30 млн.п.о. или менее, примерно, 20 млн.п.о. или менее, примерно, 25 млн.п.о. или менее, примерно, 10 млн.п.о. или менее, примерно, 9 млн.п.о. или менее, примерно, 8 млн.п.о. или менее, примерно, 7 млн.п.о. или меньше, примерно, 6 млн.п.о. или менее, примерно, 5 млн.п.о. или менее, примерно, 4 млн.п.о. или менее, примерно, 3 млн.п.о. или менее, примерно, 2,5 млн.п.о. или 2 млн.п.о. или менее, примерно, 1 млн.п.о. (равно 1 000 000 пар оснований) или менее, или, примерно, 0,5 млн.п.о. (равно 500 000 пар оснований) или менее, например, примерно, 200 000 п.о.(равно 200 тысяч пар оснований) или менее, примерно, 100 000 п.о. (100 т.п.о.) или менее, примерно, 50 000 п.о. (50 т.п.о.) или менее, примерно, 25 000 п.о. (25 т.п.о.) или менее.

Считается, что генетический элемент, локус, фрагмент интрогрессии, QTL или ген, или аллель, придающий признак (например, улучшенную перевариваемость), можно "получить из" или может быть "получен из", или можно "произвести из", или может быть "произведен из", или "присутствующий в", или "обнаруженный в" растении или части растения, как описано в другом месте настоящего документа, если его можно перенести из растения, в котором он присутствует, в другое растение, в котором он не присутствует (например, линия или сорт), используя традиционные методы селекции, не приводящие к фенотипическому изменению реципиентного растения, за исключением добавления признака, приданного генетическим элементом, локусом, фрагментом интрогрессии, QTL, геном или аллелем. Термины используются взаимозаменяемо, и, таким образом, генетический элемент, локус, фрагмент интрогрессии, QTL, ген или аллель могут быть перенесены в любой другой генетический фон, лишенный этого признака. Могут быть использованы не только растения, содержащие генетический элемент, локус, фрагмент интрогрессии, QTL, ген или аллель, но также потомство/потомки таких растений, которые были выбраны для сохранения генетического элемента, локуса, фрагмента интрогрессии, QTL, гена или аллеля, которые могут быть использованы и включены в настоящий документ. Специалист в данной области техники сможет определить содержит ли растение (или геномная ДНК, клетка или ткань растения) один и тот же генетический элемент, локус, фрагмент интрогрессии, QTL, ген или аллель, который можно получить из такого растения с использованием, по меньшей мере, одного метода, известного в данной области техники, например, фенотипического количественного анализа, полногеномного секвенирования, анализа с помощью молекулярного маркера, картирования признаков, "рописи" хромосомы, теста на аллелизм и тому подобного, или комбинации методов. Следует понимать, что могут быть включены и трансгенные или генно-отредактированные растения.

В контексте настоящего документа, все термины "трансформация" и "трансгенная модификация"

используются как синонимы для обозначения переноса выделенной и клонированной молекулы нуклеиновой кислоты в ДНК, обычно в хромосомную ДНК или геном, другого организма/вида или одного и того же организма/вида, но в место, отличное от места, в котором молекула нуклеиновой кислоты естественным образом расположена на хромосомной ДНК или в геноме.

Значение термина "введение", используемого в настоящем изобретении, включает стабильную или транзиентную интеграцию посредством трансформации, включая *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию, трансфекцию, микроинъекцию, биолистическую бомбардировку, инсерцию с использованием технологии редактирования генов, такой как системы CRISPR (например, CRISPR/Cas, в частности, CRISPR/Cas9 или CRISPR/Cpf1), CRISPR/CasX или CRISPR/CasY), TALEN, цинк-пальцевые нуклеазы или мегануклеазы, гомологичная рекомбинация необязательно посредством одной из нижеупомянутых технологий редактирования генов, включая, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, матрицу для репарации, модификацию эндогенного гена с использованием случайного или целенаправленного мутагенеза, такого как TILLING, или вышеупомянутой технологии редактирования генов и тому подобного.

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

Термин "трансген" или "экзоген" относится к молекуле нуклеиновой кислоты или к генетическому локусу, содержащему последовательность ДНК, такую как рекомбинантный ген, который был введен в геном растения посредством трансформации, такой как *Agrobacterium*-опосредованная трансформация. Растение, содержащее трансген, стабильно интегрированный в его геном, называется "трансгенным растением". Термин "эндоген" относится к молекуле нуклеиновой кислоты или к генетическому локусу, который естественным образом встречается в геноме растения. Термин "редактирование генов" или "редактирование генома" относится к геномной инженерии, при которой ДНК или РНК вставляют, удаляют, модифицируют или заменяют в геноме организма. Редактирование генов может содержать целенаправленный или нецеленаправленный (случайный) мутагенез. Целенаправленный мутагенез может быть осуществлен, например, с помощью сконструированных нуклеаз, таких как мегануклеазы, цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), и системы кластеризованных регулярных промежуточных коротких палиндромных повторов (CRISPR/Cas). Эти нуклеазы создают сайт-специфические двухцепочечные разрывы (DSB) в желаемых местах генома. Индуцированные двухцепочечные разрывы репарируются посредством негомологичного соединения концов (NHEJ) или гомологичной рекомбинации (HR), или гомологически направленной репарации (HDR), что приводит к целенаправленным мутациям или к модификациям нуклеиновой кислоты. Использование сконструированных нуклеаз, необязательно вместе с матрицей для репарации/рекомбинационной матрицей, особенно подходит для генерирования нокаутов или нокадаунов генов. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, разработаны сконструированные нуклеазы, которые специфически индуцируют мутацию в гене F35H, как описано в другом месте настоящего документа, например, для генерации мутированного гена F35H или нокаута гена F35H. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, разработаны сконструированные нуклеазы, в частности, РНК-специфические системы CRISPR/Cas, которые специфически нацелены на мРНК F35H, например, для расщепления мРНК F35H и генерации нокадауна гена/мРНК/белка F35H. Системы доставки и экспрессии систем сконструированных нуклеаз хорошо известны в данной области техники.

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

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

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

Для редактирования генов могут быть предложены рекомбинационные матрицы для осуществления гомологически направленной репарации (HDR). Например, генетический элемент может быть заменен посредством редактирования гена, в котором предложена рекомбинационная матрица. ДНК может быть разрезана выше и/или ниже последовательности, которая должна быть заменена. Таким образом, последовательность, подлежащую замене, вырезают из ДНК. Затем, посредством HDR, вырезанную последовательность заменяют матрицей. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL по настоящему изобретению, описанный в настоящем документе, может быть предложен на/в качестве матрицы. При конструировании системы таким образом, что двухцепочечные разрывы вводятся выше и/или ниже соответствующей области в геноме растения, не содержащей аллель QTL, эту область вырезают, и она может быть заменена матрицей, содержащей аллель QTL по настоящему изобретению. Таким образом, введение в растение аллеля QTL по настоящему изобретению не обязательно должно включать множественное обратное скрещивание, в частности, у растения со специфическим генетическим фоном. Аналогичным образом, мутированный F35H по настоящему изобретению может быть предложен на/в качестве матрицы. Однако большим преимуществом обладает вариант осуществления настоящего изобретения, в котором мутированный F35H по настоящему изобретению может быть сгенерирован без использования рекомбинационной матрицы, но исключительно посредством действия эндонуклеазы, приводящего к разрыву двухцепочечной ДНК, который репарируется посредством NHEJ, что приводит к генерированию инсерционно-делеционной мутации.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, модификация или мутация нуклеиновой кислоты осуществляется посредством (модифицированной) системы эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции (TALEN). Эффекторы, подобные активаторам транскрипции (TALE), могут быть сконструированы для связывания практически любой желаемой последовательности ДНК. Иллюстративные способы редактирования генома с использованием системы TALEN можно найти, например, в работе Чермак Т., Дойл Э.Л., Кристиан М., Ван Л., Чжан Ю., Шмидт С. и др. Эффективное конструирование и сборка специально созданных TALEN и других конструкций на основе эффекторов TAL для нацеливания на ДНК. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39:e82; Чжан Ф., Конг Л., Лодато С., Косури С., Чёрч Г.М., Арлотта П. Эффективная конструкция сиквенс-специфических эффекторов TAL для модуляции транскрипции у млекопитающих. *Nat Biotechnol.* 2011;29:149-153 и в Патентах США №№: 8,450,471, 8,440,431 и 8,440,432, и все они определенным образом включены посредством ссылки. Пособие дополнительных разъяснений и без ограничения, TALE природного происхождения или "TALE дикого типа" представляют собой связывающие нуклеиновые кислоты белки, секретлируемые многочисленными видами протеобактерий. Полипептиды TALE содержат связывающий нуклеиновые кислоты домен, состоящий из тандемных повторов высококонсервативных мономерных полипептидов, которые преимущественно имеют длину 33, 34 или 35 аминокислот и отличаются друг от друга, в основном, положениями аминокислот 12 и 13. В преимущественных вариантах осуществления настоящего изобретения, нуклеиновой кислотой является ДНК. В контексте настоящего документа, термин "полипептидные мономеры" или "мономеры TALE" будет использоваться для обозначения высококонсервативных повторяющихся полипептидных последовательностей, находящихся в пределах связывающего нуклеиновые кислоты TALE домена, а термин "пара варьируемых аминокислотных остатков" или "RVD" будет использоваться для обозначения высоковарируемых аминокислот в положениях 12 и 13 полипептидных мономеров. Как предложено в настоящем изобретении, аминокислотные остатки RVD представлены с использованием однобуквенного кода IUPAC для аминокислот. Общее представление мономера TALE, который входит в ДНК-связывающий домен, выглядит следующим образом: X1-11-(X12X13)-X14-33 или 34, или 35, где нижний индекс указывает на положение аминокислоты, а X представляет любую аминокислоту. X12X13 указывают на RVD. В некоторых полипептидных мономерах,

вариабельной аминокислоты в положении 13 нет, или она отсутствует, и в таких полипептидных мономерах RVD состоит из одиночной аминокислоты. В таких случаях RVD может быть альтернативно представлена как X*, где X представляет X12, а (*) указывает на то, что X13 отсутствует. ДНК-связывающий домен содержит несколько повторов мономеров TALE, и это может быть представлено как (X1-11-(X12X13)-X14-33 или 34 или 35)_z, где, в преимущественном варианте осуществления настоящего изобретения, z составляет, по меньшей мере, от 5 до 40. В другом преимущественном варианте осуществления настоящего изобретения, z составляет, по меньшей мере, от 10 до 26. Мономеры TALE обладают аффинностью связывания нуклеотидов, которая определяется по идентичности аминокислот в своих RVD. Например, полипептидные мономеры с RVD NI, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, связываются с аденином (A), полипептидные мономеры с RVD NG, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, связываются с тиминем (T), полипептидные мономеры с RVD HD, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, связываются с цитозином (C), а полипептидные мономеры с RVD NN, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, связываются как с аденином (A), так и с гуанином (G). В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, полипептидные мономеры с RVD IG, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, связываются с T. Таким образом, количество и порядок повторов полипептидных мономеров в связывающем нуклеиновых кислоты домене TALE, определяют целенаправленную специфичность его нуклеиновых кислот. Кроме того, в других вариантах осуществления настоящего изобретения, полипептидные мономеры с RVD NS распознают все четыре пары оснований и могут связываться с A, T, G или C. Структура и функция TALE описаны ниже, например, в работах Моску и др., *Science* 326:1501 (2009); Бох и др., *Science* 326:1509-1512 (2009); и Чжан и др., *Nature Biotechnology* 29:149-153 (2011), каждая из которых включена в качестве ссылки в полном объеме.

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

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, модификация нуклеиновой кислоты осуществляется посредством (модифицированной) мегануклеазы, которая представляет собой эндодезоксирибонуклеазы, характеризующиеся большим сайтом распознавания (последовательности двухцепочечной ДНК из 12-40 пар оснований). Иллюстративный способ использования мегануклеаз можно обнаружить в патентах США №№: 8,163,514; 8,133,697; 8,021,867; 8,119,361; 8,119,381; 8,124,369; и 8,129,134, которые определенным образом включены посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, модификация нуклеиновой кислоты осуществляется посредством (модифицированного) комплекса или системы CRISPR/Cas. Что касается общей информации о системах CRISPR/Cas, их компонентах и доставке таких компонентов, включая способы, материалы, средства доставки, векторы, частицы, а также информации о их получении и использовании, в том числе о количестве и составах, а также о Cas9CRISPR/Cas-экспрессирующих эукариотических клетках, Cas-9CRISPR/Cas-экспрессирующих эукариотах, таких как у мыши, то приведена ссылка на: Патенты США №№: 8,999,641, 8,993,233, 8,697,359, 8,771,945, 8,795,965, 8,865,406, 8,871,445, 8,889,356, 8,889,418, 8,895,308, 8,906,616, 8,932,814, 8,945,839, 8,993,233 и 8,999,641; Патентные публикации США US 2014-0310830 (Регистрационный номер заявки США 14/105,031), US 2014-0287938 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/213,991), US 2014-0273234 A1 (Регистрационный

номер заявки США 14/293,674), US2014-0273232 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/290,575), US 2014-0273231 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/259,420), US 2014-0256046 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/226,274), US 2014-0248702 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/258,458), US 2014-0242700 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/222,930), US 2014-0242699 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/183,512), US 2014-0242664 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/104,990), US 2014-0234972 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/183,471), US 2014-0227787 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/256,912), US 2014-0189896 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/105,035), US 2014-0186958 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/105,017), US 2014-0186919 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/104,977), US 2014-0186843 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/104,900), US 2014-0179770 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/104,837), US 2014-0179006 A1 (Регистрационный номер заявки США 14/183,486), US 2014-0170753 (Регистрационный номер заявки США 14/183,429); US 2015-0184139 (Регистрационный номер заявки США 14/324,960); 14/054,414 Европейские патентные заявки EP 2 771 468 (EP13818570.7), EP 2 764 103 (EP13824232.6) и EP 2 784 162 (EP14170383.5); и Патентные публикации PCT WO 2014/093661 (PCT/US2013/074743), WO 2014/093694 (PCT/US2013/074790), WO 2014/093595 (PCT/US2013/074611), WO 2014/093718 (PCT/US2013/074825), WO 2014/093709 (PCT/US2013/074812), WO 2014/093622 (PCT/US2013/074667), WO 2014/093635 (PCT/US2013/074691), WO 2014/093655 (PCT/US2013/074736), WO 2014/093712 (PCT/US2013/074819), WO 2014/093701 (PCT/US2013/074800), WO 2014/018423 (PCT/US2013/051418), WO 2014/204723 (PCT/US2014/041790), WO 2014/204724 (PCT/US2014/041800), WO 2014/204725 (PCT/US2014/041803), WO 2014/204726 (PCT/US2014/041804), WO 2014/204727 (PCT/US2014/041806), WO 2014/204728 (PCT/US2014/041808), WO 2014/204729 (PCT/US2014/041809), WO 2015/089351 (PCT/US2014/069897), WO 2015/089354 (PCT/US2014/069902), WO 2015/089364 (PCT/US2014/069925), WO 2015/089427 (PCT/US2014/070068), WO 2015/089462 (PCT/US2014/070127), WO 2015/089419 (PCT/US2014/070057), WO 2015/089465 (PCT/US2014/070135), WO 2015/089486 (PCT/US2014/070175), PCT/US2015/051691, PCT/US2015/051830. Также приведена ссылка на предварительные патентные заявки США 61/758,468; 61/802,174; 61/806,375; 61/814,263; 61/819,803 и 61/828,130, поданные 30 января 2013 года; 15 марта 2013 года; 28 марта 2013 года; 20 апреля 2013 года; 6 мая 2013 года и 28 мая 2013 года, соответственно. Также приведена ссылка на предварительную патентную заявку США 61/836,123, поданную 17 июня 2013 года. Дополнительно приведена ссылка на предварительные патентные заявки США 61/835,931, 61/835,936, 61/835,973, 61/836,080, 61/836,101 и 61/836,127, каждая из которых подана 17 июня 2013 года. Приведена еще одна ссылка на предварительные патентные заявки США 61/862,468 и 61/862,355, поданные 5 августа 2013 года; 61/871,301, поданную 28 августа 2013 года; 61/960,777, поданную 25 сентября 2013 года и 61/961,980, поданную 28 октября 2013 года. Также приведена ссылка на: PCT/US2014/62558, поданную 28 октября 2014 года, и предварительные патентные заявки США, Регистрационные номера: 61/915,148, 61/915,150, 61/915,153, 61/915,203, 61/915,251, 61/915,301, 61/915,267, 61/915,260 и 61/915,397, каждая из которых подана 12 декабря 2013 года; 61/757,972 и 61/768,959, поданные 29 января 2013 года и 25 февраля 2013 года; 62/010,888 и 62/010,879, обе поданы 11 июня 2014 года; 62/010,329, 62/010,439 и 62/010,441, каждая из которых подана 10 июня 2014 года; 61/939,228 и 61/939,242, каждая из которых подана 12 февраля 2014 года; 61/980,012, поданную 15 апреля 2014 года; 62/038,358, поданную 17 августа 2014 года; 62/055,484, 62/055,460 и 62/055,487, каждая из которых подана 25 сентября 2014 года; и 62/069,243, поданную 27 октября 2014 года. Приведена ссылка на заявку PCT, в которой указаны, в частности, Соединенные Штаты, заявку № PCT/US14/41806, поданную 10 июня 2014 года. Приведена ссылка на предварительную патентную заявку США 61/930,214, поданную 22 июня 2014 года. Приведена ссылка на заявку PCT, в которой указаны, в частности, Соединенные Штаты, заявку № PCT/US14/41806, поданную 10 июня 2014 года. Также упоминается заявка США 62/180,709, 17 июня 2015 года, ЗАЩИЩЕННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК (PGRNA); Заявка США 62/091,455, поданная 12 декабря 2014 года, ЗАЩИЩЕННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК (PGRNA); Заявка США 62/096,708, 24 декабря 2014 года, ЗАЩИЩЕННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК (PGRNA); Заявки США 62/091,462, 12 декабря 2014 года, 62/096,324, 23 декабря 2014 года, 62/180,681, 17 июня 2015 года и 62/237,496, 5 октября 2015 года, НЕАКТИВНЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ ДЛЯ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ CRISPR; Заявка США 62/091,456, 12 декабря 2014 года и 62/180,692, 17 июня 2015 года, СОПРОВОЖДАЕМЫЕ И ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ ДЛЯ СИСТЕМ CRISPR-CAS; Заявка США 62/091,461, 12 декабря 2014 года, ДОСТАВКА, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМ И КОМПОЗИЦИЙ CRISPR-CAS ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА В ОТНОШЕНИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (HSC); Заявка США 62/094,903, 19 декабря 2014 года, ОБЪЕКТИВНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ РАЗРЫВОВ И ГЕНОМНАЯ ПЕРЕСТРОЙКА ПОСРЕДСТВОМ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНТИРОВАНИЯ ЗАХВАЧЕННОЙ ИНСЕРЦИИ; Заявка США 62/096,761, 24 декабря 2014 года, РАЗРАБОТКА СИСТЕМ, СПОСОБОВ И ОПТИМИЗИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ, И НАПРАВЛЯЮЩИХ КАРКАСОВ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ; Заявка США 62/098,059, 30 декабря 2014 года, 62/181,641, 18 июня 2015 года и 62/181,667, 18 июня 2015 года, СИСТЕМА НАЦЕЛИВАНИЯ НА РНК; Заявка США 62/096,656, 24 декабря 2014 года и 62/181,151 от 17 ию-

ня 2015 года, CRISPR, ИМЕЮЩИЕ ИЛИ АССОЦИИРОВАННЫЕ С ДЕСТАБИЛИЗИРУЮЩИМИ ДОМЕНАМИ; Заявка США 62/096,697, 24 декабря 2014 года, CRISPR, ИМЕЮЩИЕ ИЛИ АССОЦИИРОВАННЫЕ С AAV; Заявка США 62/098,158, 30 декабря 2014 года, РАЗРАБОТАННЫЕ НАЦЕЛИВАЮЩИЕ ИНСЕРЦИОННЫЕ СИСТЕМЫ КОМПЛЕКСА CRISPR; Заявка США 62/151,052, 22 апреля 2015 года, КЛЕТОЧНОЕ НАЦЕЛИВАНИЕ ДЛЯ СОСТАВЛЕНИЯ ДАННЫХ ПО ВНЕКЛЕТОЧНЫМ ЭКСОСОМАМ; Заявка США 62/054,490, 24 сентября 2014 года, ДОСТАВКА, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМ И КОМПОЗИЦИЙ CRISPR-CAS ДЛЯ НАЦЕЛИВАНИЯ НА ПАТОЛОГИИ И ЗАБОЛЕВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПОНЕНТОВ ДОСТАВКИ ЧАСТИЦ; Заявка США 61/939,154, 12-Ф ЕВ-14, СИСТЕМЫ, СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ ПОСРЕДСТВОМ ОПТИМИЗИРОВАННЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ CRISPR-CAS; Заявка США 62/055,484, 25 сентября 2014 года, СИСТЕМЫ, СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ ПОСРЕДСТВОМ ОПТИМИЗИРОВАННЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ CRISPR-CAS; Заявка США 62/087,537, 4 декабря 2014 года, СИСТЕМЫ, СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ ПОСРЕДСТВОМ ОПТИМИЗИРОВАННЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ CRISPR-CAS; Заявка США 62/054,651, 24 сентября 2014 года, ДОСТАВКА, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМ И КОМПОЗИЦИЙ CRISPR-CAS ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ КОНКУРЕНЦИИ МНОЖЕСТВЕННЫХ МУТАЦИЙ РАКА В УСЛОВИЯХ IN VIVO; Заявка США 62/067,886, 23 октября 2014 года, ДОСТАВКА, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМ И КОМПОЗИЦИЙ CRISPR-CAS ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ КОНКУРЕНЦИИ МНОЖЕСТВЕННЫХ МУТАЦИЙ РАКА В УСЛОВИЯХ IN VIVO; Заявки США 62/054,675, 24 сентября 14 года и 62/181,002, 17 июня 2015 года, ДОСТАВКА, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМ И КОМПОЗИЦИЙ CRISPR-CAS В НЕЙРОНАХ/ТКАНЯХ; Заявка США 62/054,528, 24 сентября 2014 года, ДОСТАВКА, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМ И КОМПОЗИЦИЙ CRISPR-CAS ПРИ ИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ИЛИ ПАТОЛОГИЯХ; Заявка США 62/055,454, 25 сентября 2014 года, ДОСТАВКА, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМ И КОМПОЗИЦИЙ CRISPR-CAS ДЛЯ НАЦЕЛИВАНИЯ НА ПАТОЛОГИИ И ЗАБОЛЕВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕПТИДОВ, ПРОНИКАЮЩИХ В КЛЕТКИ (СРР); Заявка США 62/055,460, 25 сентября 2014 года, МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ CRISPR И/ИЛИ ОПТИМИЗИРОВАННЫЕ, СЦЕПЛЕННЫЕ С ФЕРМЕНТАМИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ CRISPR; Заявка США 62/087,475, 4 декабря 2014 года и 62/181,690, 18 июня 2015 года, ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ПОСРЕДСТВОМ ОПТИМИЗИРОВАННЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ CRISPR-CAS; Заявка США 62/055,487, 25 сентября 2014 года, ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ПОСРЕДСТВОМ ОПТИМИЗИРОВАННЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ CRISPR-CAS; Заявка США 62/087,546, 4 декабря 2014 года и 62/181,687, 18 июня 2015 года, МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ CRISPR И/ИЛИ ОПТИМИЗИРОВАННЫЕ, СЦЕПЛЕННЫЕ С ФЕРМЕНТАМИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ CRISPR; и заявка США 62/098,285, 30 декабря 2014 года, CRISPR-ОПОСРЕДОВАННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ В УСЛОВИЯХ IN VIVO И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ РОСТА ОПУХОЛИ И МЕТАСТАЗОВ. Упомянуты заявки США 62/181,659, 18 июня 2015 года и 62/207,318, 19 августа 2015 года, РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМ, СПОСОБОВ, ФЕРМЕНТОВ И НАПРАВЛЯЮЩИХ КАРКАСОВ ОРТОЛОГОВ CAS9 И ВАРИАНТОВ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ. Упомянуты заявки США 62/181,663, 18 июня 2015 года и 62/245,264, 22 октября 2015 года, НОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ И СИСТЕМЫ CRISPR, заявки США 62/181,675, 18 июня 2015 года и дело патентного реестра за № 46783.01.2128, поданное 22 октября 2015 года, НОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ И СИСТЕМЫ CRISPR, заявка США 62/232,067, 24 сентября 2015 года, заявка США 62/205,733, 16 августа 2015 года, заявка США 62/201,542, 5 августа 2015 года, заявка США 62/193,507, 16 июля 2015 года и заявка США 62/181,739, 18 июня 2015 года, каждая из которых озаглавлена "НОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ И СИСТЕМЫ CRISPR", и заявка США 62/245,270, 22 октября 2015 года, НОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ И СИСТЕМЫ CRISPR. Упомянуты также заявки США 61/939,256 от 12 февраля 2014 года и WO 2015/089473 (PCT/US2014/070152) от 12 декабря 2014 года, каждая из которых озаглавлена "РАЗРАБОТКА СИСТЕМ, СПОСОБОВ И ОПТИМИЗИРОВАННЫХ НАПРАВЛЯЮЩИХ КОМПОЗИЦИЙ ПОСРЕДСТВОМ НОВЫХ АРХИТЕКТУР ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ". Упомянуты также PCT/US2015/045504, 15 августа 2015 года, заявка США 62/180,699, 17 июня 2015 года и заявка США 62/038,358, 17 августа 2014 года, каждая из которых озаглавлена "РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НИКАЗ CAS9". Европейская патентная заявка EP3009511. Также приведена ссылка на работу "Мультиплексная геномная инженерия с использованием систем CRISPR/Cas". Конг, Л., Рэн, Ф.А., Кокс, Д., Лин, С, Барретто, Р., Хабиб, Н., Сюй, П.Д., Ву, Х., Цзян, В., Марраффини, Л.А. и Чжан, Ф. Science, 15 февраля;339(6121):819-23 (2013); РНК-направляемое редактирование бактериальных геномов с использованием систем CRISPR-Cas. Цзян В., Бикард Д., Кокс Д., Чжан Ф., Марраффини, Л.А. Nat Biotechnol, март;31(3):233-9 (2013); Одноэтапное генерирование мышей, несущих мутации во множестве генов, с помощью CRISPR/Cas-опосредованной геномной инженерии. Ван Х., Ян Х., Шивалила К.С, Давлати М.М., Ченг А.В., Чжан Ф., Йениш Р. Cell, 9 мая;153(4):910-8

(2013); Оптический контроль за эндогенной транскрипцией и эпигенетическими состояниями млекопитающих. Конерманн С., Бригхэм М.Д., Тревино А.Е., Сюй П.Д., Хайденрайх М., Конг Л., Платт Р.Дж., Скотт Д.А., Черч Г.М., Чжан Ф. *Nature*. 2013, 22 августа; 500(7463):472-6. идентификатор цифрового объекта (doi): 10.1038/Nature12466. Электронная публикация 23 августа 2013 года; Двойное никование с помощью РНК-направляемого Cas9 CRISPR для повышенной специфичности редактирования генома. Рэн, Ф.А., Сюй, П.Д., Лин, С.Ю., Гутенберг, Дж.С, Конерманн, С, Тревино, А.Е., Скотт, Д.А., Иноуэ, А., Матоба, С, Чжан, Ю. и Чжан Ф. *Cell*, 28 августа, уникальный идентификатор, применяемый издательством для идентификации научных работ (pii): S0092-8674(13)01015-5. (2013); Специфичность нацеливания на ДНК РНК-направляемых нуклеаз Cas9. Сюй, П., Скотт, Д., Вайнштейн, Дж., Рэн, Ф.А., Конерманн, С, Агарвала, В., Ли, Ю., Файн, Э., Ву, Х., Шалем, О., Крадик, Т.Дж., Марраффино, Л.А., Бао, Г. и Чжан, Ф. *Nat Biotechnol* doi:10.1038/nbt.2647 (2013); Геномная инженерия с использованием системы CRISPR-Cas9. Рэн, Ф.А., Сюй, П.Д., Райт, Дж., Агарвала, В., Скотт, Д.А., Чжан, Ф., *Nature Protocols*, ноябрь;8(11):2281-308. (2013); Полногеномный скрининг нокаутов CRISPR-Cas9 в клетках человека. Шалем О., Санджана, Нью-Йорк, Хартениан, Э., Ши, Х., Скотт, Д.А., Миккельсон, Т., Хекл, Д., Эберт, Б.Л., Рут, Д.Е., Доенч, Дж.Г., Чжан, Ф. *Science*, 12 декабря. (2013). [Электронная публикация до печати]; Кристаллическая структура cas9 в комплексе с направляющей РНК и ДНК-мишенью. Нисимасу, Х., Рэн, Ф.А., Сюй, П.Д., Конерманн, С, Шехата, СИ., Дохма, Н., Ишитани, Р., Чжан, Ф., Нуреки, О. *Cell* 27 февраля. (2014). 156(5):935-49; Полногеномное связывание эндонуклеазы Cas9 системы CRISPR в клетках млекопитающих. Ву Х., Скотт Д.А., Криз А.Дж., Чиу А.С., Сюй, П.Д., Дадон Д.Б., Ченг А.В., Тревино А.Е., Конерманн С, Чен С, Йениш Р., Чжан, Ф., Шарп П.А. *Nat Biotechnol*. (2014) 20 апреля, doi: 10.1038/nbt.2889; Нокин CRISPR-Cas9 мышей для редактирования генома и моделирования рака, Платт и др., *Cell* 159(2): 440-455 (2014) DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.014; Разработка и применение CRISPR-Cas9 для геномной инженерии, Сюй и др., *Cell* 157, 1262-1278 (5 июня 2014 года) (Сюй 2014); Генетические экраны в клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9, Ван и др., *Science*. 2014, 3 января; 343(6166): 80-84. doi:10.1126/science.1246981; Рациональная конструкция высокоактивных sgРНК для CRISPR-Cas9-опосредованной инактивации генов, Доенч и др., *Nature Biotechnology* 32(12): 1262-7 (2014), опубликовано онлайн 3 сентября 2014 года; doi:10.1038/nbt.3026, и Исследование функции генов в мозге млекопитающих в условиях *in vivo* с использованием системы CRISPR-Cas9, Свич и др., *Nature Biotechnology* 33, 102-106 (2015), опубликовано онлайн 19 октября 2014 года; doi: 10.1038/nbt.3055, Cpf1 - это единственная РНК-направляемая эндонуклеаза системы CRISPR-Cas класса 2, Цетше и др., *Cell* 163, 1-13 (2015); Открытие и функциональная характеристика разнообразных систем CRISPR-Cas класса 2, Шамаков и др., *Mol Cell* 60(3): 385-397 (2015); C2c2 - это однокомпонентный, программируемый, РНК-направляемый, нацеленный на РНК, эффектор CRISPR, Абудайе и др., *Science* (2016) опубликовано онлайн 2 июня 2016 года doi: 10.1126/science.aaf5573. Каждая из этих публикаций, патентов, патентных публикаций и заявок, а также все документы, цитируемые в них или в делопроизводстве по ним ("документы, цитируемые в заявке"), и все документы, цитируемые или приводимые в качестве ссылки в документах, цитируемых в заявке, вместе с любыми инструкциями, описаниями, спецификациями продуктов и паспортами продуктов в отношении любых продуктов, упомянутых в них, или в любом из таких документов, и включенные в настоящий документ в качестве ссылки, считаются включенными в настоящий документ в качестве ссылки и могут использоваться для осуществления настоящего изобретения. Все документы (например, эти патенты, патентные публикации и заявки, а также документы, цитируемые в заявке) включены в настоящий документ в качестве ссылки в той же степени, как если бы каждый отдельный документ был определенным образом и отдельно указан, как включенный в качестве ссылки.

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

В целом, система CRISPR/Cas или CRISPR, в контексте вышеупомянутых документов, в совокупности относится к транскриптам и другим элементам, участвующим в экспрессии или направляющим активность CRISPR-ассоциированных ("Cas") генов, включая последовательности, кодирующие ген Cas и, по меньшей мере, одну из следующих: *tracr* (трансактивирующую CRISPR) последовательность (например, *tracr*РНК или активную частичную *tracr*РНК), *tracr*-*mate* (напарницу трансактивирующей) последовательность (охватывающую "прямой повтор" и частичный прямой повтор, процессированный *tracr*РНК, в контексте эндогенной системы CRISPR), направляющую последовательность (также называемую "спейсером" в контексте эндогенной системы CRISPR) или "РНК", в том смысле, в котором этот термин используется в настоящем документе (например, РНК, служащие для направления Cas, такого как Cas9, например, РНК CRISPR, и там, где это применимо, трансактивирующую (*tracr*) РНК или оди-

ночную направляющую РНК (sgРНК) (химерную РНК)), или другие последовательности и транскрипты из локуса CRISPR. В целом, система CRISPR характеризуется элементами, которые способствуют образованию комплекса CRISPR в сайте последовательности-мишени (также называемой протоспейсером в контексте эндогенной системы CRISPR). В контексте образования комплекса CRISPR, термин "последовательность-мишень" относится к последовательности, для которой сконструирована направляющая последовательность для комплементарности, при этом гибридизация между последовательностью-мишенью и направляющей последовательностью способствует образованию комплекса CRISPR. Последовательность-мишень может содержать любой полинуклеотид, например, полинуклеотиды ДНК или РНК.

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

В контексте настоящего документа, термин "сгРНК" или "направляющая РНК", или "одиночная направляющая РНК", или "sgРНК", или "по меньшей мере, один компонент нуклеиновой кислоты" эффекторного белка локуса CRISPR/Cas, если применимо, содержит любую полинуклеотидную последовательность, имеющую достаточную комплементарность с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени, для гибридизации с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени и для прямого сиквенс-специфического связывания комплекса, нацеленного на нуклеиновую кислоту, с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, степень комплементарности при оптимальном выравнивании с использованием подходящего алгоритма выравнивания составляет, примерно, или более 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99%, или более. Оптимальное выравнивание может быть определено с использованием любого подходящего алгоритма для выравнивания последовательностей, неограничивающий пример которого включают алгоритм Смита-Уотермана, алгоритм Нидлмана-Вунша, алгоритмы, основанные на преобразовании Барроуза-Уилера (например, выравниватель Барроуза-Уилера), программы для множественного выравнивания последовательностей ClustalW, ClustalX, BLAST, Novoalign (Novocraft Technologies; доступно по адресу www.novocraft.com), ELAND (Illumina, Сан-Диего, Калифорния), SOAP (доступно по адресу soap.genomics.org.cn), и Maq (доступно по адресу maq.sourceforge.net). Способность направляющей последовательности (в пределах направляющей РНК, нацеленной на нуклеиновую кислоту) направлять сиквенс-специфическое связывание комплекса, нацеленного на нуклеиновую кислоту, к последовательности нуклеиновой кислоты-мишени может быть оценена с помощью любого подходящего количественного анализа.

Направляющая последовательность и, следовательно, направляющая РНК, нацеленная на нуклеиновую кислоту, могут быть выбраны для нацеливания на любую последовательность нуклеиновой кислоты-мишень. Последовательность-мишень может представлять собой ДНК. Последовательность-мишень может представлять собой геномную ДНК. Последовательность-мишень может представлять собой митохондриальную ДНК. Последовательность-мишень может представлять собой любую последовательность РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, последовательность-мишень может представлять собой последовательность, находящуюся в пределах молекулы РНК, выбранной из группы, состоящей из информационной РНК (mРНК), предшественника mРНК (pre-mРНК), рибосомной РНК (rРНК), транспортной РНК (tРНК), микро-РНК (miРНК), малой интерферирующей РНК (siРНК), малой ядерной РНК (snРНК), малой ядрышковой РНК (snoРНК), двухцепочечной РНК (dsРНК), некодирующей РНК (ncРНК), длинной некодирующей РНК (lncРНК) и малой цитоплазматической РНК (scРНК). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, последовательность-мишень может представлять собой последовательность, находящуюся в пределах молекулы РНК, выбранной из группы, состоящей из mРНК, pre-mРНК и tРНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, последовательность-мишень может представлять собой последовательность, находящуюся в пределах молекулы РНК, выбранной из группы, состоящей из ncРНК и lncРНК. В некоторых более предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, последовательность-мишень может представлять собой последовательность, находящуюся в пределах молекулы mРНК или молекулы pre-mРНК.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, gРНК содержит петлю стебля, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - одиночную петлю стебля. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, последовательность прямого повтора образует петлю стебля, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - одиночную петлю стебля. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, длина спейсера направляющей РНК составляет от 15 до 35 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления на-

стоящего изобретения, длина спейсера направляющей РНК составляет, по меньшей мере, 15 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, длина спейсера составляет от 15 до 17 нуклеотидов, например, 15, 16 или 17 нуклеотидов, от 17 до 20 нуклеотидов, например, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов, от 20 до 24 нуклеотидов, например, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида, от 23 до 25 нуклеотидов, например, 23, 24 или 25 нуклеотидов, от 24 до 27 нуклеотидов, например, 24, 25, 26 или 27 нуклеотидов, от 27 до 30 нуклеотидов, например, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов, от 30 до 35 нуклеотидов, например, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 нуклеотидов, или 35 нуклеотидов, или более. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения, система CRISPR/Cas требует наличия tracrPНК. Последовательность "tracrPНК" или аналогичные термины включает любую полинуклеотидную последовательность, которая обладает комплементарностью с последовательностью crPНК, достаточной для гибридизации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, степень комплементарности между последовательностью tracrPНК и последовательностью crPНК по длине более короткой из двух при оптимальном выравнивании составляет, примерно, или более, примерно, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97,5%, 99%, или выше. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, tracr последовательность составляет, примерно, или более, примерно, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50 или более нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, tracr последовательность и последовательность gPНК содержатся в пределах одного транскрипта, таким образом, в результате гибридизации между ними образуется транскрипт, имеющий вторичную структуру, такую как шпилька. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, транскрипт или транскрибируемая полинуклеотидная последовательность имеет, по меньшей мере, две шпильки. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, транскрипт имеет две, три, четыре или пять шпилек. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, транскрипт имеет не более пяти шпилек. В шпильчатой структуре участок последовательности 5' конечного "N" и выше петли может соответствовать tracr-mate последовательности, а участок последовательности 3' петли, следовательно, соответствует tracr последовательности. В шпильчатой структуре участок последовательности 5' конечного "N", и находящийся выше петли, может, в альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, соответствовать tracr последовательности, а участок последовательности 3' петли соответствует tracr-mate последовательности. В альтернативных вариантах осуществления настоящего изобретения, для системы CRISPR/Cas не требуется tracrPНК, что известно специалисту в данной области техники.

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

Как правило, в контексте эндогенной системы, нацеленной на нуклеиновую кислоту, образование комплекса, нацеленного на нуклеиновую кислоту (содержащего направляющую РНК, гибридизованную с последовательностью-мишенью и входящую в состав, по меньшей мере, одного эффекторного белка, нацеленного на нуклеиновую кислоту), приводит к модификации (например, к расщеплению) одной или обеих цепей ДНК или РНК, находящихся в пределах или рядом (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 или более пар оснований) с последовательностью-мишенью. В контексте настоящего документа, термин "последовательность(и), ассоциированная с интересующим локусом-мишенью" относится к последовательностям, находящимся рядом с последовательностью-мишенью (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 или более пар оснований от последовательности-мишени, при этом, последовательность-мишень содержится в интересующем локусе-мишени). Специалисту в данной области техники известны специфические сайты разреза, предназначенные для выбранных систем CRISPR/Cas, применительно к последовательности-мишени, которая, как это известно в данной области техники, может находиться в пределах последовательности-мишени или, в альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, в ориентации 3' или 5' последовательности-мишени.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, немодифицированный эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, может обладать активностью расщепления нуклеино-

вой кислоты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, нуклеаза, как описано в настоящем документе, может направлять расщепление одной или обеих цепей нуклеиновых кислот (ДНК, РНК или гибридов, которые могут быть одно- или двухцепочечными) в месте расположения или рядом с последовательностью-мишенью, например, в пределах последовательности-мишени и/или в пределах комплемента последовательности-мишени, или в последовательностях, ассоциированных с последовательностью-мишенью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, может направлять расщепление одной или обеих цепей ДНК или РНК, находящихся в пределах, примерно, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 500 или более пар оснований от первого или последнего нуклеотида последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, расщепление может быть тупым (например, для Cas9, таких как SaCas9 или SpCas9). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, расщепление может быть ступенчатым (например, для Cpf1), то есть, с генерированием липких концов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, расщепление представляет собой ступенчатый разрез с 5' выступающими нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, расщепление представляет собой ступенчатый разрез с 5' выступающими нуклеотидами в количестве от 1 до 5 нуклеотидов, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - 4 или 5 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, сайт расщепления находится выше PAM. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, сайт расщепления находится ниже PAM. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, который может быть мутирован по отношению к соответствующему ферменту дикого типа таким образом, что мутированный эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, будет лишен способности расщеплять одну или обе цепи ДНК или РНК полинуклеотида-мишени, содержащего последовательность-мишень. В качестве дополнительного примера, по меньшей мере, два каталитических домена белка Cas (например, RuvC I, RuvC II и RuvC III или домен HNH белка Cas9) могут быть мутированы для продуцирования мутированного белка Cas, по существу, полностью лишенного активности расщепления ДНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, можно считать, что эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, по существу, полностью лишен активности расщепления ДНК и/или РНК, когда активность расщепления мутированного фермента составляет, примерно, не более 25%, 10%, 5%, 1%, 0,1%, 0,01% или менее активности расщепления нуклеиновой кислоты немутрированной формы фермента; примером может служить случай, когда активность расщепления нуклеиновой кислоты мутированной формы является нулевой или незначительной, по сравнению с немутрированной формой. В контексте настоящего документа, термин "модифицированный" Cas обычно относится к белку Cas, имеющему, по меньшей мере, одну модификацию или мутацию (включая точечные мутации, усечения, инсерции, делеции, химеры, белки слияния и так далее), по сравнению с белком Cas дикого типа, из которого он получен. Термин "получен" означает, что полученный фермент в значительной степени основан, по смыслу обладания высокой степенью гомологии последовательностей, на ферменте дикого типа, но был мутирован (модифицирован) каким-либо образом, известным в данной области техники или описанным в настоящем документе.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, мутированный эффекторный белок, нацеленный на нуклеиновую кислоту, основанный на системе CRISPR, как описано выше, который лишен способности расщеплять одну или обе цепи ДНК или РНК полинуклеотида-мишени, содержащего последовательность-мишень, может быть слит с другими инструментами, такими как другие нуклеазы, никазы, рекомбиназы, транспозазы, редакторы основания или молекулярные комплексы, которые включают эти инструменты. Термин "редактор основания", в контексте настоящего документа, относится к белку или его фрагменту, обладающему той же каталитической активностью, что и белок, из которого он получен, причем, белок или его фрагмент, сам по себе, или когда он предложен в виде молекулярного комплекса, называемого в настоящем документе комплексом редактирования основания, обладает способностью опосредовать целенаправленную модификацию основания, то есть, преобразовать интересующее основание, что приводит к интересующей точечной мутации. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один редактор основания, в контексте настоящего изобретения, временно или постоянно сцеплен с, по меньшей мере, одним сайт-специфическим эффектором или необязательно с компонентом, по меньшей мере, одного сайт-специфического эффекторного комплекса (например, с доменом распознавания ДНК системы CRISPR, с цинковым пальцем или TAL-эффекторами). Сцепление может быть ковалентным и/или нековалентным.

В многочисленных публикациях показано целенаправленное преобразование основания, в первую очередь цитидина (C) в тимин (T), с использованием никазы CRISPR/Cas9 или нефункциональной нуклеазы, сцепленной с доменом цитидиндезаминазы, каталитическим полипептидом, редактирующим мРНК Аполипротеина В (APOBEC1), например, с APOBEC, полученным из крысы. Деаминация цитозина (C) катализируется цитидиндезаминазой и приводит к образованию урацила (U), который обладает свойствами спаривания оснований тимина (T). Большинство известных цитидиндезаминаз оказывают влияние на РНК, и известно несколько примеров, когда принимается ДНК, в которой требуется одноцепочечная (ss) ДНК. Исследования комплекса dCas9-ДНК-мишень показывают, что, по меньшей мере,

ре, девять нуклеотидов (nt) вытесненной цепи ДНК не спариваются при образовании комплекса Cas9-направляющая РНК-'R-петля' ДНК (Джор и др., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 529-536 (2011)). Действительно, в структуре комплекса Cas9 R-петля первые 11 нуклеотидов протоспейсера на вытесненной цепи ДНК неупорядочены, а это говорит о том, что их движение не сильно ограничено. Также было высказано предположение о том, что мутации, индуцированные никазой Cas9, в цитозинах в нематричной цепи могут возникать из-за их доступности для клеточных ферментов цитозиндезаминазы. По нашему мнению, подмножество этого удлинения ssДНК в R-петле могло бы служить эффективным субстратом для dCas9-привязанной цитидиндезаминазы для осуществления непосредственного, программируемого преобразования C в U в ДНК (см. выше, Комор и др.). Recently, Гоуделли и др. ((2017). Программируемое редактирование основания А·Т в G·C в геномной ДНК без расщепления ДНК. В журнале *Nature*, 551(7681), 464.) описаны редакторы основания аденина (ABE), которые опосредуют преобразование А·Т в G·C в геномной ДНК.

Любой комплекс редактирования основания по настоящему изобретению может, таким образом, содержать, по меньшей мере, одну цитидиндезаминазу или ее каталитически активный фрагмент. По меньшей мере, один комплекс редактирования основания может содержать цитидиндезаминазу или ее домен в виде каталитически активного фрагмента в качестве редактора основания.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания представляет собой преобразование любого нуклеотида C, A, T или G в любой другой нуклеотид. Любой из нуклеотидов C, A, T или G может быть обменен сайт-направленным способом, опосредованным редактором основания или его каталитически активным фрагментом, на другой нуклеотид. Таким образом, по меньшей мере, один комплекс редактирования основания может содержать любой редактор основания или домен редактора основания, или его каталитически активный фрагмент, который может преобразовывать интересующий нуклеотид в любой другой интересующий нуклеотид целенаправленным способом.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, последовательность-мишень для системы CRISPR/Cas должна быть ассоциирована с PAM (мотив, примыкающий к протоспейсеру) или PFS (фланкирующая последовательность протоспейсера или сайт); то есть с короткой последовательностью, распознаваемой комплексом CRISPR. Требования к точности и длине последовательностей для PAM различаются в зависимости от используемого фермента CRISPR, но PAM обычно представляют собой последовательности из 2-5 пар оснований, примыкающие к протоспейсеру (то есть, к последовательности-мишени). Примеры последовательностей PAM приведены в разделе примеров ниже, а специалист в данной области техники сможет идентифицировать другие последовательности PAM для использования с данным ферментом CRISPR. Кроме того, разработка домена взаимодействия с PAM (PI) может позволить запрограммировать специфичность PAM, повысить точность распознавания сайта-мишени и повысить универсальность Cas, такого как Cas9, платформы геномной инженерии. Белки Cas, такие как белки Cas9, могут быть разработаны для изменения их PAM-специфичности, например, как описано в работе Клейнстивер Б.П. и др. Разработанные нуклеазы CRISPR-Cas9 с измененной PAM-специфичностью. *Nature*. 2015, 23 июля;523(7561):481-5. doi: 10.1038/nature14592. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способ содержит возможность связывания комплекса CRISPR с полинуклеотидом-мишенью для осуществления расщепления упомянутого полинуклеотида-мишени, модифицируя тем самым полинуклеотид-мишень, при этом, комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, связанный в комплекс с направляющей последовательностью, гибридизированной с последовательностью-мишенью в пределах упомянутого полинуклеотида-мишени, при этом, упомянутая направляющая последовательность сцеплена с *tracr-mate* последовательностью, которая, в свою очередь, гибридируется с *tracr* последовательностью. Специалист в данной области техники поймет, что другие белки Cas могут быть модифицированы аналогичным образом.

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

ленных вариантах осуществления настоящего изобретения, (модифицированный) белок Cas представляет собой C2c3. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, (модифицированный) белок Cas представляет собой Cas13b.

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

РНК-интерференция (РНКи) - это биологический процесс, в котором молекулы РНК ингибируют экспрессию или трансляцию генов, нейтрализуя молекулы-мишени мРНК. Два типа малых молекул рибонуклеиновой кислоты (РНК) - микро-РНК (miРНК) и малая интерферирующая РНК (siRNA) - являются центральными для РНК-интерференции. РНК являются непосредственными продуктами генов, и эти малые РНК могут связываться с другими специфическими молекулами информационной РНК (мРНК) и либо повышать, либо понижать их активность, например, предотвращая трансляцию мРНК в белок. Путь РНКи обнаружен у многих эукариот, включая животных, и инициируется ферментом Дайсер (Dicer), который расщепляет молекулы длинных двухцепочечных РНК (dsРНК) на короткие двухцепочечные фрагменты siRNA, состоящие из, примерно, 21 нуклеотида (малые интерферирующие РНК). Каждая siRNA разматывается на две одноцепочечные РНК (ssРНК), сопровождающую цепь и направляющую цепь. Сопровождающая цепь деградирует, а направляющая цепь включается в РНК-индуцированный сайленсинг-комплекс (RISC). Зрелые miРНК структурно схожи с siРНК, продуцированными из экзогенной dsРНК, но прежде чем достичь зрелости, miРНК должны сначала подвергнуться обширной посттранскрипционной модификации. miРНК экспрессируется из гораздо более длинного РНК-кодирующего гена в виде первичного транскрипта, известного как pri-miРНК, которая обрабатывается (в ядре клетки до 70-нуклеотидной структуры "петля на стебле", называемой pre-miРНК) микропроцессорным комплексом. Этот комплекс состоит из фермента РНазы III, называемого Дроша (Drosha), и dsРНК-связывающего белка DGCR8. Участок dsРНК этой pre-miРНК связывается и расщепляется ферментом Дайсер для получения зрелой молекулы miРНК, которая может быть интегрирована в комплекс RISC; таким образом, miРНК и siРНК имеют одинаковый нисходящий клеточный механизм. Короткая шпилька РНК или малая шпилька РНК (shРНК/Шпилечный вектор) - это искусственная молекула РНК с крутым поворотом шпильки, которая может быть использована для сайленсинга экспрессии гена-мишени посредством РНК-интерференции. Наиболее хорошо изученным результатом является посттранскрипционный сайленсинг генов, который происходит, когда направляющая цепь спаривается с комплементарной последовательностью в молекуле информационной РНК и индуцирует расщепление посредством Argonaute 2 (Ago2), каталитическим компонентом RISC. В контексте настоящего документа, молекула РНКи может представлять собой siРНК, shРНК или miРНК. Следует понимать, что молекулы РНКи могут применяться как таковые к/в растении или могут кодироваться соответствующими векторами, из которых экспрессируется молекула РНКи. Системы доставки и экспрессии молекул РНКи, такие как siРНК, shРНК или miРНК, хорошо известны в данной области техники.

В контексте настоящего документа, термин "гомозигота" относится к отдельной клетке или растению, имеющему одинаковые аллели в, по меньшей мере, одном или во всех локусах. Когда этот термин используется по отношению к специфическому локусу или гену, это означает, что, по меньшей мере, этот локус или ген имеет одинаковые аллели. В контексте настоящего документа, термин "гомозиготный" означает генетическое состояние, которое существует, когда идентичные аллели находятся в соответствующих локусах на гомологичных хромосомах. В контексте настоящего документа, термин "гетерозигота" относится к отдельной клетке или растению, имеющему разные аллели в, по меньшей мере, одном или во всех локусах. Когда этот термин используется по отношению к специфическому локусу или гену, это означает, что, по меньшей мере, этот локус или ген имеет разные аллели. В контексте настоящего документа, термин "гетерозиготный" означает генетическое состояние, которое существует, когда разные аллели находятся в соответствующих локусах на гомологичных хромосомах. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, QTL и/или, по меньшей мере, один маркер, описанный в настоящем документе, является гомозиготным. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, QTL и/или, по меньшей мере, один маркер, описанный в настоящем документе,

является гетерозиготным. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL и/или, по меньшей мере, один маркерный аллель, описанный в настоящем документе, является гомозиготным. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL и/или, по меньшей мере, один маркерный аллель, описанный в настоящем документе, является гетерозиготным.

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

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

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

Термин "тонкое картирование" относится к способам, посредством которых положение QTL может быть определено более точно (локализовано) и посредством которых размер фрагмента интрогрессии, содержащего QTL, уменьшается. Например, могут быть использованы почти изогенные линии для QTL (QTL-NIL), которые содержат различные, перекрывающиеся фрагменты фрагмента интрогрессии в пределах другого однородного генетического фона рекуррентного родителя. Затем такие линии могут быть использованы для картирования фрагмента, на котором расположен QTL, и для идентификации линии, имеющей более короткий фрагмент интрогрессии, содержащий QTL.

Термин "выбор с помощью маркера" (MAS) означает процесс, при котором выбирают отдельные растения на основе маркерных генотипов. Термин "контр-выбор с помощью маркера" означает процесс, с помощью которого маркерные генотипы используются для идентификации растений, которые не будут выбраны, что позволяет исключить их из программы селекции или посадки. При выборе с помощью маркера используется присутствие молекулярных маркеров, которые генетически сцеплены с определенным локусом или с определенной областью хромосомы (например, с фрагментом интрогрессии, трансгеном, полиморфизмом, мутацией и так далее), для выбора растений, у которых присутствует специфический локус или область (фрагмент интрогрессии, трансген, полиморфизм, мутация и так далее). Например, молекулярный маркер, генетически сцепленный с QTL перевариваемости, как определено в настоящем документе, может быть использован для определения и/или выбора растений, содержащих QTL на

хромосоме 9. Чем ближе генетическое сцепление молекулярного маркера с локусом (например, примерно, 7 сМ, 6 сМ, 5 сМ, 4 сМ, 3 сМ, 2 сМ, 1 сМ, 0,5 сМ или менее), тем менее вероятно, что маркер диссоциирован от локуса посредством мейотической рекомбинации. Аналогичным образом, чем ближе два маркера сцеплены друг с другом (например, в пределах 7 сМ или 5 сМ, 4 сМ, 3 сМ, 2 сМ, 1 сМ или менее), тем менее вероятно, что два маркера будут отделены друг от друга (и тем более вероятно, что они будут совместно сегрегироваться как единое целое). Термин "LOD-балл" (логарифм (основание 10) вероятности) относится к статистическому тесту, часто используемому для анализа сцеплений в популяциях животных и растений. LOD-балл сравнивает вероятность получения тестовых данных, если два локуса (локус молекулярного маркера и/или локус фенотипического признака) действительно сцеплены, с вероятностью наблюдения одинаковых данных по чистой случайности. Положительные LOD-баллы свидетельствуют о присутствии сцепления, а LOD-балл, превышающий 3,0, считается доказательством сцепления. LOD-балл со значением +3 указывает на вероятность 1000 к 1, что наблюдаемое сцепление не произошло случайно.

Термин "маркерный гаплотип" относится к комбинации аллелей в маркерном локусе.

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

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

Термин "молекулярный маркер" может использоваться для обозначения генетического маркера или его кодируемого продукта (например, белка), используемого в качестве исходной точки при идентификации сцепленного локуса. Маркер ДНК может быть получен из нуклеотидных последовательностей генома или из экспрессированных нуклеотидных последовательностей (например, из сплайсированной РНК или сДНК и так далее) или из кодируемого полипептида. Этот термин также относится к последовательностям нуклеиновых кислот, комплементарным или фланкирующим маркерные последовательности, таким как нуклеиновые кислоты, используемые в качестве зондов или пар праймеров, способных амплифицировать маркерную последовательность. Термин "молекулярный маркерный зонд" означает последовательность или молекулу нуклеиновой кислоты, которая может быть использована для идентификации присутствия маркерного локуса, например, зонда нуклеиновой кислоты, комплементарного последовательности маркерного локуса. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, в некоторых аспектах, маркерный зонд относится к зонду любого типа, который способен различать (то есть, генотип) конкретный аллель, который присутствует в маркерном локусе. Нуклеиновые кислоты "комплементарны", когда они специфически гибридизуются в растворе, например, в соответствии с правилами спаривания оснований по Уотсону-Крику. Некоторые из маркеров, описанных в настоящем документе, также относятся к маркерам гибридизации, когда они расположены в области индела, такой как неколлинеарная область, описанная в настоящем документе. Это связано с тем, что область инсерции, по определению, представляет собой полиморфизм по отношению к растению без инсерции. Таким образом, маркер должен только указывать, присутствует ли или отсутствует область индела. Для идентификации такого маркера гибридизации может быть использована любая подходящая технология определения маркера, например, технология SNP используется в примерах, приведенных в настоящем документе.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Термин "тесно сцепленный", применяемый в настоящей заявке, означает, что рекомбинация между двумя сцепленными локусами происходит с частотой, менее или равной, примерно, 10% (то есть, они разделены на генетической карте расстоянием, составляющем не более 10 сМ). Другими словами, тесно сцепленные локусы совместно сегрегируются, по меньшей мере, в 90% случаев. Маркерные локусы особенно полезны в отношении объекта настоящего изобретения, когда они демонстрируют значительную вероятность совместной сегрегации (сцепления) с желаемым признаком (например, устойчивость к серой пятнистости листьев). Тесно сцепленные локусы, такие как маркерный локус и второй локус, могут продемонстрировать частоту межлокусной рекомбинации, составляющую 10% или менее, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - примерно, 9% или менее, в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - примерно, 8% или менее, в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - примерно, 7% или менее, в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - примерно, 6% или менее, в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - примерно, 5% или менее, в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - примерно, 4% или менее, в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - примерно, 3% или менее, и в еще более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - примерно, 2% или менее. В особенно предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, соответствующие локусы демонстрируют рекомбинацию с частотой, составляющей, примерно, 1 % или менее, например, примерно, 0,75% или менее, в более предпочтительном варианте осуществле-

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

Термин "сцепление" относится к тенденции аллелей совместно сегрегироваться чаще, чем это можно было бы ожидать вследствие случайности, если их трансмиссия была независимой. Как правило, сцепление относится к аллелям, находящимся на одной и той же хромосоме. Генетическая рекомбинация происходит с предполагаемой случайной частотой по всему геному. Генетические карты строят путем измерения частоты рекомбинации между парами признаков или маркеров. Чем теснее признаки или маркеры находятся друг к другу на хромосоме, тем ниже частота рекомбинации и тем выше степень сцепления. В настоящем документе признаки или маркеры рассматриваются как сцепленные, если они, как правило, совместно сегрегируются. Вероятность рекомбинации 1/100 на поколение определяется как расстояние генетической карты, составляющее 1,0 сантиморган (1,0 cM). Термин "неравновесие по сцеплению" относится к неслучайной сегрегации генетических локусов или признаков (или и того, и другого). В любом случае, неравновесие по сцеплению подразумевает, что соответствующие локусы находятся в пределах достаточной физической проксимальности по длине хромосомы, благодаря чему они совместно сегрегируются чаще, чем со случайной частотой (то есть, с неслучайной частотой). Маркеры, которые показывают неравновесие по сцеплению, считаются сцепленными. Сцепленные локусы совместно сегрегируются более чем в 50% случаев, например, от, примерно, 51% до, примерно, 100% случаев. Другими словами, два маркера, которые совместно сегрегируются, имеют частоту рекомбинации, составляющую менее 50% (и, по определению, они разделены расстоянием, составляющем менее 50 cM, в одной и той же группе сцепления.) В контексте настоящего документа, сцепление может присутствовать между двумя маркерами или, в альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, между маркером и локусом, оказывающим влияние на фенотип. Маркерный локус может быть "ассоциирован с" (сцеплен с) признаком. Степень сцепления маркерного локуса и локуса, оказывающего влияние на фенотипический признак, измеряется, например, как статистическая вероятность совместной сегрегации этого молекулярного маркера с фенотипом (например, F-статистика или LOD-балл).

В контексте настоящего документа, термин "идентичность последовательности" относится к степени идентичности любой данной последовательности нуклеиновой кислоты к последовательности нуклеиновой кислоты-мишени. Процент идентичности последовательности вычисляется путем определения количества совпадающих положений в выровненных последовательностях нуклеиновых кислот, деления количества совпадающих положений на общее количество выровненных нуклеотидов и умножения на 100. Совпадающее положение относится к положению, в котором идентичные нуклеотиды встречаются в одном и том же положении в выровненных последовательностях нуклеиновых кислот. Процент идентичности последовательности также может быть определен для любой аминокислотной последовательности. Для определения процента идентичности последовательности, последовательность нуклеиновой кислоты-мишени или аминокислотную последовательность сравнивают с идентифицированной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью с использованием программы BLAST 2 Sequences (Последовательности) (B12seq) из автономной версии BLASTZ, содержащей BLASTN и BLASTP. Эту автономную версию BLASTZ можно приобрести на веб-сайте компании Fish & Richardson (World Wide Web по адресу fr.com/blast) или на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации правительства США (World Wide Web по адресу ncbi.nlm.nih.gov). Инструкции, объясняющие, как пользоваться программой B12seq, можно найти в файле "readme", прилагаемом к BLASTZ. B12seq выполняет сравнение двух последовательностей с использованием алгоритма BLASTN или BLASTP.

BLASTN используется для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, а BLASTP используется для сравнения аминокислотных последовательностей. Для сравнения двух последовательностей нуклеиновых кислот, параметры устанавливаются следующим образом: -i устанавливается в файл, содержащий первую последовательность нуклеиновой кислоты, подлежащую сравнению (например, C:\seq1.txt); -j устанавливается в файл, содержащий вторую последовательность нуклеиновой кислоты, подлежащую сравнению (например, C:\seq2.txt); -p устанавливается в blastn; -o устанавливается в файл с любым желаемым именем (например, C:\output.txt); -q устанавливается на - 1; -r устанавливается на 2; а для всех остальных параметров остаются их значения, установленные по умолчанию. Следующая команда будет генерировать выходной файл, содержащий сравнение двух последовательностей: C:\B12seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastn -o c:\output.txt -q - 1 -r 2. Если последовательность-мишень имеет гомологию с любым участком идентифицированной последовательности, то указанный выходной файл будет представлять эти области гомологии как выровненные последовательности. Если последовательность-мишень не имеет гомологию с любым участком идентифицированной последовательности, то указанный

выходной файл не будет представлять эти области гомологии как выровненные последовательности. После выравнивания, определяют длину путем подсчета количества последовательных нуклеотидов из последовательности-мишени, представленной в выравнивании с последовательностью из идентифицированной последовательности, начиная с любого совпадающего положения и заканчивая любым другим совпадающим положением. Совпадающее положение - это любое положение, в котором идентичный нуклеотид представлен как в последовательности-мишени, так и в идентифицированной последовательности. Гэпы, представленные в последовательности-мишени, не учитываются, поскольку гэпы не являются нуклеотидами. Аналогичным образом, гэпы, представленные в идентифицированной последовательности, не учитываются, поскольку учитываются нуклеотиды последовательности-мишени, а не нуклеотиды из идентифицированной последовательности. Процент идентичности по определенной длине определяют путем подсчета количества совпадающих положений по этой длине и деления этого количества на длину, а затем умножения полученного значения на 100. Например, если (i) последовательность нуклеиновой кислоты-мишени с основанием из 500 нуклеотидов сравнивают с рассматриваемой последовательностью нуклеиновой кислоты, (ii) программа B12seq представляет 200 оснований из последовательности-мишени, выровненной с областью рассматриваемой последовательности, где первое и последнее основания этой области из 200 оснований совпадают, и (iii) количество совпадений по этим 200 выровненным основаниям равно 180, то последовательность нуклеиновой кислоты-мишени с основанием из 500 нуклеотидов имеет длину 200, а идентичность последовательности по этой длине составляет 90% (то есть, $180 / 200 \times 100 = 90$). Следует иметь в виду, что каждая из различных областей в пределах одиночной последовательности нуклеиновой кислоты-мишени, выровненной с идентифицированной последовательностью, может иметь свой собственный процент идентичности. Следует отметить, что значение процента идентичности округляется до ближайшей десятой доли. Например, 78,11, 78,12, 78,13 и 78,14 округляются до 78,1, а 78,15, 78,16, 78,17, 78,18 и 78,19 округляются до 78,2. Также следует отметить, что значение длины всегда будет целым числом.

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

Когда приводится ссылка на последовательность нуклеиновой кислоты (например, ДНК или геномной ДНК), имеющую "значительную степень идентичности последовательности" к эталонной последовательности, или имеющую идентичность последовательности, составляющую, по меньшей мере, 60%, например, по меньшей мере, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты к эталонной последовательности, в одном варианте осуществления настоящего изобретения, упомянутая нуклеотидная последовательность считается в значительной степени идентичной данной нуклеотидной последовательности и может быть идентифицирована с использованием жестких условий гибридизации. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты содержит, по меньшей мере, одну мутацию, по сравнению с данной нуклеотидной последовательностью, однако может быть идентифицирована с использованием жестких условий гибридизации. "Жесткие условия гибридизации" могут быть использованы для идентификации нуклеотидных последовательностей, которые в значительной степени идентичны данной нуклеотидной последовательности. Жесткие условия зависят от последовательности и будут различаться в разных обстоятельствах. Как правило, жесткие условия выбирают с учетом температуры, которая, примерно, на 5° С ниже точки термического плавления (T_m) для специфических последовательностей при определенной ионной силе и pH. T_m - это температура (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% последовательности-мишени гибридизуются с идеально совпадающим зондом. Как правило, выбирают жесткие условия, при которых концентрация соли составляет, примерно, 0,02 моляра при pH 7 и температуре, по меньшей мере, 60°С. Снижение концентрации соли и/или повышение температуры повышает жесткость. Жесткие условия для гибридизации РНК-ДНК (Нозерн-блоты с использованием зонда, состоящего из, например, 100 нуклеотидов) представляют собой, например, такие условия, которые включают, по меньшей мере, одну промывку в 0,2 X SSC при 63°С в течение 20 минут или эквивалентные условия. Жесткие условия для гибридизации ДНК-ДНК (Саузерн-блоты с использованием зонда, состоящего из, например, 100 нуклеотидов) представляют собой, например, такие условия, которые включают, по меньшей мере, одну промывку (обычно 2) в 0,2 X SSC при температуре, по меньшей мере, 50°С, обычно,

примерно, 55°C в течение 20 мин или эквивалентные условия. См. также Сэмбрук и др. (1989) и Сэмбрук и Рассел (2001). Примерами крайне жестких условий гибридизации являются условия, при которых гибридизации подвергаются преимущественно только те молекулы нуклеиновой кислоты, которые имеют, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% идентичность последовательностей. Такими крайне жесткими условиями гибридизации являются, например: гибридизация в 4 X SSC при 65° С с последующими многократными промывками в 0,1 X SSC при 65°C в течение, приблизительно, 1 часа. Используемый в настоящем документе термин "крайне жесткие условия гибридизации" также может означать: гибридизацию при 68°C в 0,25 М фосфата натрия, pH 7,2, 7% SDS, 1 mM EDTA и 1% BSA в течение 16 часов с последующей двукратной промывкой 2 X SSC и 0,1% SDS при 68°C. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, гибридизация происходит в жестких условиях. Менее жесткими условиями гибридизации являются, например: гибридизация в 4 X SSC при 37°C с последующими многократными промывками в 1 X SSC при комнатной температуре.

В контексте настоящего документа, F35H (код фермента ExPASy, EC 1.14.13.88) относится к гену или белку флавоноид 3',5'-гидроксилазы. F35H также известен как F3'5'H, F3', 5'H, цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы, или флаванон, НАДФН:кислород-оксидоредуктаза. F35H катализирует следующую реакцию: флаванон + 2 НАДФН + 2 O(2) \rightleftharpoons 3',5'-дигидроксифлаванон + 2 НАДФ(+) + 2 H(2)O.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, или выбора растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), ассоциированного с улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - с улучшенной перевариваемостью стерни, причем упомянутый аллель QTL содержит нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, или выбора растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, содержащему выделение генетического материала из, по меньшей мере, одной клетки растения или части растения, и скрининга в упомянутом генетическом материале на присутствие аллеля QTL, ассоциированного с улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - с улучшенной перевариваемостью стерни, причем, упомянутый аллель QTL содержит нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, или выбора растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL (например, в генетическом материале,

выделенном из растения или части растения), ассоциированного с улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - с улучшенной перевариваемостью стерни, причем, упомянутый аллель QTL содержит нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, и выбора растения или части растения, в котором присутствует аллель QTL.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, или выбора растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, содержащему выделение генетического материала из, по меньшей мере, одной клетки растения или части растения, скрининга в упомянутом генетическом материале на присутствие аллеля QTL, ассоциированного с улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - с улучшенной перевариваемостью стерни, причем, упомянутый аллель QTL содержит нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, и выбора растения или части растения, в котором присутствует аллель QTL.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления

настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, или выбора растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), содержащего нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, или выбора растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, содержащему выделение генетического материала из, по меньшей мере, одной клетки растения или части растения, и скрининга в упомянутом генетическом материале на присутствие аллеля QTL, содержащего нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, или выбора растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, содержащему скрининг на присутствие аллеля QTL (например, в генетическом материале, выделенном из растения или части растения), содержащего нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, и выбора растения или части растения, в котором присутствует аллель QTL.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, или выбора растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, содержащему выделение генетического материала из, по меньшей мере, одной клетки растения или части растения, скрининга в упомянутом генетическом материале на присутствие аллеля QTL, содержащего нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, и выбора растения или части растения, в которой присутствует аллель QTL.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, растение представляет собой кукурузу, и аллель QTL расположен на хромосоме 9 и содержит, и/или фланкирован (молекулярными) маркерными аллелями ma61070s01 и ma30168s02, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma50827s01 и ma16983s02, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma17117s01 и ma61125s01.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, растение представляет собой кукурузу, и аллель QTL расположен на хромосоме 9 и содержит (молекулярный) маркерный аллель ma61134xxx.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, растение представляет собой кукурузу, и аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем и/или фланкированном (молекулярными) маркерными аллелями ma61070s01 и ma30168s02, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma50827s01 и ma16983s02, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma17117s01 и ma61125s01.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, растение представляет собой кукурузу, и аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем маркерный аллель ma61134xxx, и/или, по меньшей мере, один молекулярный маркерный аллель расположен на хромосомном интервале на хромосоме 9, фланкированной маркерными аллелями ma61070s01 и ma30168s02, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma50827s01 и ma16983s02, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma17117s01 и ma61125s01, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, по меньшей мере, один молекулярный маркерный аллель определяется полинуклеиновой кислотой, например, аллель-специфической полинуклеиновой кислотой (молекулярным маркером), подходящей для гибридизации в качестве прямого праймера и обратного праймера для локуса на хромосомном интервале, который совместно сегрегируется с улучшенной перевариваемостью.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, или выбора растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления на-

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или мРНК) F35H, в частности, F35H дикого типа или нативного F35H, изменен, то растение или часть растения имеет улучшенную перевариваемость. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или мРНК) F35H, в частности, F35H дикого типа или нативного F35H, изменен, по сравнению с эталонным уровнем экспрессии, то растение или часть растения имеет улучшенную перевариваемость. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или мРНК) F35H, в частности, F35H дикого типа или нативного F35H, изменен, по сравнению с эталонным уровнем экспрессии в эталонном растении и части растения, то растение или часть растения имеет улучшенную перевариваемость. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, эталонным растением (или частью растения) является инбредная линия кукурузы PH207, как описано в работе "Проект сборки элитной инбредной линии PH207 дает представление о геномном и транскриптомном разнообразии кукурузы", Хирш и др., Plant Cell. 2016, ноябрь; 28(11): 2700-2714. Опубликовано онлайн 2016 1 ноября, doi: 10.1105/tpc.16.00353, или растение кукурузы, содержащее аллель QTL, содержащий нуклеотидную последовательность дикого типа или нативную (немутированную) нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H) (например, полученный из PH207), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - эталонное растение (или часть растения) получено из почти изогенной линии.

В контексте настоящего документа, измененные (белка и/или мРНК) уровни экспрессии относятся к повышенным или пониженным уровням экспрессии, примерно, по меньшей мере, на 10%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на 30%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на 50%, например, по меньшей мере, на 20%, 40%, 60%, 80% или более, например, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95% или более.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или мРНК) F35H, в частности, F35H дикого типа или нативного F35H, уменьшен, или экспрессия (по существу) отсутствует или элиминирована, то растение или часть растения имеет улучшенную перевариваемость. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или мРНК) F35H, в частности, F35H дикого типа или нативного F35H, уменьшен, или экспрессия (по существу) отсутствует или элиминирована, по сравнению с эталонным уровнем экспрессии, то растение или часть растения имеет улучшенную перевариваемость. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, если уровень экспрессии (белка и/или мРНК) F35H, в частности, F35H дикого типа или нативного F35H, уменьшен, или экспрессия (по существу) отсутствует или элиминирована, по сравнению с эталонным уровнем экспрессии в эталонном растении или части растения, то растение или часть растения имеет улучшенную перевариваемость. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, эталонным растением (или частью растения) является инбредная линия кукурузы PH207, как описано в работе "Проект сборки элитной инбредной линии PH207 дает представление о геномном и транскриптомном разнообразии кукурузы", Хирш и др., Plant Cell. 2016, ноябрь; 28(11): 2700-2714. Опубликовано онлайн 2016 1 ноября, doi: 10.1105/tpc.16.00353, или растение кукурузы, содержащее аллель QTL, содержащий нуклеотидную последовательность дикого типа или нативную (немутированную) нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H) (например, полученный из PH207), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - эталонное растение (или часть растения) получено из почти изогенной линии.

В контексте настоящего документа, уменьшенные (белка и/или мРНК) уровни экспрессии относятся к уровням экспрессии, пониженным, примерно, по меньшей мере, на 10%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на 30%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на 50%, например, по меньшей мере, на 20%, 40%, 60%, 80% или более, например, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95% или более. Экспрессия (по существу) отсутствует или элиминирована, если уровни экспрессии уменьшены, по меньшей мере, на 80%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на 90%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на 95%. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, экспрессия (по существу) отсутствует, если невозможно определить белок и/или мРНК, в частности, белок дикого типа или нативный белок, и/или мРНК, например, стандартными методами определения, включая, например, (количественную) PCR, нозерн-блот, вестерн-блот, ELISA и другие.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, или выбора растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, содержащему скрининг (например, в

упомянутом генетическом материале на присутствие молекулярного маркерного аллеля та61134xxx, и/или, по меньшей мере, одного молекулярного маркерного аллеля, расположенного на хромосомном интервале на хромосоме 9, фланкированной маркерными аллелями та61070s01 и та30168s02, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями та50827s01 и та16983s02, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями та17117s01 и та61125s01, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, по меньшей мере, один молекулярный маркерный аллель определяется полинуклеиновой кислотой, например, аллель-специфической полинуклеиновой кислотой (молекулярным маркером), подходящей для гибридизации в качестве прямого праймера и обратного праймера для локуса на хромосомном интервале, который совместно сегрегируется с улучшенной перевариваемостью, и выбора растения или части растения, в котором присутствует, по меньшей мере, один (молекулярный) маркерный аллель.

Следует понимать, что в способах, описанных выше, когда присутствует аллель QTL или (молекулярный) маркерный аллель, то растение или часть растения идентифицируют как обладающее улучшенной перевариваемостью.

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

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу, такому как способ генерирования/производства растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, и/или улучшения перевариваемости растения или части растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - перевариваемости стерни, содержащему введение или интродуцирование в геном растения или части растения аллеля QTL, ассоциированного с улучшенной перевариваемостью, и содержащего нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы, имеющий мутацию.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу, такому как способ генерирования/производства растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, и/или улучшения перевариваемости растения или части растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - перевариваемости стерни, содержащему введение или интродуцирование в геном растения или части растения аллеля QTL, содержащего нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы, имеющий мутацию.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация приводит к измененной экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутация, приводит к получению белка F35H, обладающего измененной ферментативной активностью при трансляции, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, мутация приводит к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК упомянутого гена и/или белка F35H, к нокауту или нокадауну упомянутого гена, или мутация приводит к получению нефункционального белка F35H (например, усеченного белка F35H), или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или белка F35H, обладающего повышенной ферментативной активностью при трансляции.

В определенных вариантах осуществления обоих вышеупомянутых аспектов по настоящему изобретению, относящихся к способу генерирования/производства растения или части растения, и/или улучшения перевариваемости растения или части растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - перевариваемости стерни, аллель QTL расположен на хромосоме 9 и содержит и/или фланкирован маркерными аллелями та61070s01 и та30168s02, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями та50827s01 и та16983s02, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями та17117s01 и та61125s01.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL расположен на хромосоме 9 и содержит (молекулярный) маркерный аллель та61134xxx.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем и/или фланкированном (молекулярными) маркерными аллелями

стерни, и/или улучшения перевариваемости растения или части растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - перевариваемости стерни, содержащему изменение эндогенного гена, кодирующего ген цитохром Р450-содержащего флавоноида 3',5'-гидроксилазы, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, осуществление нокаута эндогенного гена, кодирующего ген цитохром Р450-содержащего флавоноида 3',5'-гидроксилазы.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу, такому как способ генерирования/продуцирования растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, и/или улучшения перевариваемости растения или части растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - перевариваемости стерни, содержащему изменение экспрессии мРНК гена, кодирующего ген цитохром Р450-содержащего флавоноида 3',5'-гидроксилазы (F35H), и/или кодируемого белка F35H, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, осуществление нокаута экспрессии мРНК гена, кодирующего ген цитохром Р450-содержащего флавоноида 3',5'-гидроксилазы (F35H), и/или кодируемого белка F35H.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу, такому как способ генерирования/продуцирования растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, и/или улучшения перевариваемости растения или части растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - перевариваемости стерни, содержащему изменение экспрессии мРНК гена, кодирующего цитохром Р450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы, и/или белка F35H, или изменение ферментативной активности цитохром Р450-содержащего флавоноида 5',3'-гидроксилазы (F35H), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, элиминирование или уменьшение, или ингибирование экспрессии мРНК гена, кодирующего цитохром Р450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы, или белка F35H, уменьшение ферментативной активности цитохром Р450-содержащего флавоноида 5',3'-гидроксилазы (F35H), или ингибирование белка F35H, или повышение ферментативной активности цитохром Р450-содержащего флавоноида 5',3'-гидроксилазы (F35H).

В определенных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способу, такому как способ генерирования/продуцирования растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, и/или улучшения перевариваемости растения или части растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - перевариваемости стерни, содержащему А. введение в нуклеотидную последовательность эндогенного гена растения или части растения, кодирующего цитохром Р450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы, мутации или другого генетического события, приводящего к измененной экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутации, приводящей к получению белка F35H, обладающего измененной ферментативной активностью при трансляции, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутации, приводящей к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК упомянутого гена и/или белка F35H, к нокауту или нокауту упомянутого гена, или мутации, приводящей к получению нефункционального белка F35H (например, усеченного белка F35H), или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или белка F35H, обладающего повышенной ферментативной активностью при трансляции; или В. введение в геном растения или части растения первой двухцепочечной ДНК и второй двухцепочечной ДНК, при этом, нуклеотидные последовательности кодирующих цепей первой и второй ДНК являются обратными комплементами друг друга, в результате чего транскрипт первой ДНК и транскрипт второй ДНК способны гибридизоваться с образованием двухцепочечной РНК, при этом, кодирующая цепь первой или второй ДНК содержит:

а. по меньшей мере, 19 следующих друг за другом нуклеотидов нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8, или нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60% идентичность, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 70% или, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8; или

б. нуклеотидную последовательность, которая комплементарна, по меньшей мере, 19 следующим друг за другом нуклеотидам нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8, или нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60% идентичность, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 70% или, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8; или

С. двухцепочечную РНК, при этом, одна цепь соответствует:

а. по меньшей мере, 19 следующим друг за другом нуклеотидам нуклеотидной последовательности,

представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8, или нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60% идентичность, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 70% или, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8, при этом, Т заменен на U; или

b. нуклеотидной последовательности, которая комплементарна, по меньшей мере, 19 следующим друг за другом нуклеотидам нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8, или нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60% идентичность, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 70% или, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8, при этом, Т заменен на U; или

D. введение в растение или часть растения РНК-специфической системы CRISPR/Cas, такой как система CRISPR/Cas13a, направленной или нацеливающейся на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, или в геном растения или часть растения, по меньшей мере, одной полинуклеотидной последовательности, кодирующей (и экспрессирующей или способной экспрессировать) упомянутую РНК-специфическую систему CRISPR/Cas; или

E. введение в растение или часть растения химического соединения или антитела, изменяющего (или способного изменять) ферментативную активность белка F35H при взаимодействии с упомянутым белком F35H, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - уменьшающего (или способного уменьшать) ферментативную активность белка F35H или ингибирующего (или способного ингибировать) ферментативную активность белка F35H, или повышающего (или способного повышать) ферментативную активность белка F35H при взаимодействии с упомянутым белком F35H.

В определенных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способу, такому как способ генерирования/продуцирования растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, и/или улучшения перевариваемости, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - перевариваемости стерни, растения или части растения, содержащему регенерацию растения из части растения вышеупомянутых модифицированных растений или из частей растения.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к растению или части растения, содержащему аллель QTL, ассоциированный с улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни, причем упомянутый аллель QTL содержит нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к растению или части растения, содержащему аллель QTL, содержащий нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация приводит к изменению экспрессии мРНК упомянутого гена и/или белка F35H, или мутация приводит к получению белка F35H, обладающего измененной ферментативной активностью при трансляции. Измененную экспрессию F35H можно осуществить, используя, например, любые способы мутагенеза, описанные в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация приводит к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК упомянутого гена и/или белка F35H, к нокауту или нокадауну упомянутого гена, или мутация приводит к получению нефункционального белка F35H (например, усеченного белка F35H) или белка F35H, обладающего уменьшенной или повышенной ферментативной активностью при трансляции. Нокаунт или нокаут F35H можно осуществить, используя, например, любые способы мутагенеза, описанные в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL расположен на хромосоме 9 и содержит, и/или фланкирован (молекулярными) маркерными аллелями ma61070s01 и ma30168s02, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma50827s01 и ma16983s02, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma17117s01 и ma61125s01.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL расположен на хромосоме 9 и содержит маркерный аллель ma61134xxx, и/или, по меньшей мере, один молекулярный маркерный аллель, расположенный на хромосомном интервале на хромосоме 9, фланкированной маркерными аллелями ma61070s01 и ma30168s02, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma50827s01 и ma16983s02, в более предпочтительном варианте

осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma17117s01 и ma61125s01, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, по меньшей мере, один молекулярный маркерный аллель определяется полинуклеиновой кислотой, например, аллель-специфической полинуклеиновой кислотой (молекулярным маркером), подходящей для гибридизации в качестве прямого праймера и обратного праймера для локуса на хромосомном интервале, который совместно сегрегируется с улучшенной перевариваемостью.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем и/или фланкированном (молекулярными) маркерными аллелями ma61070s01 и ma30168s02, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma50827s01 и ma16983s02, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma17117s01 и ma61125s01.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL расположен на хромосомном интервале, содержащем маркерный аллель ma61134xxx, и/или, по меньшей мере, один молекулярный маркерный аллель расположен на хромосомном интервале на хромосоме 9, фланкированной маркерными аллелями ma61070s01 и ma30168s02, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma50827s01 и ma16983s02, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma17117s01 и ma61125s01, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, по меньшей мере, один молекулярный маркерный аллель определяется полинуклеиновой кислотой, например, аллель-специфической полинуклеиновой кислотой (молекулярным маркером), подходящей для гибридизации в качестве прямого праймера и обратного праймера для локуса на хромосомном интервале, который совместно сегрегируется с улучшенной перевариваемостью.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к растению или части растения, содержащему нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к растению и части растения, содержащему маркерный аллель ma61134xxx и/или, по меньшей мере, один молекулярный маркерный аллель, расположенный на хромосомном интервале на хромосоме 9, фланкированной маркерными аллелями ma61070s01 и ma30168s02, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma50827s01 и ma16983s02, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma17117s01 и ma61125s01, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, по меньшей мере, один молекулярный маркерный аллель определяется полинуклеиновой кислотой, например, аллель-специфической полинуклеиновой кислотой (молекулярным маркером), подходящей для гибридизации в качестве прямого праймера и обратного праймера для локуса на хромосомном интервале, который совместно сегрегируется с улучшенной перевариваемостью.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к растению или части растения, содержащему

А. ген, кодирующий цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию или другое генетическое событие, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутацию или другое генетическое событие, приводящее к измененной экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получению белка F35H, обладающего измененной ферментативной активностью при трансляции, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - мутацию, приводящую к нокауту или нокадауну упомянутого гена, или имеющий уменьшенную или элиминированную экспрессию мРНК и/или белка гена F35H, или мутацию, или другое генетическое событие, приводящее к получению нефункционального белка F35H (например, усеченного белка F35H), или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или белка F35H, обладающего повышенной ферментативной активностью при трансляции; или

В. (стабильно интегрированную) первую двухцепочечную ДНК и (стабильно интегрированную) вторую двухцепочечную ДНК, при этом, нуклеотидные последовательности кодирующих цепей первой и второй ДНК являются обратными комплементами друг друга, в результате чего транскрипт первой ДНК и транскрипт второй ДНК способны гибридизоваться с образованием двухцепочечной РНК, при этом, кодирующая цепь первой или второй ДНК содержит:

а. по меньшей мере, 19 следующих друг за другом нуклеотидов нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8, или нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60% идентичность, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 70% или, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8; или

б. нуклеотидную последовательность, которая комплементарна, по меньшей мере, 19 следующим друг за другом нуклеотидам нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8, или нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60% идентичность, в предпочти-

тельном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 70% или, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8; или

С. двухцепочечную РНК, при этом, одна цепь соответствует:

а. по меньшей мере, 19 следующим друг за другом нуклеотидам нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8, или нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60% идентичность, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 70% или, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8, при этом, Т заменен на U; или

б. нуклеотидной последовательности, которая комплементарна, по меньшей мере, 19 следующим друг за другом нуклеотидам нуклеотидной последовательности,

представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8, или нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 60% идентичность, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 70% или, по меньшей мере, 80%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8, при этом, Т заменен на U; или

Д. РНК-специфическую систему CRISPR/Cas, такую как система CRISPR/Cas13a, направленную или нацеливающуюся на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, или, по меньшей мере, одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую (и экспрессирующую или способную экспрессировать) упомянутую РНК-специфическую систему CRISPR/Cas; или

Е. химическое соединение или антитело, изменяющее (или способное изменять) ферментативную активность белка F35H при взаимодействии с упомянутым белком F35H, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - уменьшающее (или способное уменьшать) ферментативную активность белка F35H, или ингибирующее (или способное ингибировать) белок F35H при взаимодействии с упомянутым F35H, или повышающее ферментативную активность (или способное повышать) белка F35H при взаимодействии с упомянутым белком F35H.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, растение не является новым сортом растения.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения или генерирования, или продуцирования растения или части растения, такого как растение кукурузы или сорго, или сахарный тростник, или части растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - растения кукурузы или части растения, содержащему (а) предложение первого растения, имеющего аллель QTL, такой как аллель QTL, ассоциированный с улучшенной перевариваемостью, как описано в другом месте настоящего документа, необязательно, при этом, упомянутый аллель QTL расположен на хромосомном интервале, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - на хромосоме 9, содержащей и фланкированной (молекулярными) маркерными аллелями ma1070s01 и ma30168s02, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma50827s01 и ma16983s02, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями ma17117s01 и ma61125s01, (b) скрещивание упомянутого первого

растения со вторым растением, таким как второе растение, не имеющее упомянутого аллеля QTL, (c) выбор потомства растений, имеющего упомянутый аллель QTL, и необязательно (d) сбор упомянутой части растения от упомянутого потомства.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL содержит, по меньшей мере, один маркерный аллель по настоящему изобретению, как описано в другом месте настоящего документа.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL содержит мутированный ген F35H, как описано в другом месте настоящего документа.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения или генерирования, или продуцирования растения или части растения, такого как растение кукурузы или сорго, или сахарный тростник, или части растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - растения кукурузы или части растения, содержащему (а) предложение первого растения, имеющего (молекулярный) маркерный аллель, такой как (молекулярный) маркерный аллель, ассоциированный с улучшенной перевариваемостью, как описано в другом месте настоящего документа, необязательно, при этом, упомянутый (молекулярный) маркерный аллель расположен на хромосомном интервале, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - на хромосоме 9, содержащей и флан-

кированной (молекулярными) маркерными аллелями та61070s01 и та30168s02, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями та50827s01 и та16983s02, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями та17117s01 и та61125s01; (b) скрещивание упомянутого первого растения со вторым растением, таким как второе растение, не имеющее упомянутого (молекулярного) маркерного аллеля, (c) выбор потомства растений, имеющего упомянутый (молекулярный) маркерный аллель, и, необязательно (d) сбор упомянутой части растения от упомянутого потомства.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения или генерирования, или продуцирования растения или части растения, такого как растение кукурузы или сорго, или сахарный тростник, или части растения, содержащему (a) предложение первого растения, имеющего мутированный ген F35H, или первого растения, в котором экспрессия мРНК и/или белка гена F35H изменена, как описано в другом месте настоящего документа, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - уменьшена или (по существу) элиминирована, или отсутствует, как описано в другом месте настоящего документа, необязательно, при этом, упомянутый мутированный ген F35H расположен на хромосомном интервале, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - на хромосоме 9, содержащей и фланкированной (молекулярными) маркерными аллелями та61070s01 и та30168s02, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями та50827s01 и та16983s02, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - маркерными аллелями та17117s01 и та61125s01, (b) скрещивание упомянутого первого растения со вторым растением, таким как второе растение, не имеющее упомянутого мутированного гена F35H, (c) выбор потомства растений, имеющего упомянутый мутированный ген F35H, и необязательно (d) сбор упомянутой части растения от упомянутого потомства.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL, маркерный аллель и/или мутация F35H в первом растении присутствует в гомозиготном состоянии. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL, маркерный аллель и/или мутация F35H в первом растении присутствует в гетерозиготном состоянии. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL, маркерный аллель и/или мутация F35H во втором растении присутствует в гетерозиготном состоянии. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, аллель QTL, маркерный аллель и/или мутация F35H во втором растении не присутствует.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, выбрано потомство, у которого аллель QTL, маркерный аллель и/или мутированный F35H присутствует в гомозиготном состоянии. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, выбрано потомство, у которого аллель QTL, маркерный аллель и/или мутированный F35H присутствует в гетерозиготном состоянии.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, растение представляет собой кукурузу, или часть растения происходит из кукурузы.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, растение представляет собой сорго, или часть растения происходит из сорго.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, растение представляет собой сахарный тростник, или часть растения происходит из сахарного тростника.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, способы получения растений или частей растений, как описано в настоящем документе, согласно настоящему изобретению, такие как способы получения растений или частей растений, обладающих улучшенной перевариваемостью, включают или содержат трансгенез и/или редактирование генов, и/или редактирование оснований, например, включающие CRISPR/Cas, TALEN, ZFN, мегануклеазы; (индуцированный) мутагенез, который может или не может быть случайным мутагенезом, таким как TILLING. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, способы получения растений или частей растений, как описано в настоящем документе, согласно настоящему изобретению, такие как способы получения растений или частей растений, обладающих улучшенной перевариваемостью, включают или содержат применение РНКi, которая может или не может осуществляться, содержать или включать применение трансгенов. Например, применение нетрансгенов может включать нанесение компонентов РНКi, таких как двухцепочечные siРНК, на растения или поверхности растений, например, в виде спрея. Стабильная интеграция в геном растения не требуется.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, способы получения растений или частей растений, как описано в настоящем документе, согласно настоящему изобретению, такие как способы получения растений или частей растений, обладающих улучшенной перевариваемостью, не включают или не содержат трансгенез, редактирование генов, редактирование оснований и/или мутагенез.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, способы получения растений или частей растений, как описано в настоящем документе, согласно настоящему изобретению, такие как способы получения растений или частей растений, обладающих улучшенной перевариваемостью, включают, содержат или состоят из селекции и выбора.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, способы получения растений

или частей растений, как описано в настоящем документе, согласно настоящему изобретению, такие как способы получения растений или частей растений, обладающих улучшенной перевариваемостью, не включают, не содержат или не состоят из селекции и выбора.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к растению или части растения, полученной или получаемой способами по настоящему изобретению, как описано в настоящем документе, такими как способы получения растений или частей растений, обладающих улучшенной перевариваемостью.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, ген F35H дикого типа или немутированный ген F35H содержит

(i) нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 4 или 7;

(ii) нуклеотидную последовательность, имеющую сДНК, или кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 5 или 8;

(iii) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 6 или 9;

(iv) нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 или 8; например, по меньшей мере, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательностей, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 85% идентичность последовательностей, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90% идентичность последовательностей или, по меньшей мере, 95% идентичность последовательностей;

(v) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, 6 или 9; например, по меньшей мере, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательностей, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 85% идентичность последовательностей, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90% идентичность последовательностей или, по меньшей мере, 95% идентичность последовательностей;

(vi) нуклеотидную последовательность, гибридизирующуюся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации;

и

(vii) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью по любому из пунктов (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, ген F35H дикого типа или немутированный ген F35H содержит

(i) нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 4 или 7;

(ii) нуклеотидную последовательность, имеющую сДНК, или кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 5 или 8;

(iii) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 6 или 9;

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, ген F35H дикого типа или немутированный ген F35H содержит

(i) нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 или 8; например, по меньшей мере, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательностей, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 85% идентичность последовательностей, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90% идентичность последовательностей или, по меньшей мере, 95% идентичность последовательностей; или

(ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, 6 или 9; например, по меньшей мере, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательностей, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 85% идентичность последовательностей, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90% идентичность последовательностей или, по меньшей мере, 95% идентичность последовательностей.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, ген F35H дикого типа или немутированный ген F35H содержит

(i) нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, 5 или 8; например, по меньшей мере, 65%, 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательностей, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 85% идентичность последовательностей, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90% идентичность последовательностей или, по меньшей мере, 95% идентичность последовательностей; или

(ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, 6 или 9; например, по меньшей мере, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательностей, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 85% идентичность последовательностей, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90% идентичность последовательностей или, по меньшей мере, 95% идентичность последовательностей.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, ген F35H дикого типа или немутированный ген F35H содержит

(i) нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 4 или 7;

(ii) нуклеотидную последовательность, имеющую сДНК, или кодирующую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 5 или 8;

(iii) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 6 или 9;

(iv) нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 или 8, или SEQ ID NO: 2, 5 или 8; например, по меньшей мере, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательностей, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 85% идентичность последовательностей, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90% идентичность последовательностей или, по меньшей мере, 95% идентичность последовательностей;

(v) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий, по меньшей мере, 60% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, 6 или 9; например, по меньшей мере, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательностей, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 85% идентичность последовательностей, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90% идентичность последовательностей или, по меньшей мере, 95% идентичность последовательностей;

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, ген F35H дикого типа или немутированный ген F35H содержит

(i) нуклеотидную последовательность, гибридизирующуюся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, 4 или 7, или в SEQ ID NO: 2, 5, или 8, в жестких условиях гибридизации.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, ген F35H дикого типа или немутированный ген F35H содержит

(i) нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, полученный из полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, 4 или 7, или в SEQ ID NO: 2, 5 или 8, путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты.

Специалисту в данной области техники будет ясно, что продукт гена F35H дикого типа или продукт немутированного гена F35H является функциональным продуктом гена, обладающим ферментативной активностью, как определено в другом месте настоящего документа. Специалисту в данной области техники также будет ясно, что варианты последовательностей, описанные выше для F35H дикого типа, не включают сдвиг рамки считывания или нонсенс-мутации.

В контексте настоящего документа, мутированный F35H или мутация в F35H может содержать или может относиться к любому типу мутации F35H. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация изменяет экспрессию белка F35H дикого типа или нативного белка F35H и/или mРНК. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация уменьшает или элиминирует экспрессию белка F35H (дикого типа или нативного) и/или mРНК, как описано в другом месте настоящего документа. Мутации могут оказывать влияние на транскрипцию и/или трансляцию. Мутации могут происходить в экзонах или интронах. Мутации могут происходить в регуляторных элементах, таких как промоторы, энхансеры, терминаторы, инсуляторы и так далее. Мутации могут происходить в кодирующих последовательностях. Мутации могут происходить в сайтах сигнала сплайсинга, таких как сайты донора сплайсинга или акцептора сплайсинга. Мутации могут представлять собой мутации сдвига рамки считывания. Мутации могут представлять собой нонсенс-мутации. Мутации могут представлять собой инсерцию или делецию, по меньшей мере, одного нуклеотида. Мутации могут представлять собой неконсервативные мутации (при которых, по меньшей мере, одна аминокислота дикого

типа заменена, по меньшей мере, одной аминокислотой не дикого типа). Мутации могут оказывать влияние или изменять функцию белка F35H, например, ферментативную активность. Мутации могут уменьшать или (по существу) элиминировать функцию белка F35H, например, ферментативную активность. Уменьшенная функция, такая как уменьшенная ферментативная активность, может относиться к уменьшению, примерно, по меньшей мере, на 10%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на 30%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на 50%, например, по меньшей мере, на 20%, 40%, 60%, 80% или более, например, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95% или более. (По существу) элиминированная функция, такая как (по существу) элиминированная ферментативная активность, может относиться к уменьшению, по меньшей мере, на 80%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на 90%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, на 95%. Мутации могут представлять собой доминантные отрицательные мутации. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, мутации оцениваются относительно инбредной линии кукурузы PH207, как определено в другом месте настоящего документа.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация F35H представляет собой инсерцию, по меньшей мере, одного нуклеотида в кодирующую последовательность. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация F35H представляет собой нонсенс-мутацию. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация F35H приводит к измененной экспрессии гена F35H. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация F35H приводит к нокауту гена F35H или нокауту мРНК и/или белка F35H. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация приводит к сдвигу рамки считывания кодирующей последовательности F35H. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация приводит к измененной последовательности белка, кодируемой геном F35H.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, мутация F35H представляет собой инсерцию, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - в экзон, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - инсерцию в первый экзон, по меньшей мере, одного нуклеотида, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - инсерцию сдвига рамки считывания. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, инсерция включает 187 нуклеотидов или, примерно, 187 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, инсерция находится между положениями 97 и 98 гена F35H, представленного нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1. Специалист в данной области техники может определить соответствующее положение в гомологах или ортологах F35H. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, инсерция содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, мутированный ген F35H содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, мутация представляет собой замещение, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - замещение, по меньшей мере, одной нуклеиновой кислоты, приводящее к обмену, по меньшей мере, одной аминокислоты, или приводящее к превращению кодирующей аминокислоты кодона в стоп-кодон. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, мутированный ген F35H содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 или 40. Такая нуклеотидная последовательность может быть выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 или 39. Более подробную информацию о последовательности можно найти в табл. 3.

Экспрессия мРНК и/или белка F35H может быть уменьшена или элиминирована посредством мутации самого гена F35H (включая кодирующий, некодирующий и регуляторный элемент). Способы введения мутаций описаны в другом месте настоящего документа. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессия мРНК и/или белка F35H может быть уменьшена или элиминирована посредством (в частности) вмешательства в транскрипцию и/или трансляцию, например, для понижения или элиминирования транскрипции или трансляции мРНК и/или белка. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессия мРНК и/или белка F35H может быть уменьшена или элиминирована посредством (в частности) вмешательства в стабильность мРНК и/или белка, например, для уменьшения стабильности мРНК и/или белка. Например, мРНК (стабильность) может быть уменьшена посредством РНКi, как описано в другом месте настоящего документа. Также miРНК можно использовать для оказания влияния на мРНК (стабильность). В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, уменьшенная экспрессия F35H, которая достигается посредством уменьшения стабильности мРНК или белка, также охватывается термином "мутированный" F35H. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, уменьшенная экспрессия F35H, которая достигается посредством уменьшения стабильности мРНК или белка, не охватывается термином "мутированный" F35H.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, (молекулярные) маркерные аллели, которые ассоциированы с улучшенной перевариваемостью, как описано в настоящем документе, определяются следующим образом:

та61134xxx представляет собой инсерцию, по меньшей мере, одного нуклеотида между положениями 134254381 и 134254382 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - инсерцию, представленную в SEQ ID NO: 12; и/или

та61070s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 121588825 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом, упомянутый нуклеотид представляет собой А или Т, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 13; и/или

та30168s02 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 139452428 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом, упомянутый нуклеотид представляет собой А или G, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 14; и/или

та50827s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 127454426 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом, упомянутый нуклеотид представляет собой А или G, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 15; и/или

та16983s02 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 137363784 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом, упомянутый нуклеотид представляет собой А или G, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 16; и/или

та17117s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 132038900 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом, упомянутый нуклеотид представляет собой А или G, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 17; и/или

та61125s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 135947973 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом, упомянутый нуклеотид представляет собой А или G, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 18;

в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, PH207 относится к инбредной линии *Zea mays*, как описано в работе "Проект сборки элитной инбредной линии PH207 дает представление о геномном и транскриптомном разнообразии кукурузы", Хирш и др., *Plant Cell*. 2016, ноябрь; 28(11): 2700-2714. Опубликовано онлайн 2016 1 ноября, doi: 10.1105/tpc.16.00353.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, инсерция, ассоциированная с маркерным аллелем та61134xxx, представляет собой инсерцию сдвига рамки считывания. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, инсерция, ассоциированная с маркерным аллелем та61134xxx, представляет собой инсерцию нуклеотидной последовательности, представленной SEQ ID NO: 10. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, маркерный аллель та61134xxx содержит или состоит из (непрерывной) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, маркерный аллель та61070s01 содержит или состоит из (непрерывной) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, маркерный аллель та30168s02 содержит или состоит из (непрерывной) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, маркерный аллель та50827s01 содержит или состоит из (непрерывной) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, маркерный аллель та16983s02 содержит или состоит из (непрерывной) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, маркерный аллель та17117s01 содержит или состоит из (непрерывной) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, маркерный аллель та61125s01 содержит или состоит из (непрерывной) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к использованию, по меньшей мере, одного (молекулярного) маркера, описанного в настоящем документе, для идентификации растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью. В одном аспекте, настоящее изобретение отно-

сится к использованию, по меньшей мере, одного (молекулярного) маркера, описанного в настоящем документе, который способен определять, по меньшей мере, один диагностический маркерный аллель для идентификации растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью. В одном аспекте, настоящее изобретение относится к определению, по меньшей мере, одного (молекулярного) маркера, описанного в настоящем документе, для идентификации растения или части растения, обладающего улучшенной перевариваемостью.

Маркерные аллели по настоящему изобретению, описанные в настоящем документе, могут представлять собой диагностические маркерные аллели, которые могут быть использованы для идентификации или выбора растений или частей растений, обладающих улучшенной перевариваемостью, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - улучшенной перевариваемостью стерни.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к (выделенной) полинуклеиновой кислоте, содержащей (молекулярный) маркерный аллель по настоящему изобретению, или комплемент, или обратный комплемент (молекулярного) маркерного аллеля по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к полинуклеиновой кислоте, содержащей, по меньшей мере, 15 непрерывных нуклеотидов, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 15 непрерывных нуклеотидов или, по меньшей мере, 20 непрерывных нуклеотидов (молекулярного) маркерного аллеля по настоящему изобретению, или комплемент, или обратный комплемент (молекулярного) маркерного аллеля по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к полинуклеиновой кислоте, содержащей, по меньшей мере, 10 непрерывных нуклеотидов, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мере, 15 непрерывных нуклеотидов или, по меньшей мере, 20 непрерывных нуклеотидов, представленных в любом из SEQ ID NO: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18, или комплемент, или обратный комплемент, представленный в любом из SEQ ID NO: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, полинуклеиновая кислота способна различать (молекулярный) маркерный аллель по настоящему изобретению и немолекулярный маркерный аллель, например, специфически гибридизоваться с (молекулярным) маркерным аллелем по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, полинуклеиновая кислота способна гибридизоваться с уникальным фрагментом нуклеотида или участком, представленным в любом из SEQ ID NO: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18, или с комплементом, или обратным комплементом, представленным в любом из SEQ ID NO: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18. Следует понимать, что уникальный участок или фрагмент, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, относится к участку или фрагменту, содержащему SNP или соответствующие маркерные аллели по настоящему изобретению (такие как маркерные аллели ma61070s01, ma30168s02, ma50827s01, ma16983s02, ma17117s01 или ma61125s01), или к участку или фрагменту, содержащему 5' или 3' соединение вставки маркерного аллеля по настоящему изобретению, или к участку или фракции, содержащейся в пределах вставки маркерного аллеля по настоящему изобретению (такого как маркерный аллель ma61134xxx). В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, полинуклеиновая кислота или ее комплемент, или обратный комплемент не гибридизируется (по существу) или не связывается с (геномной) ДНК, происходящей из инбредной линии кукурузы PH207. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, последовательность полинуклеиновой кислоты или ее комплемент, или обратный комплемент не встречается или не присутствует в инбредной линии кукурузы PH207.

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

В определенных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к полинуклеиновой кислоте, специфически гибридизирующейся с любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18, или с ее комплементом, или обратным комплементом.

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

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

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

Следует понимать, что "специфическая гибридизация" означает, что полинуклеиновая кислота гибридизируется с (молекулярным) маркерным аллелем (например, в жестких условиях гибридизации, как определено в другом месте настоящего документа), но (по существу) не гибридизируется с полинуклеиновой кислотой, не содержащей маркерный аллель, или (по существу) не может быть использована в

качестве праймера PCR. Например, в подходящем считывающем устройстве сигнал гибридизации с маркерным аллелем или PCR-амплификация маркерного аллеля, по меньшей мер, в 5 раз, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - по меньшей мер, в 10 раз, сильнее или больше, чем сигнал гибридизации с не маркерным аллелем или с любой другой последовательностью.

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

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

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу продуцирования силосованного растительного материала или корма для животных, обладающего улучшенной перевариваемостью, содержащему (a) выращивание растения по настоящему изобретению, (b) сбор растения или его частей, (c) необязательно измельчение и/или дробление растения и (d) силосование растения, необязательно путем добавления стимулятора, такого как бактериальный инокулянт, сахар и фермент. Кроме того, настоящее изобретение относится к силосованному растительному материалу или корму для животных, продуцированному упомянутым способом.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу продуцирования биогаза или биоэтанола, содержащему следующие этапы: (a) предложение растения или частей растения по настоящему изобретению или силосованного растительного материала по настоящему изобретению и (b) продуцирование биогаза или биоэтанола из растения или силосованного растительного материала.

Аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения также подтверждаются следующими неограничивающими примерами.

Примеры

Пример 1

Эксперимент с QTL по переваримости стерни был проведен на двух популяциях ДН (двойной гаплоид). В обеих популяциях, QTL с сильным эффектом был идентифицирован в одном и том же хромосомном положении на хромосоме 9 (фиг. 1). Представляется, что область QTL не содержит ни одного из известных охарактеризованных генов метаболизма лигнина.

Анализ на основе маркеров с использованием генотипирования SNP высокой плотности посредством SNP-чипа не выявил полиморфизмов между линией, содержащей положительный аллель QTL, и другими коммерчески доступными линиями. Используя этот эффект, был проведен эксперимент по захвату последовательности с использованием линии, несущей QTL, и контрольной линии. Поскольку в то время единственной геномной эталонной последовательностью была AGPv02, зонды для захвата последовательностей были разработаны на основе этого эталона. Анализ данных оказался очень сложным из-за высокой повторяемости области и частично низкого уровня сходства между областью в B73 (AGPv02) и аллелем QTL. В результате этого эксперимента был разработан один маркер, та60405s01, показывающий полиморфизм между двумя линиями в области QTL.

Для дальнейшей идентификации, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения - полиморфных маркеров, было проведено WGS (полногеномное секвенирование) одной линии, несущей QTL. Выбирали каркасы, охватывающие мишень, и сравнивали их с эталонным геномом RH207 ("Проект сборки элитной инбредной линии RH207 дает представление о геномном и транскриптомном разнообразии кукурузы", Хирш и др., Plant Cell. 2016, ноябрь; 28(11): 2700-2714. Опубликовано онлайн 2016 1 ноября, doi: 10.1105/tpc.16.00353). Можно идентифицировать еще три полиморфных маркера (та61126d01, та61134xxx и та61125s01, см. фиг. 2). Их специфические аллели QTL уникальны, и их нельзя определить ни в одной линии KWS, используемой для селекции силосной кукурузы.

Тонкое картирование QTL сузило область сначала до 16,7 млн.п.о., а на последнем этапе - до, примерно, 719 т.п.о. на эталонной линии RH207 (см. фиг. 3 и табл. 1). На фиг. 3 показаны два семейства рекомбинантов, полученных из линии QTL (B), скрещенной с линией, не несущей QTL (A). Указанное значение DNDF представляет собой среднее значение для всех членов семейства с QTL или без QTL, соответственно. Маркер, который лучше всего ассоциирован с фенотипом в последних рекомбинантах, представляет собой та61134xxx. Он представляет собой инсерцию из 187 п.о. в гене, кодирующем цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (называемый F35H, см. фиг. 4). Эта инсерция вызывает удлинение N-конца белка и ранний стоп-кодон, приводящий, вероятно, к нокауту гена. Соответствующий ген AGPv02 экспрессируется в листьях и стебле. Он стоит в начале метаболизма флавоноида, забирая ресурсы из метаболического пути лигнина.

Таблица 1
Список маркеров для QTL силоса или гена, как такового.

маркер	хром	генетическая карта [положение в сМ]	обычная линия PH207 [положение в п.о.]
ma61070s01	9		121588825
ma50827s01	9		127454426
ma17117s01	9		132038900
ma60405s01	9	55,054	133444836
ma61134xxx	9	55,98	134254381
ma61125s01	9	56,224	135947973
ma16983s02	9		137363784
ma30168s02	9		139452428

В пределах области, включающей 133,4-135,9 млн.п.о., хромосомы 9 в линии PH207 все остальные гипотетические гены, полученные из внутренней маркерной аннотации PH207, были проверены на полиморфизм между линией QTL и PH207. Из более чем 100 генов, только описанный показал полиморфизм. 79 генов были идентичны. Остальные были в основном повторяющимся или только частично представленными в сборке QTL-линии.

Капиллярный маркер ma61134xxx мог бы быть преобразован в пару доминантных маркеров KASP и в кодоминантный маркер KASP, все три доступны для использования в установленном порядке.

Наиболее важный диагностический маркер ma61134xxx направлен на инсерцию в причинный ген. Инсерция присутствует в генотипе, несущем QTL силоса, и отсутствует в эталонной линии PH207. В PH207 следующая последовательность не присутствует в гене (SEQ ID NO: 10):

СТТСТGCCCAGAAGCGGGCCCAGACATTTGAGATTGGGTATTCAAAAATTCA AAAGAT-
TAAAGAATTTAGTGTTCCTAACGCTATTTTATGCAATACATTATTGACAAAT TAGTGTTCCTAACAC-
TATAGATCACCACAAAACATGGGTATTCAATGAATACCCATGAA ACCCCCCTGGGCCCGCCCATG

Специалист в данной области техники может сконструировать маркеры для известных маркерных систем, которые позволяют определять присутствие или отсутствие инсерции.

Кроме того, специалист в данной области техники также может найти маркеры для известных маркерных систем, которые подходят для дальнейшего анализа области QTL силоса, а также маркеры, обладающие диагностической ценностью, основанные, например, на однонуклеотидных полиморфизмах (SNP) или Инделях (см. примеры в табл. 2).

Таблица 2
Маркерные аллели в линии QTL

Маркер	Аллель линии QTL
ma61070s01	T (содержащийся в SEQ ID NO: 13)
ma50827s01	A (содержащийся в SEQ ID NO: 15)
ma17117s01	A (содержащийся в SEQ ID NO: 17)
ma61134xxx	cttctgcccagaagcgggcccagacatttgagattgggtattcaaaaattcaaaagattaa agaatttagtgttctaacgctattttatgcaatacattattgacaaattagtgttctaacactata gatcaccacaaaacatgggtattcaatgaatacccatgaaacccccctgggcccggccatg (SEQ ID NO: 10, (содержащийся в SEQ ID NO: 12))
ma61125s01	G (содержащийся в SEQ ID NO: 18)
ma16983s02	G (содержащийся в SEQ ID NO: 16)
ma30168s02	G (содержащийся в SEQ ID NO: 14)

В заключение, настоящее изобретение описывает идентификацию маркерного гаплотипа, охватывающего 3,8 млн.п.о. линии PH207 (см. фиг. 2), и содержит описание генотипа линии QTL в области-мишени. Набор маркеров, идентифицированных в ходе картирования (см. табл. 1 и 2), может быть использован для интеграции положительного QTL в любой релевантный генетический фон. Наиболее важным является диагностический маркер для инсерции, которая представляет собой функциональную мутацию. Однако использование маркеров вне гена во фланкирующей области, тесно сцепленной с геном, также может быть использовано для идентификации генотипа линии QTL. Уникальный гаплотип марке-

ров (см. фиг. 2) может использоваться для различного применения с использованием маркеров, то есть, для интрогрессии признаков посредством обратного скрещивания или прямой селекции, а также для мониторинга присутствия уникального гаплотипа силоса. Кроме того, разработанные маркеры могут быть использованы для увеличения генетической вариации в этой хромосомной области и сохранения эффективного аллеля силоса. Далее описывается идентификация гена для мишени: Знание о гене и обнаруженной инсерции (функциональной мутации) может быть использовано для увеличения генетической вариации в этом локусе либо посредством TILLING, либо посредством редактирования генома, либо посредством генетической модификации для дальнейшего усиления эффекта.

Пример 2

Для функциональной валидации проводят анализы по секвенированию РНК на листовом материале двух линий QTL, несущих мутированный F35H в зубчике и кремневом фоне. Линия 5F279 без мутированного F35H служит контролем. Результаты показывает, что инсерция экспрессирована и вызывает сдвиг рамки считывания (фиг. 5).

Кроме того, были идентифицированы и спрогнозированы несколько мутантов TILLING для нативного гена F35H в популяции с EMS TILLING линии PH207 (табл. 3). Для валидации были использованы два мутанта TILLING (P434L (называемый PH207m023a) и W426stop (называемый PH207m023b)).

Таблица 3

Идентифицированные и спрогнозированные (*) мутанты TILLING

ген	ID (идентификационный номер) мутанта	мутация	гДНК	белок
F35H-МУТИРОВАННЫЙ	PH207m023a	P434L	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
F35H-МУТИРОВАННЫЙ	PH207m023b	W426stop	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22
F35H-МУТИРОВАННЫЙ	PH207m023c	R252W	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
F35H-МУТИРОВАННЫЙ	PH207m023d	R405H	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
F35H-МУТИРОВАННЫЙ	PH207m023e	P407L	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28
F35H-МУТИРОВАННЫЙ	PH207m023f	E427K	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30
F35H-МУТИРОВАННЫЙ	PH207m023g	G450R	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32
F35H-МУТИРОВАННЫЙ	PH207m023h*	P429S	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 34
F35H-МУТИРОВАННЫЙ	PH207m023i*	P429L	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36
F35H-МУТИРОВАННЫЙ	PH207m023j*	R436C	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38
F35H-МУТИРОВАННЫЙ	PH207m023k*	Q44stop	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40

Уже в ходе предварительного исследования было установлено, что идентифицированный эффект QTL можно быстро подвергнуть скринингу в тепличных условиях. В первом поколении, из семян от новых идентифицированных мутантов F35H вырастили растения, выбрали самоопыляющиеся и гомозиготные растения дикого типа, и гомозиготные растения-мутанты. Каждый гомозиготный класс представляет один класс. Классы отличаются различной фиксацией фоновых мутаций. Из этих выбранных гомозиготных семян были выращены растения для фенотипирования во втором поколении. Таким образом, можно провести исследование и фенотипирование различных классов мутантов. Все классы исследовали на PDNDF (табл. 4), и рассчитали среднее значение для классов дикого типа и мутантов. Для группы дикого типа, среднее значение составило 56,7, а для группы мутантов - 63,7, что значительно выше.

Таблица 4
 Вегетационный опыт для быстрой валидации Мутантов для гена F35H

ген	мутант, ID	повторяемость	варианты	PDNDF
F35H- МУТИРОВАННЫЙ	RH207m023a	1	20	63,7
F35H-ДИКОГО ТИПА	RH207m023a	1	20	56,4
F35H- МУТИРОВАННЫЙ	RH207m023b	4	2	64,1
F35H-ДИКОГО ТИПА	RH207m023b	2	1	62,9

Мутантные линии показали те же или даже улучшенные эффекты в отношении перевариваемости. Таким образом, новые идентифицированные мутации в F35H представляют собой варианты аллелей, которые в значительной степени улучшают перевариваемость. В частности, мутант RH207m023a показал сильный эффект (фиг. 6).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации растения или части растения кукурузы, обладающего повышенной перевариваемостью, содержащий

а) скрининг на присутствие аллеля QTL, такого как аллель QTL, ассоциированный с повышенной перевариваемостью, при этом упомянутый аллель QTL содержит нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, приводящую к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получению нефункционального белка F35H или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или

б) скрининг на уменьшенную или отсутствующую экспрессию мРНК гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), и/или белка F35H, или на нефункциональный белок F35H, или на белок F35H, обладающий уменьшенной ферментативной активностью, или

с) скрининг на присутствие мутации, приводящей к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), и/или белка F35H, или мутации, приводящей к получению нефункционального белка F35H, или мутации, приводящей к получению белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, отличающийся тем, что способ содержит скрининг на присутствие молекулярного маркерного аллеля таb1134xxx и/или, по меньшей мере, одного молекулярного маркерного аллеля, расположенного на хромосомном интервале на хромосоме 9, фланкированной маркерными аллелями таb1070s01 и та30168s02,

при этом таb1134xxx представляет собой инсерцию, по меньшей мере, одного нуклеотида между положениями 134254381 и 134254382 хромосомы 9, относящейся к линии RH207, представленную в SEQ ID NO: 12;

таb1070s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 121588825 хромосомы 9, относящейся к линии RH207, при этом упомянутый нуклеотид представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 13; и

та30168s02 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 139452428 хромосомы 9, относящейся к линии RH207, при этом упомянутый нуклеотид представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 14.

2. Способ по п.1, который содержит скрининг на присутствие молекулярного маркерного аллеля таb1134xxx и/или, по меньшей мере, одного молекулярного маркерного аллеля, расположенного на хромосомном интервале на хромосоме 9, фланкированной маркерными аллелями та50827s01 и та16983s02;

при этом таb1134xxx представляет собой инсерцию, по меньшей мере, одного нуклеотида между положениями 134254381 и 134254382 хромосомы 9, относящейся к линии RH207, представленной в SEQ ID NO: 12;

та50827s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 127454426 хромосомы 9, относящейся к линии RH207, при этом упомянутый нуклеотид представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 15; и

та16983s02 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 137363784 хромосомы 9, относящейся к линии RH207, при этом упомянутый нуклеотид представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 16.

3. Способ по п.1, который содержит скрининг на присутствие молекулярного маркерного аллеля таb1134xxx и/или, по меньшей мере, одного молекулярного маркерного аллеля, расположенного на хромосомном интервале на хромосоме 9, фланкированной маркерными аллелями та17117s01 и таb1125s01;

при этом та61134xxx представляет собой инсерцию, по меньшей мере, одного нуклеотида между положениями 134254381 и 134254382 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, представленную в SEQ ID NO: 12;

та17117s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 132038900 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом упомянутый нуклеотид представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 17; и

та61125s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 135947973 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом упомянутый нуклеотид представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 18.

4. Генетически модифицированное растение и часть растения кукурузы, содержащее

а) аллель QTL, такой как аллель QTL, ассоциированный с повышенной перевариваемостью, при этом упомянутый аллель QTL содержит нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, приводящую к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получению нефункционального белка F35H или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции; или

б) нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, приводящую к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получению нефункционального белка F35H, или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции; или

в) нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий уменьшенную или отсутствующую экспрессию мРНК гена и/или белка F35H, или нефункционального белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью; или

г) молекулу РНКi, направленную на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, нацеливающуюся на нее или гибридизирующуюся с ней, или содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу РНКi, направленную на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, нацеливающуюся на нее или гибридизирующуюся с ней; или

е) РНК-специфическую систему CRISPR/Cas, направленную или нацеливающуюся на нуклеотидную последовательность, кодирующую цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), или, по меньшей мере, одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую упомянутую РНК-специфическую систему CRISPR/Cas.

5. Растение или часть растения по п.4, отличающееся тем, что упомянутое растение представляет собой растение кукурузы, содержащее маркерный аллель та61134xxx, который представляет собой инсерцию, по меньшей мере, одного нуклеотида между положениями 134254381 и 134254382 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, представленную в SEQ ID NO: 12.

6. Растение или часть растения по п.4 или 5, отличающееся тем, что содержит упомянутый аллель QTL, упомянутые маркерные аллели, упомянутую нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, упомянутую молекулу РНКi или упомянутую полинуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу РНКi, упомянутую РНК-специфическую систему CRISPR/Cas и/или упомянутую, по меньшей мере, одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-специфическую систему CRISPR/Cas в качестве трансгена или в качестве (генно-) отредактированного эндогена.

7. Способ повышения перевариваемости растения или части растения кукурузы, содержащий введение или интродукцию в геном растения или части растения

(а) нуклеотидной последовательности гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, приводящую к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получению нефункционального белка F35H или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или

(б) аллеля QTL, такого как аллель QTL, ассоциированный с повышенной перевариваемостью, и содержащего нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, приводящую к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получению нефункционального белка F35H, или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или упомянутый способ содержит

с) уменьшение или отсутствие экспрессии мРНК гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), и/или белка F35H, уменьшение ферментативной активности цитохром P450-содержащего флавоноида 3',5'-гидроксилазы (F35H).

8. Способ по п.7, в котором этап с) содержит

(а) введение в нуклеотидную последовательность эндогенного гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), мутации, приводящей к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутации, приводящей к получению нефункцио-

нального белка F35H или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или

(b) введение в растение или часть растения молекулы РНКi, направленной на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, нацеливающуюся на нее или гибридизирующуюся с ней, или полинуклеотидной последовательности, кодирующей молекулу РНКi, направленную на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, нацеливающуюся на нее или гибридизирующуюся с ней, или

(c) введение в растение или часть растения РНК-специфической системы CRISPR/Cas, направленной или нацеливающейся на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, или, по меньшей мере, одной полинуклеотидной последовательности, кодирующей упомянутую РНК-специфическую систему CRISPR/Cas, или

(d) введение в растение или часть растения химического соединения или антитела, изменяющего ферментативную активность белка F35H при взаимодействии с упомянутым F35H.

9. Способ продуцирования растения или части растения кукурузы, обладающего повышенной перерабатываемостью, содержащий

(a) введение или интрогрессирование в геном растения или части растения нуклеотидной последовательности гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, приводящую к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получению нефункционального белка F35H или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или

(b) введение или интрогрессирование в геном растения или части растения аллеля QTL, такого как аллель QTL, ассоциированный с повышенной перерабатываемостью, и содержащего нуклеотидную последовательность гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), имеющий мутацию, приводящую к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутацию, приводящую к получению нефункционального белка F35H или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или

(c) введение в нуклеотидную последовательность эндогенного гена, кодирующего цитохром P450-содержащий флавоноид 3',5'-гидроксилазы (F35H), мутации, приводящей к уменьшенной или отсутствующей экспрессии мРНК гена и/или белка F35H, или мутации, приводящей к получению нефункционального белка F35H или белка F35H, обладающего уменьшенной ферментативной активностью при трансляции, или

(d) введение в растение или часть растения молекулы РНКi, направленной на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, нацеливающуюся на нее или гибридизирующуюся с ней, или полинуклеотидной последовательности, кодирующей молекулу РНКi, направленную на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, нацеливающуюся на нее или гибридизирующуюся с ней, или

(e) введение в растение или часть растения РНК-специфической системы CRISPR/Cas, направленной или нацеливающейся на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок F35H, или, по меньшей мере, одной полинуклеотидной последовательности, кодирующей упомянутую РНК-специфическую систему CRISPR/Cas, или

(f) введение в растение или часть растения химического соединения или антитела, уменьшающего ферментативную активность белка F35H при взаимодействии с упомянутым F35H.

10. Способ по п.9, который содержит этап g) регенерирование растения из части растения по любому из пунктов (a)-(e).

11. Растение или часть растения кукурузы, полученное способом по пп.9, 10.

12. Растение или часть растения кукурузы по пп.4-6, 11, отличающееся тем, что QTL расположен на хромосоме 9 и содержит и/или фланкирован маркерными аллелями ma61070s01 и ma30168s02, предпочтительно маркерными аллелями ma50827s01 и ma16983s02, более предпочтительно маркерными аллелями ma17117s01 и ma61125s01;

при этом ma61070s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 121588825 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом упомянутый нуклеотид представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 13; и

ma30168s02 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 139452428 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом упомянутый нуклеотид представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 14; и

ma50827s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 127454426 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом упомянутый нуклеотид представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 15; и

ma16983s02 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 137363784 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом упомянутый нуклеотид представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 16; и

ma17117s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 132038900

хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом упомянутый нуклеотид представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 17; и

таб1125s01 представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении 135947973 хромосомы 9, относящейся к линии PH207, при этом упомянутый нуклеотид представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP), представленный в SEQ ID NO: 18.

13. Растение или часть растения кукурузы по пп.4-6, 11, отличающееся тем, что нуклеотидная последовательность немутированного F35H содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(i) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 4 или 7;

(ii) нуклеотидной последовательности, имеющей сДНК, представленную в SEQ ID NO: 2, 5 или 8;

(iii) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 6 или 9;

(iv) нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7 или 8;

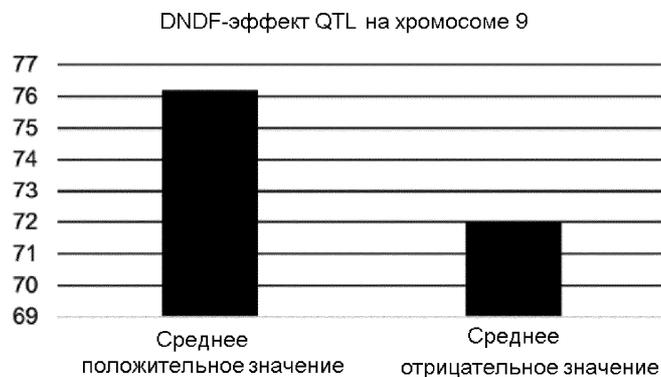
(v) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий, по меньшей мере, 80% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, 6 или 9;

(vi) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся с обратным комплементом нуклеотидной последовательности, как определено в пунктах (i), (ii) или (iii), в жестких условиях гибридизации; и

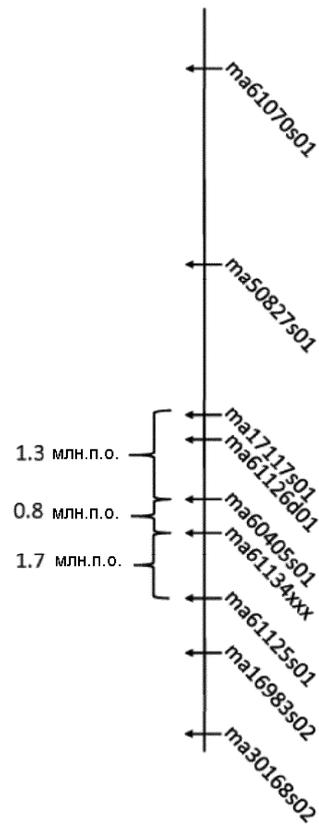
(vii) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, полученный из аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью по пунктам (i)-(vi) путем замещения, делеции и/или добавления, по меньшей мере, одной аминокислоты.

14. Растение или часть растения кукурузы по пп.4-6, 11, отличающееся тем, что мутация представляет собой мутацию со сдвигом рамки считывания или нонсенс-мутацию, которая приводит к уменьшенной или отсутствующей экспрессии нуклеотидной последовательности или уменьшенной ферментативной активности полипептида, приводит к измененной последовательности белка, кодируемой нуклеотидной последовательностью, или представляет собой инсерцию, делецию или замещение, по меньшей мере, одного нуклеотида в кодирующей области, в сигнале сплайсинга или в регуляторном элементе.

15. Применение полинуклеиновой кислоты, специфически гибридизирующейся с любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18, или с ее комплементом, или обратным комплементом для идентификации согласно способу по любому из пп.1-3 растения или части растения кукурузы, обладающего повышенной перевариваемостью.



Фиг. 1



Фиг. 2

№ в базе данных ARB	Семейство	Член семейства	Среднее значение DINDF на группу	ma61126d01	ma60405s01	PZE-109079170	ma61222s01	ma61218s01	ma61134xxx	ma612225s01	ma612226s01	ma61211s01	ma61125s01	
WVP17-51917/002	1	1	62,59	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
WVP17-51917/006	1	2		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51918/005	1	3		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51918/008	1	4		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51918/011	1	5		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51918/012	1	6		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51918/016	1	7		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51919/005	1	8		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51916/009	1	9	67,05	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	
WVP17-51917/003	1	10		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B
WVP17-51918/001	1	11		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B
WVP17-51918/009	1	12		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B
WVP17-51918/010	1	13		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B
WVP17-51919/011	1	14		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B
WVP17-51920/007	1	15		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B
WVP17-51920/017	1	16		A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B
WVP17-51940/003	2	1	57,12	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
WVP17-51941/009	2	2		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51941/010	2	3		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51941/015	2	4		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51943/014	2	5		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51945/013	2	6		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51946/003	2	7		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51947/008	2	8		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51948/001	2	9		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51948/005	2	10		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51948/007	2	11		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51949/002	2	12		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51949/011	2	13		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51949/016	2	14		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
WVP17-51940/001	2	15		60,67	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A
WVP17-51941/008	2	16			B	B	B	B	B	B	B	B	B	A
WVP17-51941/013	2	17	B		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51941/014	2	18	B		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51942/006	2	19	B		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51942/009	2	20	B		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51944/002	2	21	B		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51944/003	2	22	B		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51944/009	2	23	B		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51945/005	2	24	B		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51945/006	2	25	B		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51946/001	2	26	B		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51946/012	2	27	B		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51948/011	2	28	B		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51949/003	2	29	B		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51949/012	2	30	B		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A
WVP17-51949/017	2	31	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	

Фиг. 3

SEQ ID NO: 1	1	ATGCAGCTCGCGGCGTTGTGCACCGACCCCGTGGTGCTGTGCAGCGCCTT	50
SEQ ID NO: 11	1	ATGCAGCTCGCGGCGTTGTGCACCGACCCCGTGGTGCTGTGCAGCGCCTT	50
SEQ ID NO: 1	51	CCTCTGCCTCCTCCTCCACGTGGCTCTCCGCTCGCTGCTGCACCCTC---	97
SEQ ID NO: 11	51	CCTCTGCCTCCTCCTCCACGTGGCTCTCCGCTCGCTGCTGCACCCTCCTT	100
SEQ ID NO: 1	98	-----	97
SEQ ID NO: 11	101	CTGCCAGAAAGCGGGCCAGACATTTGAGATTGGGTATTCAAAAATCAA	150
SEQ ID NO: 1	98	-----	97
SEQ ID NO: 11	151	AAGATTAAAGAATTTAGTGTCTAACGCTATTTTATGCAATACATTATG	200
SEQ ID NO: 1	98	-----	97
SEQ ID NO: 11	201	ACAAATTAGTGTCTAACACTATAGATCACCAAAAACATGGGTATTCAAT	250
SEQ ID NO: 1	98	-----CTTCTGCCGCTCTTC	113
SEQ ID NO: 11	251	GAATACCCATGAAACCCCTGGGCCGCCATGCTTCTGCCGCTCTTC	300
SEQ ID NO: 1	114	CTCCGGGCGCCGCGGGCAGCTCCCGCCGGGGCCACCGGGCCTGCCGATCC	163
SEQ ID NO: 11	301	CTCCGGGCGCCGCGGGCAGCTCCCGCCGGGGCCACCGGGCCTGCCGATCC	350
SEQ ID NO: 1	164	TCGGCGCGCTGCCACTCGTGGGCCAGCCCCGCACGCCGGCCTGGCCGCG	213
SEQ ID NO: 11	351	TCGGCGCGCTGCCACTCGTGGGCCAGCCCCGCACGCCGGCCTGGCCGCG	400
SEQ ID NO: 1	214	CTGGCGCGCAAGTACGGTCCCATCATGTACTGAAGATGGGCACGGCCGG	263
SEQ ID NO: 11	401	CTGGCGCGCAAGTACGGTCCCATCATGTACTGAAGATGGGCACGGCCGG	450
SEQ ID NO: 1	264	CGTGGTGGTGGCGTCCCGCGCGCGCGGACGTTCTCAAGGCGC	313
SEQ ID NO: 11	451	CGTGGTGGTGGCGTCCCGCGCGCGCGGACGTTCTCAAGGCGC	500
SEQ ID NO: 1	314	TGGACGCGCGGTACGCCAACCGGCCGGCCGTGGCGAGCGCCGCGGACATC	363
SEQ ID NO: 11	501	TGGACGCGCGGTACGCCAACCGGCCGGCCGTGGCGAGCGCCGCGGACATC	550
SEQ ID NO: 1	364	ACGTACGGGCGGCAGAACATGGTGTTCGCGGACTACGGGCCAAGTGGAA	413
SEQ ID NO: 11	551	ACGTACGGGCGGCAGAACATGGTGTTCGCGGACTACGGGCCAAGTGGAA	600
SEQ ID NO: 1	464	CGGACTGGGCGTGCCTGCGGCGCGGCGAGGCCGCCACGTGCTGCGCGGC	513
SEQ ID NO: 11	651	CGGACTGGGCGTGCCTGCGGCGCGGCGAGGCCGCCACGTGCTGCGCGGC	700
SEQ ID NO: 1	514	GTGGCGGAGGCGCCGCGGCCGGCAGGCCCGTCTGCTGCGCGGAGCTGCT	563
SEQ ID NO: 11	701	GTGGCGGAGGCGCCGCGGCCGGCAGGCCCGTCTGCTGCGCGGAGCTGCT	750
SEQ ID NO: 1	564	CGTGTGCGCCCTCGCCAACATCGTGGGCGAGTACAGTGAGCAAGCGGG	613
SEQ ID NO: 11	751	CGTGTGCGCCCTCGCCAACATCGTGGGCGAGTACAGTGAGCAAGCGGG	800
SEQ ID NO: 1	614	TGTTTCGACGCGCAGGGGACGACTCGAACAGGTGAGGATGGGAGTCCAT	663
SEQ ID NO: 11	801	TGTTTCGACGCGCAGGGGACGACTCGAACAGGTGAGGATGGGAGTCCAT	850

Фиг. 4

SEQ ID NO: 1	664	GAAATCCTACCAGCTGTGAGCATGCATAAAAGTTCATTTGGAAAGAAAAG	713
SEQ ID NO: 11	851	GAAATCCTACCAGCTGTGAGCATGCATAAAAGTTCATTTGGAAAGAAAAG	900
SEQ ID NO: 1	714	AACATATTTTTCTTACAAATTTATGCTTACTGTTTCTTTAAGTTTCGATA	763
SEQ ID NO: 11	901	AACATATTTTTCTTACAAATTTATGCTTACTGTTTCTTTAAGTTTCGATA	950
SEQ ID NO: 1	764	AAGTTTGTAATAAAAAATTTAGGCTAGTTTGAAACTCCATTTAGGATTTCT	813
SEQ ID NO: 11	951	AAGTTTGTAATAAAAAATTTAGGCTAGTTTGAAACTCCATTTAGGATTTCT	1000
SEQ ID NO: 1	814	ATTTTCCAAAGAAAATAAACGAATTTCTCTTGAAAAATGAAAATCTTT	863
SEQ ID NO: 11	1001	ATTTTCCAAAGAAAATAAACGAATTTCTCTTGAAAAATGAAAATCTTT	1050
SEQ ID NO: 1	864	TAGAAAAATAGGTTCTCAAACCTAGCCCTCAATAAACTTAATGCGATCGT	913
SEQ ID NO: 11	1051	TAGAAAAATAGGTTCTCAAACCTAGCCCTCAATAAACTTAATGCGATCGT	1100
SEQ ID NO: 1	914	TTTCTCTGACTCTCATTTCATCTTTCTCTGGTTATCTAATTGGGTCCTGA	963
SEQ ID NO: 11	1101	TTTCTCTGACTCTCATTTCATCTTTCTCTGGTTATCTAATTGGGTCCTGA	1150
SEQ ID NO: 1	964	GAGATGAGTTTACCTGCTTGTCTTTATTATTGCAAAGACAACATATCTG	1013
SEQ ID NO: 11	1151	GAGATGAGTTTACCTGCTTGTCTTTATTATTGCAAAGACAACATATCTG	1200
SEQ ID NO: 1	1014	ATGCACATGGAACATTGGTGACATGGTGACATATGAAATCATCACCAC	1063
SEQ ID NO: 11	1201	ATGCACATGGAACATTGGTGACATGGTGACATATGAAATCATCACCAC	1250
SEQ ID NO: 1	1064	TCATTTTAAATCTAACGTCTATAGTTGTTTGATATATTTATTAAGGACA	1113
SEQ ID NO: 11	1251	TCATTTTAAATCTAACGTCTATAGTTGTTTGATATATTTATTAAGGACA	1300
SEQ ID NO: 1	1114	CCCTCCAACGTGGTGGTGTGTAGTGGTGGAAAGGTGTTATTTGTAAATTGA	1163
SEQ ID NO: 11	1301	CCCTCCAACGTGGTGGTGTGTAGTGGTGGAAAGGTGTTATTTGTAAATTGA	1350
SEQ ID NO: 1	1164	ATAATCAACTAGAGACGTTAGATCTAAAATGAGTGGTGATGATTTAATAT	1213
SEQ ID NO: 11	1351	ATAATCAACTAGAGACGTTAGATCTAAAATGAGTGGTGATGATTTAATAT	1400
SEQ ID NO: 1	1214	GTGCACCATGTGCACCAGTCTTCTATGTGCACCAGATATGTCCTCTATTG	1263
SEQ ID NO: 11	1401	GTGCACCATGTGCACCAGTCTTCTATGTGCACCAGATATGTCCTCTATTG	1450
SEQ ID NO: 1	1264	CAAATGCTAGACGGAACACCAGCTAGCACTAGCAGACTGTTTATGTGGAA	1313
SEQ ID NO: 11	1451	CAAATGCTAGACGGAACACCAGCTAGCACTAGCAGACTGTTTATGTGGAA	1500
SEQ ID NO: 1	1314	AGAAAAAACTTAAAAAGATCAGCTAGGAAGCTGCTGTCATCTGTACGTAT	1363
SEQ ID NO: 11	1501	AGAAAAAACTTAAAAAGATCAGCTAGGAAGCTGCTGTCATCTGTACGTAT	1550
SEQ ID NO: 1	1364	ATATGGTGAAGACTGAACAATCTGCATGACAAGCAAACTTAGCTTAAAA	1413
SEQ ID NO: 11	1551	ATATGGTGAAGACTGAACAATCTGCATGACAAGCAAACTTAGCTTAAAA	1600
SEQ ID NO: 1	1414	GCGAAAAGAGCGATGGAAACGGCCGCTCGATAAATAATTAATGAGAGTCT	1463
SEQ ID NO: 11	1601	GCGAAAAGAGCGATGGAAACGGCCGCTCGATAAATAATTAATGAGAGTCT	1650
SEQ ID NO: 1	1464	TGGGATTTTTCATGCATGGAAAAAACAAGCTGGCATTTTTCATCTAAT	1513
SEQ ID NO: 11	1651	TGGGATTTTTCATGCATGGAAAAAACAAGCTGGCATTTTTCATCTAAT	1700

Фиг. 4 (продолжение)

SEQ ID NO: 1	1514	ATAATATATAACGCTGATATCATATTGCGTGCAGATACAAGGACATGATC	1563
SEQ ID NO: 11	1701	ATAATATATAACGCTGATATCATATTGCGTGCAGATACAAGGACATGATC	1750
SEQ ID NO: 1	1564	GTGTCGCTGCTGACCGGCACGGGCATGTTCAACATCAGCGACTTCGTGCC	1613
SEQ ID NO: 11	1751	GTGTCGCTGCTGACCGGCACGGGCATGTTCAACATCAGCGACTTCGTGCC	1800
SEQ ID NO: 1	1614	GGCGCTGGCGCTCTGGACCTGCAGGGCGTGCAGGCGAAGCTGCGGCGCG	1663
SEQ ID NO: 11	1801	GGCGCTGGCGCTCTGGACCTGCAGGGCGTGCAGGCGAAGCTGCGGCGCG	1850
SEQ ID NO: 1	1664	TCCACCGCCAGTTCGACGGCCTCATCACCAAGCTGCTGGCCGAGCAGCC	1713
SEQ ID NO: 11	1851	TCCACCGCCAGTTCGACGGCCTCATCACCAAGCTGCTGGCCGAGCAGCC	1900
SEQ ID NO: 1	1714	GCGACGGCCGCGGACCGCGCGCCAGGGCCGCCCGGACTTCGTCGACCG	1763
SEQ ID NO: 11	1901	GCGACGGCCGCGGACCGCGCGCCAGGGCCGCCCGGACTTCGTCGACCG	1950
SEQ ID NO: 1	1764	GCTCCGCGCCACGATGGACGCGCGCCGCGCCGCGGACGACGAGAGCGGG	1813
SEQ ID NO: 11	1951	GCTCCGCGCCACGATGGACGCGCGCCGCGCCGCGGACGACGAGAGCGGG	2000
SEQ ID NO: 1	1814	AGACCATCACCGAGGTCAACATCAAGGGCCTCATCTTCGTAAGCTCCCTG	1863
SEQ ID NO: 11	2001	AGACCATCACCGAGGTCAACATCAAGGGCCTCATCTTCGTAAGCTCCCTG	2050
SEQ ID NO: 1	1864	CTTTTTCCTCGCCCCAACCATGCATCATATGCACTTATATTTTACA	1913
SEQ ID NO: 11	2051	CTTTTTCCTCGCCCCAACCATGCATCATATGCACTTATATTTTACA	2100
SEQ ID NO: 1	1914	CTTGCTCGGTTTTTCCTTTAGTAACACTAATAATCCGTCGCAGCTGCGATAC	1963
SEQ ID NO: 11	2101	CTTGCTCGGTTTTTCCTTTAGTAACACTAATAATCCGTCGCAGCTGCGATAC	2150
SEQ ID NO: 1	1964	ACGTAGCACTAGTACTACAGCGATGGGTATCGGTAAGTGAATCTAAGGT	2013
SEQ ID NO: 11	2151	ACGTAGCACTAGTACTACAGCGATGGGTATCGGTAAGTGAATCTAAGGT	2200
SEQ ID NO: 1	2014	GCAATAGAGTGCACGGCCGCGGGATCATGGCGTGACATGGGAGCTAAGCT	2063
SEQ ID NO: 11	2201	GCAATAGAGTGCACGGCCGCGGGATCATGGCGTGACATGGGAGCTAAGCT	2250
SEQ ID NO: 1	2064	AAGCCAGTGGCCACCTAACGAAGGCACTGACCGAAAAGCTCAGTGGCGTGT	2113
SEQ ID NO: 11	2251	AAGCCAGTGGCCACCTAACGAAGGCACTGACCGAAAAGCTCAGTGGCGTGT	2300
SEQ ID NO: 1	2114	TAGGTGGAGATAGTGGATCGAGTTGTTGGAAAGACAATATCAAACCACT	2163
SEQ ID NO: 11	2301	TAGGTGGAGATAGTGGATCGAGTTGTTGGAAAGACAATATCAAACCACT	2350
SEQ ID NO: 1	2164	CTCCAATTGATGATGTGTAGGGCCTGCAGTGTGTTTGAATCCACCTTGTTT	2213
SEQ ID NO: 11	2351	CTCCAATTGATGATGTGTAGGGCCTGCAGTGTGTTTGAATCCACCTTGTTT	2400
SEQ ID NO: 1	2214	GGTCGAACACATTAAGTAGAGTGAATATGGTTCCAATGTTAATTGATAGC	2263
SEQ ID NO: 11	2401	GGTCGAACACATTAAGTAGAGTGAATATGGTTCCAATGTTAATTGATAGC	2450
SEQ ID NO: 1	2264	GCGAAAGGGTCTCTAGCGTAATGGTTAAACCTTCCGAGTAGCACATCCAG	2313
SEQ ID NO: 11	2451	GCGAAAGGGTCTCTAGCGTAATGGTTAAACCTTCCGAGTAGCACATCCAG	2500
SEQ ID NO: 1	2314	GTTGGGTTTCGATCCTCTCGAGGGCGAATTTTCAAGCTTTGTTAAAAAAT	2363
SEQ ID NO: 11	2501	GTTGGGTTTCGATCCTCTCGAGGGCGAATTTTCAAGCTTTGTTAAAAAAT	2550

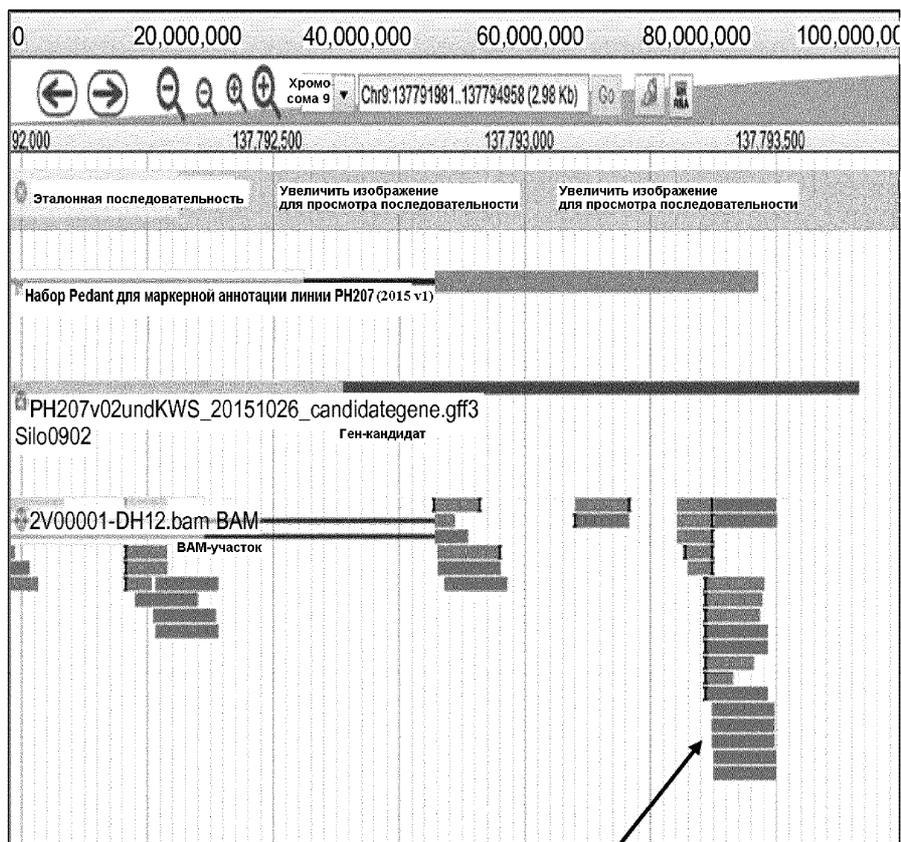
Фиг. 4 (продолжение)

SEQ ID NO: 1	2364	TATCTCGTTGTGCCCGTCCGCTCTCAGGAATCGATATTCTACACGACAC	2413
SEQ ID NO: 11	2551	TATCTCGTTGTGCCCGTCCGCTCTCAGGAATCGATATTCTACACGACAC	2600
SEQ ID NO: 1	2414	CCTCCGACTAGTGACAGTTGATTGACTCGTTAGTGATGAGAAGCCATGCT	2463
SEQ ID NO: 11	2601	CCTCCGACTAGTGACAGTTGATTGACTCGTTAGTGATGAGAAGCCATGCT	2650
SEQ ID NO: 1	2464	AAAAAAGTGGAGACGTAGATATGATAGAGGTTCCCTTTCCTAAGCAAACG	2513
SEQ ID NO: 11	2651	AAAAAAGTGGAGACGTAGATATGATAGAGGTTCCCTTTCCTAAGCAAACG	2700
SEQ ID NO: 1	2514	TGAATGCTATGAAAATTATGCAGTTTAAAAAAACTTTAAAGATAAACAG	2563
SEQ ID NO: 11	2701	TGAATGCTATGAAAATTATGCAGTTTAAAAAAACTTTAAAGATAAACAG	2750
SEQ ID NO: 1	2564	GAATTCTCTTTTTTGAACAACAACATACGAATGCACCTCCAAATATCTTA	2613
SEQ ID NO: 11	2751	GAATTCTCTTTTTTGAACAACAACATACGAATGCACCTCCAAATATCTTA	2800
SEQ ID NO: 1	2614	TCGAGTCGACTTTTATGGAATTATGTTTTTGTATTCTTAAGATGGGAG	2663
SEQ ID NO: 11	2801	TCGAGTCGACTTTTATGGAATTATGTTTTTGTATTCTTAAGATGGGAG	2850
SEQ ID NO: 1	2664	CCCAAAATCACATACAAATTATTCAGTGAATGCCTCGGTGTTTTTTTATT	2713
SEQ ID NO: 11	2851	CCCAAAATCACATACAAATTATTCAGTGAATGCCTCGGTGTTTTTTTATT	2900
SEQ ID NO: 1	2714	AGTTAAGGGCTCTCATTTTTTCAAGGGATTTTTATTTTTTCCAAAAGA	2763
SEQ ID NO: 11	2901	AGTTAAGGGCTCTCATTTTTTCAAGGGATTTTTATTTTTTCCAAAAGA	2950
SEQ ID NO: 1	2764	AAATAAACTAATCCTCTTTAGAAAAATGGAAATCTATTGGAGAAATGAGG	2813
SEQ ID NO: 11	2951	AAATAAACTAATCCTCTTTAGAAAAATGGAAATCTATTGGAGAAATGAGG	3000
SEQ ID NO: 1	2814	TTCCCTAAACTAGCTCTAACAGTGAGTCAGTTAATCAGGAGAAGATATTAG	2863
SEQ ID NO: 11	3001	TTCCCTAAACTAGCTCTAACAGTGAGTCAGTTAATCAGGAGAAGATATTAG	3050
SEQ ID NO: 1	2864	ACTCCTGTATAGTGTGCAGCAACCACATCCGATTCTGACGTTTTAGCTTA	2913
SEQ ID NO: 11	3051	ACTCCTGTATAGTGTGCAGCAACCACATCCGATTCTGACGTTTTAGCTTA	3100
SEQ ID NO: 1	2914	ATGTTTCGCTATGTAGACGTCGGGCATAGGGAATGCATTGCTACCAGAACA	2963
SEQ ID NO: 11	3101	ATGTTTCGCTATGTAGACGTCGGGCATAGGGAATGCATTGCTACCAGAACA	3150
SEQ ID NO: 1	2964	CGAATGACAGCTATGCAAGTCTCTAGAACGTTGGAGTAGTTAACAAACGT	3013
SEQ ID NO: 11	3151	CGAATGACAGCTATGCAAGTCTCTAGAACGTTGGAGTAGTTAACAAACGT	3200
SEQ ID NO: 1	3014	GATAGATGTAACCTCTGGATCATGGTATGATGTCATTTCCCTAGACTAGAA	3063
SEQ ID NO: 11	3201	GATAGATGTAACCTCTGGATCATGGTATGATGTCATTTCCCTAGACTAGAA	3250
SEQ ID NO: 1	3064	GAATTGGTAGTCAAATCGAGCAAAGTCCCAGAAAGCACACTGGGCCTTCGA	3113
SEQ ID NO: 11	3251	GAATTGGTAGTCAAATCGAGCAAAGTCCCAGAAAGCACACTGGGCCTTCGA	3300
SEQ ID NO: 1	3114	CACAGTGATACCAAAGATGCTGAAAAGAAGTGGAGCAGGATAACTGTTTC	3163
SEQ ID NO: 11	3301	CACAGTGATACCAAAGATGCTGAAAAGAAGTGGAGCAGGATAACTGTTTC	3350
SEQ ID NO: 1	3164	GGTGTGGTGTAACGACCCAAAGATGCTGAAAATAACTGATCGTCACCAT	3213
SEQ ID NO: 11	3351	GGTGTGGTGTAACGACCCAAAGATGCTGAAAATAACTGATCGTCACCAT	3400

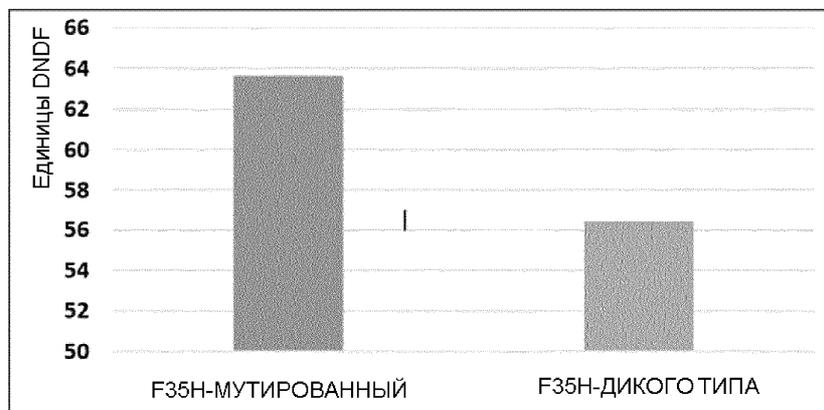
Фиг. 4 (продолжение)

SEQ ID NO: 1	3214	CCGTGAATCTAACTTTTCGACACACTGTTACCAAATCCTTCGTCAAATA	3263
SEQ ID NO: 11	3401	CCGTGAATCTAACTTTTCGACACACTGTTACCAAATCCTTCGTCAAATA	3450
SEQ ID NO: 1	3264	CAGGAATAATTAAGGCGCTTAGACGATGATAAACCATTTTTTGTCACTAA	3313
SEQ ID NO: 11	3451	CAGGAATAATTAAGGCGCTTAGACGATGATAAACCATTTTTTGTCACTAA	3500
SEQ ID NO: 1	3314	TTAACCACTGTTCTTTGCTTGACCGTGACAAAAAAACTTTTTTGTG	3363
SEQ ID NO: 11	3501	TTAACCACTGTTCTTTGCTTGACCGTGACAAAAAAACTTTTTTGTG	3550
SEQ ID NO: 1	3364	AAGCAGTGTGGCGTAAACCAACCATCATGAACTCACTGCCTTGTC	3413
SEQ ID NO: 11	3551	AAGCAGTGTGGCGTAAACCAACCATCATGAACTCACTGCCTTGTC	3600
SEQ ID NO: 1	3414	TATGTAATTTGACCATCGAACCGCGCGCTAAGACAATGCACCACCCTT	3463
SEQ ID NO: 11	3601	TATGTAATTTGACCATCGAACCGCGCGCTAAGACAATGCACCACCCTT	3650
SEQ ID NO: 1	3464	CAAGTCTTAGCTCACTGATACCGCTAATTAAGTTAGATAATGTCGATTAC	3513
SEQ ID NO: 11	3651	CAAGTCTTAGCTCACTGATACCGCTAATTAAGTTAGATAATGTCGATTAC	3700
SEQ ID NO: 1	3514	TAGTTGTCTTACTTCGAACTATTTCTTTTCGGCAAACGAAGTAAAGACA	3563
SEQ ID NO: 11	3701	TAGTTGTCTTACTTCGAACTATTTCTTTTCGGCAAACGAAGTAAAGACA	3750
SEQ ID NO: 1	3564	ACGTTTTGTTCCGCGAGGACATGTTACGGCGGGTACGGACACGTCGTCGA	3613
SEQ ID NO: 11	3751	ACGTTTTGTTCCGCGAGGACATGTTACGGCGGGTACGGACACGTCGTCGA	3800
SEQ ID NO: 1	3614	TCATCGTGGAGTGGGCGATGGCGGAGATGCTCAAGAACCCGACCGTCATG	3663
SEQ ID NO: 11	3801	TCATCGTGGAGTGGGCGATGGCGGAGATGCTCAAGAACCCGACCGTCATG	3850
SEQ ID NO: 1	3664	GCGCGCGCGCAGGAGGAGCTGGACCGCGCGGTGGGCGGGGCGGCGCCT	3713
SEQ ID NO: 11	3851	GCGCGCGCGCAGGAGGAGCTGGACCGCGCGGTGGGCGGGGCGGCGCCT	3900
SEQ ID NO: 1	3714	GGAGGAGTCGGACCTGCCCGCCTCCCTACCTGCAGGCGGTGTGCAAGG	3763
SEQ ID NO: 11	3901	GGAGGAGTCGGACCTGCCCGCCTCCCTACCTGCAGGCGGTGTGCAAGG	3950
SEQ ID NO: 1	3764	AGGCCATGCGGCTGCACCCGTCACGCGGCTCAGCCTCCCGCACTTCTCC	3813
SEQ ID NO: 11	3951	AGGCCATGCGGCTGCACCCGTCACGCGGCTCAGCCTCCCGCACTTCTCC	4000
SEQ ID NO: 1	3814	TTGGACGCCTGCGACGACGTCGACGGCTACCGCGTCCCGGCAACACCCG	3863
SEQ ID NO: 11	4001	TTGGACGCCTGCGACGACGTCGACGGCTACCGCGTCCCGGCAACACCCG	4050
SEQ ID NO: 1	3864	CCTGCTCGTCAACGCTTGGGCCATCGGCCGGACCCGGAGCCTGGGAGA	3913
SEQ ID NO: 11	4051	CCTGCTCGTCAACGCTTGGGCCATCGGCCGGACCCGGAGCCTGGGAGA	4100
SEQ ID NO: 1	3914	GGCCCTCGACTTCCGCCCGGAGCGCTTCTGCCCCGGGGCGGCGGGAG	3963
SEQ ID NO: 11	4101	GGCCCTCGACTTCCGCCCGGAGCGCTTCTGCCCCGGGGCGGCGGGAG	4150
SEQ ID NO: 1	3964	AAGGTCGACCCCTGGGGAAGTTCGAGCTCATCCGTTTCGGCGCCGG	4013
SEQ ID NO: 11	4151	AAGGTCGACCCCTGGGGAAGTTCGAGCTCATCCGTTTCGGCGCCGG	4200
SEQ ID NO: 1	4014	CCGGAGGATCTGCGCGGGGAAGCTGGCGGGCATGGTGTTCGTGCACTACT	4063
SEQ ID NO: 11	4201	CCGGAGGATCTGCGCGGGGAAGCTGGCGGGCATGGTGTTCGTGCACTACT	4250
SEQ ID NO: 1	4064	TCCTGGGCACGCTGCTGCACGCGTTCGACTGGCGCCTGCCTGACGGCGAG	4113
SEQ ID NO: 11	4251	TCCTGGGCACGCTGCTGCACGCGTTCGACTGGCGCCTGCCTGACGGCGAG	4300
SEQ ID NO: 1	4114	GAGAAGCTGGACATGAGCGAGACGTTCCGGCTCGCGCTGCCAAGGCACT	4163
SEQ ID NO: 11	4301	GAGAAGCTGGACATGAGCGAGACGTTCCGGCTCGCGCTGCCAAGGCACT	4350
SEQ ID NO: 1	4164	GCCGCTCCGCGCGCTGCCACGCCACGGCTCGTCCGGAAGCCTATGCCT	4213
SEQ ID NO: 11	4351	GCCGCTCCGCGCGCTGCCACGCCACGGCTCGTCCGGAAGCCTATGCCT	4400
SEQ ID NO: 1	4214	GA	4215
SEQ ID NO: 11	4401	GA	4402

Фиг. 4 (продолжение)



Фиг. 5



Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2