

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393511** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.03.04

(22) Дата подачи заявки
2022.05.27

(51) Int. Cl. *A01H 1/04* (2006.01)
A01H 6/46 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/6895 (2018.01)

(54) **ПШЕНИЦА, СОДЕРЖАЩАЯ АЛЛЕЛИ-ВОССТАНОВИТЕЛИ МУЖСКОЙ
ФЕРТИЛЬНОСТИ**

(31) **21305709.4**

(32) **2021.05.28**

(33) **EP**

(86) **PST/EP2022/064472**

(87) **WO 2022/248706 2022.12.01**

(71) Заявитель:
ЛИМАГРЕН ЭРОП (FR)

(72) Изобретатель:

**Комадран Жорди, Варенн Пьеррик,
Трюд Микаэль, Спекел Себастьян,
Дерори Джереми (FR)**

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к области генетики растений и селекции растений. Более конкретно, изобретение относится к растениям пшеницы, несущим гены-восстановители фертильности, специфичные для цитоплазмы *T.timopheevii* с ЦМС, в частности, аллели-восстановители Rf1, Rf3, Rf4s, Rf7 и 6R.

202393511

A1

A1

202393511

ПШЕНИЦА, СОДЕРЖАЩАЯ АЛЛЕЛИ-ВОССТАНОВИТЕЛИ МУЖСКОЙ ФЕРТИЛЬНОСТИ

Изобретение относится к области генетики растений и селекции растений. Более конкретно, изобретение относится к растениям пшеницы, несущим гены восстановителей фертильности, специфичные для цитоплазмы *T. timopheevii* (пшеницы Тимофеева) с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС).

Предшествующий уровень техники

Производство гибридов основано на скрещивании двух родительских линий для получения преимуществ гетерозиса, и фактически, для увеличения генетической variability с целью создания новых сортов или генотипов с более высокой урожайностью и лучшей адаптацией к стрессам окружающей среды. Научные исследования показали, что даже у таких преимущественно аутогамных видов, как пшеница, гибридные линии демонстрируют улучшенное качество и большую устойчивость к экологическим и биотическим стрессам.

Чтобы повысить коммерчески приемлемые показатели получения гибридов, следует избегать самооплодотворения, т.е. оплодотворения женского органа пыльцой того же растения. Необходимо, чтобы женский орган материнской формы оплодотворялся исключительно пыльцой отцовской формы.

Мужской стерильности можно достичь тремя различными способами. Ручная кастрация является простейшим способом и до сих пор используется у некоторых видов, где мужские и женские цветки разделены, например, у кукурузы. Однако это невыполнимо у таких видов, как пшеница, где цветки содержат как женские, так и мужские органы. Мужская стерильность может быть вызвана агентами химической гибридизации (АХГ) с гаметоцидным действием. В настоящее время только несколько коммерческих гибридных сортов пшеницы основаны на этой технологии, поскольку она может нести существенные финансовые риски.

Наконец, мужская стерильность также может быть индуцировано генетическим путем. Существует множество примеров гибридных систем кукурузы или сорго, основанных на мужской стерильности, индуцированной генетическим путем, демонстрирующих преимущество этой технологии по сравнению с двумя упомянутыми ранее. Однако у других видов, которые являются преимущественно самоопыляемыми, таких как пшеница, получение гибридов по-прежнему является сложной задачей (Longin et al., 2012).

Система, которая успешно использовалась для получения гибридов нескольких

сельскохозяйственных культур, включая кукурузу, рис и сорго, - это трехлинейная селекционная система, основанная на цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), генетически обусловленном признаке, который приводит к стерильности растений.

Для того чтобы обеспечить надежную и эффективную систему производства семян, необходимых для получения гибридов, обычно требуются три основных элемента: средство для индукции мужской стерильности, средство для распространения стерильности и средство для восстановления фертильности. Например, полностью генетически обоснованная система состоит из линии с мужской стерильностью (материнской формы), линии закрепителя фертильности (отцовской формы, позволяющей размножить линию с мужской стерильностью) и линии восстановителя фертильности (отцовской формы для получения гибридов).

Первый случай цитоплазматической мужской стерильности у пшеницы наблюдался в 1951 году (Kihara, 1951), где было отмечено, что стерильность была вызвана несовместимостью между цитоплазмой *Aegilops caudata* L. и ядром *T. aestivum* var. *erythrospermum*. Позже исследования цитоплазмы *T. timopheevii* показали, что эта цитоплазма способна индуцировать стерильность у пшеницы обыкновенной (*T. aestivum*) (Wilson and Ross, 1961, Crop Sci, 1: 191-193). Ранее Orf256 был идентифицирован как ген, специфичный для митохондриального генома *T. timopheevii* (Rathburn and Hedgcoth, 1991; Song and Hedgcoth, 1994), ответственный за ЦМС. Эта гипотеза была недавно опровергнута Ian Small и Joanna Melonek, которые указали на то, что митохондриальный белок Orf279 реагирует на Т-ЦМС (WO 2020/161261, Melonek and al., 2021).

Ожидалось, что такая цитоплазма может быть использована в системе производства гибридов. Однако основные ограничения возникли из-за сложности поиска полностью доминантного и стабильного гена восстановителя фертильности без отрицательных побочных эффектов (особенно в отношении урожайности).

Сообщалось о восстановлении фертильности растений с мужской стерильностью, содержащих цитоплазму *T. timopheevii* с ЦМС (цитоплазму Т-CMS), и были идентифицированы девять основных локусов-восстановителей (обозначенных как Rf1-Rf9), которые близко расположены в геноме пшеницы (Shahinnia et al., 2020). Одним из наиболее эффективных локусов-восстановителей является Rf3 (Ma and Sorrells, 1995; Kojima et al., 1997; Ahmed et al., 2001; Geyer et al., 2016). Два маркера SNP (однонуклеотидного полиморфизма) позволили определить местоположение локуса Rf3 в пределах фрагмента 2 cM на хромосоме 1B (Geyer et al., 2016).

Хотя понятно, что для восстановления нормальной фертильности пыльцы могут потребоваться два или более локусов Rf, также хорошо известно, что существуют локусы-

модификаторы, которые оказывают либо незначительный эффект при низкой пенетрантности (Zhou et al., 2005; Stojalowski et al., 2013), либо ингибирующее воздействие на фертильность, в зависимости от условий окружающей среды (Wilson et al., 1984). Пока не ясно, какая комбинация генов или локусов необходима для завершения полного восстановления T-CMS в различных генетических условиях и окружающей среде.

В этом контексте разработка технологий, позволяющих полностью восстановить фертильность пыльцы, имеет большое значение для пшеницы. В WO2019/086510 описан восстановитель фертильности растений пшеницы с некоторыми комбинациями локусов-восстановителей. Однако все еще существует необходимость в разработке новых восстановителей фертильности растений пшеницы.

Следовательно, целью настоящего изобретения является обеспечение подходящих генов-восстановителей фертильности пшеницы для разработки системы продукции гибридов, полезной для промышленного семеноводства.

Изложение сущности изобретения

Первый объект настоящего изобретения относится к восстановителю фертильности цитоплазмы растения пшеницы *T. timopheevii* с ЦМС, содержащему по меньшей мере аллели Rf1, Rf3 и Rf4s восстановителя фертильности. Он также относится к восстановителю фертильности растения пшеницы из цитоплазмы *T. timopheevii* с ЦМС, где растение содержит по меньшей мере аллели Rf1, Rf3 и 6R восстановителя фертильности.

Другой аспект относится к способу идентификации растения пшеницы путем детекции наличия по меньшей мере одного аллеля-восстановителя в пределах одного или нескольких локусов Rf1, Rf3, Rf4s, Rf7 и 6R, предпочтительно в пределах трех локусов Rf1, Rf3 и Rf4s или в пределах трех локусов Rf1, Rf3 и 6R.

Изобретение также относится к способу получения гибридного растения пшеницы, включающему этапы:

- получения первого растения пшеницы, содержащего один или два аллеля-восстановителя, выбранных среди аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf4s,
- скрещивания указанного первого растения пшеницы со вторым растением пшеницы, содержащим один или два аллеля-восстановителя, выбранных среди аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf4s, причем аллели-восстановители Rf1, Rf3 и Rf4s представлены по меньшей мере один раз в панели аллелей-восстановителей, обеспеченной первым растением и вторым растением,
- сбора гибридных семян F1,
- получения гомозиготных растений из растений F1,

- детекции наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf4s в гибридных семенах и/или в каждом поколении.

Кроме того, изобретение также относится к способу получения гибридного растения пшеницы, включающему этапы:

- получения первого растения пшеницы, содержащего один или два аллеля-восстановителя, выбранных среди аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и 6R,
- скрещивания указанного первого растения пшеницы со вторым растением пшеницы, содержащим один или два аллеля-восстановителя, выбранных среди аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и 6R, причем аллели-восстановители Rf1, Rf3 и 6R представлены по меньшей мере один раз в панели аллелей-восстановителей, обеспеченной первым растением и вторым растением,
- сбора семян гибрида F1,
- получения гомозиготных растений из растений F1,
- детекции наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и 6R в гибридных семенах и/или в каждом поколении.

Еще один аспект изобретения относится к способу получения гибридного растения пшеницы, включающему этапы:

- скрещивания стерильного материнского растения, содержащего цитоплазму *T. timopheevii*, с фертильным мужским растением пшеницы согласно изобретению;
- сбора гибридного семени;
- при необходимости детекции наличия цитоплазмы *T. timopheevii* и/или по меньшей мере трех локусов Rf, выбранных из Rf1, Rf3, Rf4s, Rf7 и 6R в гибридных семенах;
- при необходимости определения уровня гибридности гибридных семян.

Подробное описание изобретения

Восстановитель фертильности цитоплазмы растения пшеницы *T. timopheevi* с ЦМС

Авторы изобретения показали, что комбинация по меньшей мере 3 специфических аллелей-восстановителей фертильности позволяет получать растения пшеницы с полным восстановлением фертильности цитоплазмы *T. timopheevi* с ЦМС. В частности, растение пшеницы содержит по меньшей мере аллель А восстановителя фертильности, аллель В восстановителя фертильности и аллель С восстановителя фертильности.

Как применяется в настоящей заявке, восстановитель фертильности А соответствует Rf3.

Используемый в настоящей заявке восстановитель фертильности В соответствует Rf1 или Rf7.

Используемый в настоящей заявке восстановитель фертильности С соответствует Rf4s или 6R.

Следовательно, первый аспект настоящего изобретения относится к восстановителю фертильности цитоплазмы растения пшеницы *T. timopheevii* с ЦМС, в котором растение пшеницы содержит по меньшей мере три аллеля восстановителя фертильности:

- Rf3, и

- Rf1 и/или Rf7, и

- Rf4s и/или 6R. В конкретных вариантах осуществления растение пшеницы содержит по меньшей мере три аллеля восстановителя фертильности: Rf3, Rf1 и Rf4s.

В конкретных вариантах осуществления растение пшеницы содержит по меньшей мере три аллеля восстановителя фертильности: Rf3, Rf1 и 6R.

В конкретных вариантах осуществления растение пшеницы содержит по меньшей мере три аллеля восстановителя фертильности: Rf3, Rf7 и Rf4s.

В конкретных вариантах осуществления растение пшеницы содержит по меньшей мере три аллеля восстановителя фертильности: Rf3, Rf7 и 6R.

В других конкретных вариантах осуществления растение пшеницы содержит по меньшей мере четыре аллеля восстановителя фертильности: Rf3, Rf1, Rf7 и Rf4s.

В других конкретных вариантах осуществления растение пшеницы содержит по меньшей мере четыре аллеля восстановителя фертильности: Rf3, Rf1, Rf4s и 6R.

В других конкретных вариантах осуществления растение пшеницы содержит по меньшей мере четыре аллеля восстановителя фертильности: Rf3, Rf1, Rf7 и 6R.

В других конкретных вариантах осуществления растение пшеницы содержит по меньшей мере четыре аллеля восстановителя фертильности: Rf3, Rf4s, Rf7 и 6R.

Этот перечень примеров не является исчерпывающим.

Как описано в WO 2019/086510, авторы изобретения идентифицировали два типа восстановителя фертильности Rf3, один с сильным восстановлением фертильности, а другой со слабым восстановлением фертильности. Сильные и слабые аллели Rf3 могут быть связаны с этими комбинациями из трех или четырех аллелей. Слабый аллель Rf3 должен быть предпочтительно связан с четвертой комбинацией аллелей.

Всякий раз, когда делается ссылка на «растение» или «растения», подразумевается, что также части растения (клетки, ткани или органы, семенные коробочки, семена, отделенные части, такие как корни, листья, цветы, пыльца и т.д.), потомство растений, которые сохраняют отличительные характеристики родительских растений (в частности, мужскую фертильность, связанную с заявленными нуклеиновыми кислотами Rf), такие

как семена, полученные путем самоопыления или скрещивания, например, гибридные семена (полученные путем скрещивания двух инбредных родительских растений), гибридные растения и части растений, полученные из них, включены в настоящий документ, если не указано иное.

Используемый в настоящей заявке термин «Rf4s» относится к аллелю-восстановителю Rf4 из *Aegilops speltoides*.

Используемое в настоящей заявке выражение «растение пшеницы» относится к видам рода *Triticum*, таким как, например, *T. aestivum*, *T. aethiopicum*, *T. araraticum*, *T. boeoticum*, *T. carthlicum*, *T. compactum*, *T. dicoccoides*, *T. dicoccon*, *T. durum*, *T. ispahanicum*, *T. karamyshevii*, *T. macha*, *T. militinae*, *T. monococcum*, *T. polonicum*, *T. spelta*, *T. sphaerococcum*, *T. timopheevii*, *T. turanicum*, *T. turgidum*, *T. urartu*, *T. vavilovii*, *T. zhukovskyi* *Faegi*. Растение пшеницы также относится к видам родов *Aegilops* и *Triticale*.

Используемое в настоящей заявке выражение «восстановитель фертильности цитоплазмы *T. timopheevii* с ЦМС» относится к белку, экспрессия которого в растении пшеницы, содержащем цитоплазму *T. timopheevii* с ЦМС, способствует восстановлению продукции пыльцы в системе *Triticum timopheevii* с ЦМС.

Используемый в настоящей заявке термин «аллель (аллелли)» означает любую из одной или нескольких альтернативных форм гена в определенном локусе. У диплоидов аллели данного гена расположены в определенном местоположении или локусе на хромосоме. Один аллель присутствует на каждой хромосоме пары гомологичных хромосом. То же определение используют для растений, несущих более высокий уровень пloidности, как у рода *Triticum*, где, например, *T. aestivum* является гексаплоидным растением.

Используемое в настоящей заявке выражение «аллель-восстановитель цитоплазмы *T. timopheevii* с ЦМС» относится к аллелю, который способствует восстановлению продукции пыльцы в системе *Triticum timopheevii* с ЦМС.

Восстановление фертильности пыльцы может быть частичным или полным. В частности, показатель фертильности растений пшеницы F1 с цитоплазмой *CMS-T timopheevii* (от скрещиваний женских линий с ЦМС и линий-восстановителей) может быть рассчитан путем деления общего количества семян, собранных с колоса, на количество подсчитанных колосьев, и может быть сравнен с показателями фертильности контрольной группы фертильных растений, например, элитных инбредных линий, несущих нормальную цитоплазму пшеницы, выращенных на той же территории и в тех же агроэкологических условиях. Предпочтительно такие группы линий включают набор по меньшей мере из 5 элитных инбредных линий, причем эти линии являются типичными

для района, где проводят испытание на фертильность. Кроме того, предпочтительно для данного эксперимента оценивают по меньшей мере 10 колосьев от разных отдельных растений F1. Примеры испытаний на фертильность пыльцы описаны в WO2019/086510.

Если показатель фертильности не равен нулю, то растение приобрело частичное или полное восстановление фертильности. Для каждого показателя фертильности проводят статистический тест для получения р-значения. Примерами статистических тестов являются Anova или тесты сравнения средних значений. Значение р ниже порогового значения в 5% будет указывать на то, что эти два распределения статистически различаются. Следовательно, значительное снижение показателя фертильности тестируемого растения пшеницы по сравнению с показателем фертильности полностью фертильного контрольного растения указывает на то, что растение F1 не достигло полного восстановления фертильности (т.е. частичное восстановление). Аналогичный или более высокий показатель фертильности указывает на то, что растение F1 полностью восстановило фертильность. В предпочтительном варианте осуществления у растения пшеницы, такого как трансгенное или генетически модифицированное растение пшеницы, согласно настоящему изобретению отмечается полное восстановление фертильности.

Используемый в настоящей заявке термин «скрещивание» может относиться к простому скрещиванию X по Y, а также к способу возвратного скрещивания, в зависимости от контекста.

Локусы аллелей-восстановителей цитоплазмы *T. timopheevi* с ЦМС в пределах Rf1, Rf3 и Rf7 были ранее картированы в WO2019/086510. Соответствующие аллели-восстановители обозначены как аллели-восстановители Rf1, Rf3 и Rf7 и были описаны в данной области техники.

Далее, настоящим раскрывается картирование аллеля-восстановителя Rf4s и содержащего его растения пшеницы.

В частности, растительный источник пшеницы с аллелем-восстановителем Rf3 включает следующие коммерческие линии: Allezy, Altigo, Altamira, как также подробно описано в WO2019/086510. Растение пшеницы, являющееся источником аллеля-восстановителя Rf4, включает следующие линии: R113 или L13.

В конкретном варианте осуществления типичные аллели из аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf4s представлены образцом семян NCIMB 43746.

В другом конкретном варианте осуществления типичные аллели из аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и 6R представлены образцом семян NCIMB 43747.

NCIMB 43746	Triticum aestivum/озимая пшеница	LGWR20-0485
NCIMB 43747	Triticum aestivum/озимая пшеница	LGWR17-0160

Используемый в настоящей заявке термин «хромосомный интервал» обозначает непрерывный линейный участок геномной ДНК, который находится в растении на одной хромосоме. Генетические элементы или гены, расположенные на одном хромосомном интервале, физически связаны. Размер хромосомного интервала особо не ограничен. В некоторых аспектах генетические элементы, расположенные в пределах одного хромосомного интервала, генетически связаны, как правило, с расстоянием генетической рекомбинации, например, 20 сМ или менее, или альтернативно, 10 сМ или менее. То есть два генетических элемента в пределах одного хромосомного интервала подвергаются рекомбинации с частотой 20% или 10%, или менее.

Используемый в настоящей заявке «маркер» относится к конкретной последовательности ДНК, идентифицированной в геноме растения и которая может быть использована для определения того, унаследовало ли растение конкретный фенотип или аллель, представляющий интерес, от родительского растения. Указанный маркер может включать кодирующие или не кодирующие последовательности. В частности, указанный маркер может включать один или несколько однонуклеотидных полиморфизмов или SNP, идентифицированных в геноме растения.

Используемый здесь локус Rf1 относится к локусу аллеля-восстановителя Rf1, который расположен на расстоянии не более 10 сМ, предпочтительно не более 7 сМ, более предпочтительно не более 2 сМ от маркера cfn0522096 из SEQ ID NO:3 и/или от маркера cfn05277067 из SEQ ID NO:9.

В конкретном варианте осуществления восстановитель фертильности растений пшеницы согласно настоящему изобретению включает по меньшей мере один аллель-восстановитель Rf1, где указанный аллель-восстановитель Rf1 расположен в пределах хромосомного интервала между SNP-маркерами cfn0522096 из SEQ ID NO:3 и cfn0527067 из SEQ ID NO:9.

В конкретных вариантах осуществления восстановитель фертильности растений пшеницы включает один аллель-восстановитель Rf1 в локусе Rf1, характеризующийся присутствием одного или нескольких SNP аллелей, как указано в таблице 1.

Таблица 1. SNP-маркеры для картирования локуса Rf1

SNP#	Название маркера	SEQ ID NO маркера	Аллель-восстановитель
SNP1	cfn0523109	1	A
SNP2	276I13 96B22 97797	2	C
SNP3	cfn0522096	3	C
SNP4	cfn0527763	4	C
SNP5	104A4 105172	5	TG

SNP6	104A4_105588	6	A
SNP7	cfn0373248	7	T
SNP8	cfn1097828	8	C
SNP9	cfn0527067	9	A
SNP10	cfn0528390	10	G
SNP11	BWS0267	11	A
SNP12	cfn0527718	12	T
SNP13	cfn0524469	13	G
SNP14	cfn0524921	14	G
SNP15	cfn1122326	15	C
SNP16	RFL79_S7	16	G

Предпочтительно, восстановитель фертильности растений пшеницы согласно настоящему изобретению включает один аллель-восстановитель Rf1 в локусе Rf1, характеризующийся присутствием аллеля (аллелей)-восстановителя SNP2 и/или SNP6 и/или SNP16, как описано в таблице 1. Предпочтительно, восстановитель фертильности растений пшеницы характеризуется гаплотипами «С» и «А» аллелей-восстановителей SNP2 и SNP6. Более предпочтительно аллелем-восстановителем Rf1 в локусе Rf1 является SNP16, характеризующийся гаплотипом аллеля-восстановителя SNP16 «G».

В конкретных вариантах осуществления восстановитель фертильности растений пшеницы с аллелем-восстановителем Rf1 содержит нуклеиновую кислоту Rf1.

Под «нуклеиновой кислотой Rf1» подразумевается нуклеиновая кислота, содержащая ген, кодирующий белок Rf1, восстанавливающий фертильность цитоплазмы *T. timopheevii* с ЦМС, где соответствующая аминокислотная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 95%, предпочтительно, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 64.

В частности, авторы изобретения ранее определили, что последовательность RFL79 из SEQ ID NO:64 может восстанавливать мужскую фертильность растений CMS-Fielder. Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления примеры нуклеиновых кислот Rf1 содержат раскрытые последовательности нуклеиновых кислот Rf1 из SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68 или SEQ ID NO:69; предпочтительно нуклеиновая кислота Rf1 содержит SEQ ID NO:69. В этих последовательностях авторы изобретения идентифицировали маркер RFL79_S7 (SNP16).

Используемый в настоящей заявке локус Rf3 относится к локусу аллеля-восстановителя Rf3, который находится на расстоянии не более 10 сМ, предпочтительно не более 7 сМ, более предпочтительно не более 2 сМ от маркера cfn1249269 из SEQ ID NO:19 и/или от маркера BS00090770 из SEQ ID NO:42.

В конкретном варианте осуществления восстановитель фертильности растений пшеницы включает по меньшей мере один аллель-восстановитель Rf3 в локусе Rf3, где указанный аллель-восстановитель Rf3 расположен в хромосомном фрагменте между SNP-

маркерами cfn1249269 и BS00090770.

В другом конкретном варианте осуществления восстановитель фертильности растений пшеницы включает один аллель-восстановитель Rf3 в локусе Rf3, характеризующийся присутствием одного или нескольких аллелей SNP, как указано в таблице 2.

Таблица 2. SNP-маркеры для картирования локуса Rf3

SNP#	Название маркера	SEQ ID NO маркера	Аллель-восстановитель
SNP17	cfn1252000	17	A
SNP18	IWB14060*	18	G
SNP19	cfn1249269	19	G
SNP20	219K1_166464	20	T
SNP21	219K1_158251	21	G
SNP22	219K1_111446	22	A
SNP23	219K1_110042	23	T
SNP24	219K1_110005	24	C
SNP25	219K1_107461	25	A
SNP26	219K1_99688	26	T
SNP27	219K1_37	27	C
SNP28	cfn1270524	28	T
SNP29	136H5_3M5_7601	29	T
SNP30	cfn1288811	30	G
SNP31	136H5_3M5_89176	31	A
SNP32	136H5_3M5_89263	32	T
SNP33	136H5_3M5_138211	33	T
SNP34	cfn0556874	34	C
SNP35	136H5_3M5_64154	35	C
SNP36	136H5_3M5_68807	36	G
SNP37	136H5_3M5_77916	37	A
SNP38	cfn1246088	38	A
SNP39	cfn1287194	39	G
SNP40	cfn1258380	40	A
SNP41	IWB72107*	41	A
SNP42	BS00090770	42	T
SNP43	cfn1239345	43	A
SNP44	RFL29_S2	44	G
SNP 45	RFL29_S4	45	C

Предпочтительно, восстановитель фертильности растений пшеницы согласно настоящему изобретению включает один аллель-восстановитель Rf3 в локусе Rf3, характеризующийся присутствием аллеля (аллелей)-восстановителя SNP29 и/или SNP31, как описано в таблице 2. Более предпочтительно, восстановитель фертильности растений пшеницы характеризуется гаплотипом SNP29 и SNP31 аллелей-восстановителей «Т» и «А», соответственно.

В другом конкретном варианте осуществления, который может быть объединен с предыдущими вариантами осуществления, восстановитель фертильности растений пшеницы согласно настоящему изобретению включает один аллель-восстановитель Rf3 в локусе Rf3, характеризующийся присутствием аллелей-восстановителей SNP38 и SNP41

«А» и «А», соответственно.

Как описано в WO 2019/086510, существует два типа восстановителей фертильности Rf3: один с сильным восстановлением фертильности, а другой со слабым восстановлением фертильности. В другом предпочтительном специфическом варианте осуществления восстановитель фертильности растений пшеницы включает один сильный аллель-восстановитель Rf3 в локусе Rf3.

Маркер SNP 44, характеризуемый аллелем-восстановителем «G», является маркером слабого аллеля-восстановителя фертильности Rf3, SNP 41 и 45, характеризуемые аллелями-восстановителями «А» и «С», соответственно, являются маркерами сильного аллеля-восстановителя фертильности Rf3.

Более предпочтительно, восстановитель фертильности растений пшеницы согласно настоящему изобретению включает один аллель-восстановитель Rf3 в локусе Rf3, характеризующийся присутствием аллеля (аллелей)-восстановителя SNP41 и/или SNP45, как описано в Таблице 2. Более предпочтительно, восстановитель фертильности растений пшеницы характеризуется гаплотипом аллелей-восстановителей SNP41 и SNP45 «А» и «С», соответственно.

В конкретных вариантах осуществления восстановитель фертильности растений пшеницы с аллелем-восстановителем Rf3 содержит нуклеиновую кислоту Rf3.

Используемый в настоящей заявке термин «нуклеиновая кислота Rf3» относится к нуклеиновой кислоте, содержащей ген, кодирующий белок Rf3, восстанавливающий фертильность цитоплазмы *T. timopheevii* с ЦМС, где соответствующая аминокислотная последовательность имеет идентичность по меньшей мере на 95%, предпочтительно 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71 и SEQ ID NO:72.

Как правило, восстановитель фертильности растений пшеницы согласно настоящему изобретению, включающий нуклеиновые кислоты Rf3, содержит SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77 или SEQ ID NO:78. Маркеры для восстановления фертильности также могут быть найденным в расширенной области вокруг этих последовательностей, под расширенными областями подразумевается 5 т.п.н. вокруг этих последовательностей. Примерами маркеров в расширенных областях являются RFL29_S2 или RFL29_S4.

Характеристика области генома, содержащей генетические детерминанты Rf4 *Aegilops speltoides*, подробно описана в разделе «Примеры» ниже.

Как используется здесь, локус Rf4s расположен между 6 сМ и 43 сМ от положения хромосомы, ограниченного SNP-маркерами TaContig158085_61_BS00011513 из SEQ ID

NO:46 и cfn0864865 из SEQ ID NO:47.

Предпочтительно, локус Rf4s расположен между 6 сМ и 36 сМ от положения хромосомы, ограниченного SNP-маркерами EXCALIBUR_C96134_152 из SEQ ID NO:48 и cfn3133296 из SEQ ID NO:49.

В конкретном варианте осуществления восстановитель фертильности растений пшеницы содержит любой SNP Ae. speltoides на коротком плече хромосомы 6B в области, находящейся в диапазоне от 0 до 32 334 597 оснований в соответствии со ссылкой IWGSC V1, предпочтительно из области, находящейся в диапазоне от 0 до 29 782 272 оснований в соответствии со ссылкой IWGSC V1.

В конкретном варианте осуществления восстановитель фертильности растений пшеницы содержит любой SNP Ae. speltoides на коротком плече хромосомы 6B и в пределах хромосомного интервала от 0 до 35,77 сМ.

В конкретном варианте осуществления восстановитель фертильности растений пшеницы включает один аллель-восстановитель Rf4s в локусе Rf4 Ae. speltoides характеризующийся присутствием одного или нескольких аллелей SNP, как определено в таблице 3.

Таблица 3. SNP-маркеры локуса Rf4s

SNP#	Название маркера	SEQ ID маркера	Аллель-восстановитель
SNP46	TaContig158085_61_BS00011513	46	T
SNP47	cfn0864865	47	G
SNP48	EXCALIBUR_C96134_152	48	C
SNP49	cfn3133296	49	G
SNP50	LWE1_chr6B_485210_Rf4S	50	T
SNP51	LWE1_chr6B_11287944_Rf4S	51	G
SNP52	LWE1_chr6B_19775886_Rf4S	52	G
SNP53	LWE1_chr6B_28157776_Rf4S	53	C
SNP66	LWE1_chr6B_3871398_Rf4S	271	A
SNP67	LWE1_chr6B_14093785	272	T
SNP68	LWE1_chr6B_14295343	273	C
SNP69	LWE1_chr6B_14299330	274	A
SNP70	LWE1_chr6B_14299539	275	T
SNP71	LWE1_chr6B_14311571	276	A
SNP72	LWE1_chr6B_14340935	277	G
SNP73	LWE1_chr6B_14340966	278	C
SNP74	LWE1_chr6B_15132053_Rf4S	279	T
SNP75	cfn0871746	280	G
SNP76	LWE1_chr6B_16546535_Rf4S	281	A
SNP77	LWE1_chr6B_17703725_Rf4S	282	C
SNP78	cfn3066673	283	C
SNP79	LWE1_chr6B_25556418_Rf4S	284	T
SNP80	cfn0870569	285	C

В конкретном варианте осуществления восстановитель фертильности растений пшеницы включает один аллель-восстановитель Rf4s в локусе Rf4 Ae. speltoides, характеризующийся наличием одного или нескольких аллелей SNP, выбранных из SNP46

- SNP53.

В конкретном варианте осуществления восстановитель фертильности растений пшеницы включает один аллель-восстановитель Rf4s в локусе Rf4 Ae. speltoides, характеризующийся наличием одного или нескольких аллелей SNP, выбранных из SNP66 - SNP80.

В конкретном варианте осуществления восстановитель фертильности растений пшеницы включает один аллель-восстановитель Rf4s в локусе Rf4 Ae. speltoides, характеризующийся наличием одного или нескольких аллелей SNP, выбранных из SNP46 - SNP53 и SNP66 - SNP80.

Предпочтительно, восстановитель фертильности растений пшеницы согласно настоящему изобретению включает один аллель-восстановитель Rf4s в локусе Rf4, характеризующийся присутствием аллеля-восстановителя SNP53, как описано в таблице 3. Более предпочтительно, восстановитель фертильности растений пшеницы характеризуется гаплотипом SNP53 аллеля-восстановителя «С».

Как используется в настоящей заявке, локус Rf7 расположен не более чем на 10 см от маркера cfn0919993 из SEQ ID NO:55. В конкретном варианте осуществления восстановитель фертильности растений пшеницы включает один аллель-восстановитель Rf7 в локусе Rf7, характеризующийся присутствием одного или нескольких аллелей SNP, как определено в таблице 4:

Таблица 4. SNP-маркеры локуса Rf7

SNP#	Название маркера	SEQ ID маркера	Аллель-восстановитель
SNP54	cfn0917304	54	T
SNP55	cfn0919993	55	G
SNP56	cfn0920459	56	C
SNP57	cfn0915987	57	G
SNP58	cfn0920253	58	A
SNP59	cfn0448874	59	T
SNP60	cfn0923814	60	C
SNP61	cfn0924180	61	G
SNP62	cfn0919484	62	G
SNP64	LWE1_chr7B_658281643_Rf7	263	G
SNP65	LWE1_chr7B_711539100_Rf7	264	A

Предпочтительно, восстановитель фертильности растений пшеницы согласно настоящему изобретению включает один аллель-восстановитель Rf7 в локусе Rf7, характеризующийся присутствием одного или нескольких аллелей-восстановителей SNP, выбранных среди SNP54-62 и SNP64-65 гаплотипа «аллеля-восстановителя», как описано в таблице 4.

Более предпочтительно, восстановитель фертильности растений пшеницы согласно настоящему изобретению включает один аллель-восстановитель Rf7 в локусе Rf7,

характеризующийся присутствием аллеля-восстановителя SNP64 и/или аллеля-восстановителя SNP65, как описано в таблице 4. Более предпочтительно, восстановитель фертильности растений пшеницы характеризуется гаплотипом SNP64 и SNP65 аллелей-восстановителей «G» и «A», соответственно.

В конкретных вариантах осуществления восстановитель фертильности растений пшеницы с аллелем-восстановителем Rf7 содержит нуклеиновую кислоту Rf7.

Используемый здесь термин «нуклеиновая кислота Rf7» относится к нуклеиновой кислоте, содержащей ген, кодирующий белок Rf7, восстанавливающий фертильность цитоплазмы *T. timopheevii* с ЦМС, где соответствующая аминокислотная последовательность имеет идентичность по меньшей мере 95%, предпочтительно 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80 и SEQ ID NO:81.

Используемый здесь локус 6R соответствует интрогрессии ржи T4BS·4BL-6RL из линии TA5031, как подробно описано в разделе «Примеры». В частности, локус 6R расположен на хромосоме 6R и находится в пределах хромосомного интервала от 48,9 сМ до 114,8 сМ (конец хромосомы).

В конкретном варианте осуществления восстановитель фертильности растений пшеницы включает аллель-восстановитель 6R в локусе 6R, характеризующемся присутствием аллеля SNP, как определено в таблице 5:

Таблица 5. SNP-маркер локуса 6R

SNP#	Название маркера	SEQ ID маркера	Аллель-восстановитель
SNP63	RFL46_S2	63	A

В конкретном варианте осуществления восстановитель фертильности цитоплазмы растения пшеницы *T. timopheevii* с ЦМС содержит аллель-восстановитель Rf1, Rf3, Rf4s.

В частности, настоящим включено растение пшеницы, содержащее аллели-восстановители Rf1, Rf3 и Rf4s, как указано в образцах семян, депонированных 22 марта 2021, под номером депонирования NCIMB 43746 в коллекции NCIMB.

В другом конкретном варианте осуществления восстановитель фертильности цитоплазмы растения пшеницы *T. timopheevii* с ЦМС содержит аллель-восстановитель Rf1, Rf3 и 6R. В частности, настоящим включено растение пшеницы, содержащее аллели-восстановители Rf1, Rf3 и 6R, как указано в образцах семян, депонированных 22 марта 2021, под номером депонирования NCIMB 43747 в коллекции NCIMB.

Изобретение также относится к гибридным растениям пшеницы, которые могут быть получены путем скрещивания восстановителя фертильности растения пшеницы в соответствии с настоящим изобретением, как описано выше, со вторым растением.

В некоторых вариантах осуществления растение пшеницы по изобретению

является аллоплазматическим и содержит цитоплазму *T. timopheevii*.

Например, гибридное растение пшеницы может быть получено путем скрещивания восстановителя фертильности растения пшеницы в соответствии с настоящим изобретением, как описано выше, например, содержащего аллели-восстановители Rf1, Rf3 и Rf4s или аллели-восстановители Rf1, Rf3 и 6R, и растения пшеницы, которое не имеет указанных аллелей-восстановителей фертильности.

В настоящей заявке также раскрыт способ получения гибридного растения пшеницы, включающий этапы:

- a) скрещивание стерильного женского растения пшеницы, содержащего цитоплазму *T. timopheevii*, с фертильным мужским растением пшеницы по настоящему изобретению, как описано выше;
- b) сбор гибридного семени;
- c) при необходимости детекция наличия цитоплазмы *T. timopheevii* и/или аллелей-восстановителей фертильности A, B и C, как определено выше, в гибридном семени;
- d) при необходимости определение уровня гибридности гибридного семени.

В конкретном варианте осуществления этап (c) включает детекцию аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf4s. Согласно этому варианту осуществления этап (c) может дополнительно включать детекцию аллелей-восстановителей Rf7 или 6R.

В конкретном варианте осуществления этап (c) включает детекцию аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и 6R.

Следовательно, здесь также раскрыты растения или линии пшеницы в соответствии с настоящим изобретением, разработанные для получения таких гибридных растений. Такие растения или линии обычно содержат цитоплазматические элементы, необходимые для реализации соответствующей гибридной системы. Предпочтительно растения или линии содержат аллели-восстановители фертильности Rf1, Rf3, Rf4s и цитоплазму *T. timopheevii*, или Rf1, Rf3, 6R и цитоплазму *T. timopheevii*, или Rf3, Rf7, Rf4s и цитоплазму *T. timopheevii*, или также Rf3, Rf7, 6R и цитоплазму *T. timopheevii*.

Альтернативно, детекция наличия цитоплазмы *T. timopheevii* и аллелей-восстановителей (этап (c) описанного выше способа) может быть выполнена на родительских линиях, чтобы проверить их генотип перед началом скрещивания (этап (a)) или на каждом этапе их увеличения.

Цитоплазма T-CMS может быть обнаружена либо фенотипически, при этом растение, несущее гены *rf*, и цитоплазма T-CMS будут стерильными, либо молекулярными средствами, способными выявлять ген *orf256*, как описано в Rathburn and Hedgcoth, 1991 и Song and Hedgcoth, 1994.

Способ получения и селекции растения пшеницы по изобретению

Настоящее изобретение также относится к способам получения растения пшеницы с аллелями-восстановителями фертильности, как описано в предыдущем разделе.

В одном варианте осуществления способ получения восстановителя фертильности растения пшеницы включает следующие этапы:

а) получение первого растения пшеницы, содержащего один или два аллеля-восстановителя, выбранных среди аллелей-восстановителей фертильности А, В и С, как определено выше,

б) скрещивание указанного первого растения пшеницы со вторым растением пшеницы, содержащим один или два аллеля-восстановителя, выбранных среди аллелей-восстановителей фертильности А, В и С, причем аллели-восстановители А, В и С представлены по меньшей мере один раз в панели аллелей-восстановителей, предоставленных первым растением и вторым растением,

с) сбор гибридных семян F1,

д) получение гомозиготных растений из растений F1, и

е) детекция наличия аллелей-восстановителей фертильности А, В и С в гибридных семенах и/или в каждом поколении.

Аллели-восстановители фертильности А, В и С являются такими, как определено выше.

В конкретных вариантах осуществления аллель-восстановитель фертильности А представляет собой Rf3, аллель-восстановитель фертильности В представляет собой Rf1, а аллель-восстановитель фертильности С представляет собой Rf4s.

В конкретных вариантах осуществления аллель-восстановитель фертильности А представляет собой Rf3, аллель-восстановитель фертильности В представляет собой Rf1, а аллель-восстановитель фертильности С представляет собой 6R.

В конкретных вариантах осуществления аллель-восстановитель фертильности А представляет собой Rf3, аллель-восстановитель фертильности В представляет собой Rf7, а аллель-восстановитель фертильности С представляет собой Rf4s.

В конкретных вариантах осуществления аллель-восстановитель фертильности А представляет собой Rf3, аллель-восстановитель фертильности В представляет собой Rf7, а аллель-восстановитель фертильности С представляет собой 6R.

Предпочтительно, женское растение на этапе (b) несет цитоплазму T-CMS. В этом случае наличие аллелей-восстановителей оценивают в каждом поколении от этапа (b) до этапа (d) с использованием маркеров, указанных в настоящем описании, и/или путем оценки уровня фертильности.

Согласно этому варианту осуществления способ может дополнительно включать детекцию аллелей-восстановителей Rf1, Rf3, Rf4s, Rf7 и/или 6R в гибридном семени и/или в каждом поколении.

В другом варианте осуществления способ получения восстановителя фертильности растений пшеницы включает следующие этапы:

- a) получение первого растения пшеницы, содержащего по меньшей мере аллели-восстановители фертильности A, B и C, как определено выше,
- b) скрещивание указанного первого растения пшеницы со вторым растением пшеницы,
- c) сбор гибридных семян F1, и
- d) получение гомозиготных растений из растений F1.

В этом варианте осуществления способ может включать детекцию наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf4s в гибридном семени и/или в каждом поколении.

В другом варианте осуществления способ может включать детекцию наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf4s в гибридном семени и/или в каждом поколении.

В другом варианте осуществления способ может включать детекцию наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и 6R в гибридном семени и/или в каждом поколении.

В другом варианте осуществления способ может включать детекцию наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf7 и Rf4s в гибридном семени и/или в каждом поколении.

В другом варианте осуществления способ может включать детекцию наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf7 и 6R в гибридном семени и/или в каждом поколении.

В другом варианте осуществления способ получения восстановителя фертильности растения пшеницы включает следующие этапы:

- a) скрещивание первого растения пшеницы, имеющего по меньшей мере аллели-восстановители фертильности A, B и C, как определено выше, со вторым растением пшеницы, с получением гибридного растения F1;
- b) возвратное скрещивание указанного гибрида F1 со вторым растением пшеницы;
- c) селекция восстановителя фертильности растения пшеницы среди растений пшеницы, полученных на этапе (b), путем детекции наличия аллелей-восстановителей фертильности.

Согласно этому варианту осуществления способ может при необходимости включать стадию (d) самоскрещивания растения пшеницы для получения растений, гомозиготных по аллелям-восстановителям фертильности A, B и C.

Согласно этому варианту осуществления способ может также дополнительно включать один или несколько этапов возвратного скрещивания выбранного растения

пшеницы путем детекции присутствия аллелей-восстановителей, первоначально присутствующих в растении пшеницы, представленном на этапе (а).

В предпочтительном варианте осуществления второе растение пшеницы, которое скрещивают с первым растением пшеницы, имеющим аллели-восстановители фертильности A, B и C, является элитной линией пшеницы.

Способы получения гомозиготных растений, как правило, хорошо известны специалистам в данной области техники. Это может быть либо повторное возвратное скрещивание, либо получение двойных гаплоидов, либо способы индивидуального отбора от одного семени (SSD).

Заявитель передал образец семян раскрытого растения пшеницы с указанными аллелями-восстановителями Rf1, Rf3 и Rf4s 11 марта 2021 в соответствии с Будапештским договором в коллекцию NCIMB под номером NCIMB 43746, и с указанными аллелями-восстановителями Rf1, Rf3 и 6R 11 марта 2021, в соответствии с Будапештским договором в коллекцию NCIMB под номером NCIMB 43747.

Способы идентификации восстановителя фертильности растения пшеницы по изобретению

Настоящее изобретение дополнительно включает и обеспечивает способы идентификации соответствующих аллелей-восстановителей Rf1, Rf3, Rf4s, Rf7 и/или 6R, как описано в предыдущих разделах, и, в более общем плане, способы отбора или селекции растений пшеницы на наличие или отсутствие Rf1, Rf3, Rf4s, Rf7 и/или 6R аллелей-восстановителей фертильности. Такие способы идентификации, отбора или селекции растений пшеницы включают получение одного или нескольких растений пшеницы и оценку их ДНК для определения наличия или отсутствия аллелей-восстановителей фертильности Rf1, Rf3, Rf4s, Rf7 и/или 6R, содержащихся в соответствующем локусе.

Такие способы могут быть использованы, например, для определения того, какое потомство, полученное в результате скрещивания, обладает требуемой комбинацией аллелей-восстановителей фертильности, и, соответственно, для руководства получением растений, имеющих требуемую комбинацию в сочетании с наличием или отсутствием других необходимых признаков.

Соответственно, растения могут быть идентифицированы или отобраны путем оценки их на наличие одного или нескольких индивидуальных SNP, приведенных в вышеуказанных локусах Rf1, Rf3, Rf4s, Rf7 и/или 6R.

Соответственно, растения могут быть идентифицированы или отобраны путем оценки их на наличие одного или нескольких индивидуальных SNP, указанных в

приведенных выше таблицах 1-5, а также SNP в таблице 7, для оценки присутствия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3, Rf4s, Rf7 и/или 6R.

В конкретном варианте осуществления растение пшеницы может быть идентифицировано или выбрано путем оценки присутствия одного или нескольких индивидуальных SNP, представленных в приведенных выше таблицах 1-3, а также SNP в таблице 7, для оценки наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf4s.

В конкретном варианте осуществления растение пшеницы может быть идентифицировано или выбрано путем оценки наличия одного или нескольких индивидуальных SNP, представленных в приведенных выше таблицах 1, 2 и 5, а также SNP в таблице 7, для оценки наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и 6R.

В конкретном варианте осуществления растение пшеницы может быть идентифицировано или выбрано путем оценки наличия одного или нескольких индивидуальных SNP, представленных в приведенных выше таблицах 1, 3 и 4, а также SNP в таблице 7, для оценки наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf7 и Rf4s.

В конкретном варианте осуществления растение пшеницы может быть идентифицировано или выбрано путем оценки наличия одного или нескольких индивидуальных SNP, представленных в приведенных выше таблицах 1, 4 и 5, а также SNP в таблице 7, для оценки наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf7 и 6R.

В конкретном варианте осуществления растение пшеницы может быть идентифицировано или выбрано путем оценки присутствия одного или нескольких индивидуальных SNP, представленных в приведенных выше таблицах 1-4, а также SNP в таблице 7, для оценки наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3, Rf4s и Rf7.

В конкретном варианте осуществления растение пшеницы может быть идентифицировано или выбрано путем оценки присутствия одного или нескольких индивидуальных SNP, представленных в приведенных выше таблицах 1-3 и 5, а также SNP в таблице 7, для оценки наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3, Rf4s и 6R.

В конкретном варианте осуществления растение пшеницы может быть идентифицировано или выбрано путем оценки присутствия одного или нескольких индивидуальных SNP, представленных в приведенных выше таблицах 1, 4 и 5, а также SNP в таблице 7, для оценки наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3, Rf7 и 6R.

В более общем плане, здесь раскрыто конкретное средство для детекции аллелей-восстановителей в растении пшеницы, более конкретно аллелей-восстановителей Rf1, Rf3, Rf4s, Rf7 и 6R и их комбинаций.

Таким образом, указанные средства включают любые средства, подходящие для детекции следующих SNP-маркеров в пределах одного или нескольких из следующих

маркеров: SEQ ID NO: 1-63, SEQ ID NO: 263-264 и SEQ ID NO: 271-285.

Для оценки наличия или отсутствия SNP может быть использован любой способ, известный в данной области техники. Некоторые подходящие способы включают, без ограничения указанными, секвенирование, анализы гибридизации, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), лигазную цепную реакцию (LCR) и генотипирование на основе отдельных нуклеотидных последовательностей (GBS), или их комбинации.

Специалисту в данной области техники доступны различные методы, основанные на ПЦР. Можно использовать метод ОТ-ПЦР или метод Kaspar от KBioscience (LGC Group, Теддингтон, Мидлсекс, Великобритания).

Система генотипирования KASP™ использует три специфичных для мишени праймера: два праймера, каждый из которых специфичен для SNP (однонуклеотидного полиморфизма) каждой аллельной формы, и еще один праймер для достижения обратной амплификации, который является общим для обеих аллельных форм. Каждый специфичный для мишени праймер также содержит хвостовую последовательность, соответствующую одному из двух FRET-зондов: одна метка с красителем FAM®, а другая с красителем HEX®.

Проводят последовательные реакции ПЦР. Природу испускаемой флуоресценции используют для идентификации аллельной формы или форм, присутствующих в смеси из исследуемой ДНК.

Праймеры, указанные в таблице 6, особенно подходят для использования с системой генотипирования KASP™. Конечно, специалист в данной области техники может использовать варианты праймеров, или праймеры в виде зондов нуклеиновой кислоты, как указано в таблице 6, где указанные варианты праймеров или зонды нуклеиновой кислоты имеют по меньшей мере 90%, и предпочтительно 95% идентичности последовательности с любым из праймеров, указанных в таблице 6, или с геномным фрагментом ДНК, амплифицированным соответствующим набором праймеров, как указано в таблице 6.

Процент идентичности последовательностей, используемый в настоящей заявке, определяют путем вычисления 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 находятся в одном и том же положении в выровненных последовательностях нуклеиновых кислот. Например, последовательности нуклеиновых кислот могут быть выровнены с использованием последовательностей BLAST 2 (Bl2seq) с применением алгоритмов

BLASTN (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Используемый в настоящей заявке праймер охватывает любую нуклеиновую кислоту, которая способна инициировать синтез зарождающейся нуклеиновой кислоты в зависимом от матрицы процессе, таком как ПЦР. Обычно праймеры представляют собой олигонуклеотиды от 10 до 30 нуклеотидов, но могут использоваться и более длинные последовательности. Праймеры могут быть представлены в двухцепочечной форме, хотя предпочтительной является одноцепочечная форма. В качестве альтернативы можно использовать зонд нуклеиновой кислоты. Зонд нуклеиновой кислоты охватывает любую нуклеиновую кислоту, состоящую по меньшей мере из 30 нуклеотидов и способную специфически гибридизоваться в стандартных жестких условиях с определенной нуклеиновой кислотой. Используемые в настоящей заявке стандартные жесткие условия относятся к условиям гибридизации, описанным, например, в Sambrook et al., 1989, которые могут включать (1) иммобилизацию фрагментов геномной ДНК растения или библиотечной ДНК на фильтре; (2) предварительную гибридизацию фильтра в течение 1-2 часов при 65°C в 6-кратном SSC, 5-кратном реагенте Денхардта, 0,5% SDS и 20 мг/мл денатурированной ДНК-носителя; (3) добавление зонда (с меткой); (4) инкубацию в течение 16-24 часов; (5) однократное промывание фильтра в течение 30 минут при 68°C в 6-кратном SSC, 0,1% SDS; (6) трехкратное промывание фильтра (два раза по 30 минут в 30 мл и один раз в течение 10 минут в 500 мл) при температуре 68°C в 2-кратном растворе SSC; 0,1% SDS.

В конкретных вариантах осуществления указанные праймеры для детекции SNP-маркеров по настоящему изобретению (специфичные для каждого аллеля «X» или «Y» или общие) перечислены в следующей таблице 6.

Таблица 6. Праймеры для использования при детекции SNP-маркеров восстановителя фертильности по изобретению (как указано в названии праймера)

SEQ ID NO:	Название маркера	Последовательность
82	cfn0523109 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTGAACAAAACA GGCCTACAATCA
83	276113_96B22_97797 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTA CTATGGCTAT GTCTCTGAATGC
84	cfn0522096 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGTAGAATACCAC CCAATAAATCACTG
85	cfn0527763 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATCTAGCCACGCA AATGCCCGT
86	104A4_105172 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTCTGCMACCCAATG AATAATGTTT
87	104A4_105588 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTTCCCTTGTGACAT GTA CTATAA
88	cfn0373248 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAACAACAATTAYG AGGATCAAATGGTCA

89	cfn1097828 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTTCCTGAGAGA GCAACCA
90	cfn0527067 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAAATTACTIONTTTGT TCTTTTATTTTTTTCGAAT
91	cfn0528390 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAAAACATCTATT CCAAGCAAGTATTAGTAAT
92	BWS0267 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCAGCTGCATAAA AAMCAGAATACCA
93	cfn0527718 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAATTGTTCAACAAC ATGGACATGAGAAC
94	cfn0524469 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCAGCTGCATAAA AAMCAGAATACCA
95	cfn0524921 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATTGTTTCCATGTT AAGCTTATATTGTGCA
96	cfn1122326 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAATCTGATTAAG ACGCTGGAGAAC
97	RFL79_S7 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAGCTTGATAAGG CTATGCTTATATTTAG
98	cfn1252000 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTTAATGCTGTAG CCATTCTTGCAA
99	IWB14060* Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCATTGACGCGTC TTCCGCAATA
100	cfn1249269 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGATTCAAAGAGGT GACAAATATGTGTACT
101	219K1_166464 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCTGAGCTGGGCT GCACC
102	219K1_158251 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCTGGAGATGGAT CCGGTCAG
103	219K1_111446 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGAATCGTTCTTC GAGAAGCACTCA
104	219K1_110042 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACGGAATCGAGTC AACCAATTCCT
105	219K1_110005 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCCTTTTCTTCTTC CAGCATCTAC
106	219K1_107461 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATATTGTTTGTATT AAAAGTTGTGTGTTTTGA
107	219K1_99688 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTTGCCCTGCGCA AAATCAAACCTT
108	219K1_37 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAAGGGCTATCCT GGTGAACAAC
109	cfn1270524 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAATGCCTAGTCT ATACCTGATAAACTAAA
110	136H5_3M5_7601 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCGTCCCCCATGGC ACCTGT
111	cfn1288811 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTAATTTGGTTAACC AAATCCTTTTTGATTTTT
112	136H5_3M5_89176 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGATTTTCTCACCG GCATCTCCA
113	136H5_3M5_89263 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCCCATGTTCTTTT TTTGCTCAAAC
114	136H5_3M5_138211 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACTGGGTGCAAAG CCAAGATGATT
115	cfn0556874 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAAGAGCATGTCA GACACAATGCAG
116	136H5_3M5_64154 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGCGAAACTTCGC CGCGATAAAT

117	136H5_3M5_68807 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAAGTTGCTCTTA ATTATCTGTGCGTA
118	136H5_3M5_77916 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATAGCAAGTAGAG TTAACTTATCAAGTTATTA
119	cfn1246088 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGACATCTGATGAG CCAGCATACA
120	cfn1287194 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACCTCCTCCGTATC TGATGGC
121	cfn1258380 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATCTACTCATCTAT TGCAGATGCTCTT
122	IWB72107* Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGATGACATGGAGG ATTATATCGACGA
123	BS00090770 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTCGTAGCACAT AGCCGTTTAC
124	cfn1239345 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGCTTCTTTTTTCT CCCTATAATATGGA
125	RFL29_S2 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCGGGCAACTCTCT TCTTCTTAATCAA
126	RFL29_S4 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATGATGACTCCAT GAGGGTGGC
127	cfn0917304 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTGGTGGCGCTCT ACCCG
128	cfn0919993 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAGTCATCGACTT ACATGCTTCTTTG
129	cfn0920459 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGCCAAGGAAGCC CAGATTTTC
130	cfn0915987 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGATCATTACCCA ACGGCCAATG
131	cfn0920253 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTCATCCAAACA TTACATCGTTA
132	cfn0448874 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTTTGTTTCTAAAT AGCTGCGGCC
133	cfn0923814 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCAAGTCGCAAAT GTAAGGTCAGA
134	cfn0924180 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCCTCTTTTCATCA TGCACCATTA
135	cfn0919484 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAATGCAAGTGGC GAATCTTATCTCTA
136	Excalibur_c96134_152 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACTCTGGTGACAC CATGTAAGTTC
137	cfn3133296 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCAAGTGTCCCTC CTTGAGTCA
138	LWE1_chr6B_485210_Rf4S Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCATACTTGTAGAG ATCGTCACCC
139	LWE1_chr6B_11287944_Rf4 S Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTTCTGTTTAGGAC TACACATCAACT
140	LWE1_chr6B_19775886_Rf4 S Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAGGGCGCCGGCA CTGGT
141	LWE1_chr6B_28157776_Rf4 S Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTAGAAACGATCT GCTTACTGATTACTAT
142	RFL46_S2 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGCCAGAGCTATG GACAAAGCAA
143	cfn0523109 Аллель Y	GAAGGTGCGGAGTCAACGGATTGTGAACAAAACAG GCCTACAATCC
144	276I13_96B22_97797 Аллель Y	GAAGGTGCGGAGTCAACGGATTAAGTACTATGGCT ATGTCTCTGAATGT

145	cfn0522096 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTAGTAGAATACCAC CCAATAAATCACTC
146	cfn0527763 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCTAGCCACGCAA TGCCCGC
147	104A4_105172 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCTGTTCGMACCCAA TGAATAATGTTC
148	104A4_105588 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGTTCCCTTGTGACA TGTACTCATAAC
149	cfn0373248 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTAACAACAATTAYG AGGATCAAATGGTCT
150	cfn1097828 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGGTTCCTGAGAGA GCAACCG
151	cfn0527067 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCAAATTACTIONTTG TTCTTTTATTTTTTCGAAC
152	cfn0528390 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTAAACATCTATTCC AAGCAAGTATTAGTAAC
153	BWS0267 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTTCAGCTGCATAAAA AMCAGAATACCG
154	cfn0527718 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTATAAATTGTTTAC AACATGGACATGAGAAT
155	cfn0524469 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGCACGTAGTAAGT ATTGATTTTTCTGTT
156	cfn0524921 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGTTTCCATGTTAA GCTTATATTGTGCG
157	cfn1122326 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGGAATCTGATTAA GACGCTGGAGAAT
158	RFL79_S7 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGAAGCTTGATAAG GCTATGCTTATATTTAA
159	cfn1252000 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGTTAATGCTGTAG CCATTCTTGCAG
160	IWB14060* Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTTCGACGCGTCTTCC GCAATG
161	cfn1249269 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCAAAGAGGTGACA AATATGTGTACC
162	219K1_166464 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGCCTGAGCTGGGC TGCACT
163	219K1_158251 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCTGGAGATGGAT CCGGTCAA
164	219K1_111446 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTAAATCGTTCTTCGA GAAGCACTCC
165	219K1_110042 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTTCGGAATCGAGTCA ACCAATTCCC
166	219K1_110005 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTTCGCCTTTTCTTCTT CCAGCATCTAT
167	219K1_107461 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTATATTGTTTGTATT AAAAAGTTGTGTGTTTTGC
168	219K1_99688 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGCCCTGCGCAAAA TCAAATC
169	219K1_37 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTACAAAGGGCTATC CTGGTGAACAAT
170	cfn1270524 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTAAATGCCTAGTCT ATACCTGATAAACTAAT
171	136H5_3M5_7601 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGTCCCCCATGGCA CCTGC
172	cfn1288811 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTAAATTTGGTTAACC AAATCCTTTTTGATTTTG

173	136H5_3M5_89176 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTTTCTCACCGGCATCTCCG
174	136H5_3M5_89263 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCTTCCCATGTTCTTTTTTGCTCAAAAT
175	136H5_3M5_138211 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTACTGGGTGCAAAGCCAAGATGATA
176	cfn0556874 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGAAAGAGCATGTCAGACACAATGCAA
177	136H5_3M5_64154 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGCGAAACTTCGCCGCGATAAAC
178	136H5_3M5_68807 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTAAGTTGCTCTTAA TTATCTGTGCGTG
179	136H5_3M5_77916 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTAGCAAGTAGAGTTAACTTATCAAGTTATTG
180	cfn1246088 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGACATCTGATGAGCCAGCATAACC
181	cfn1287194 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCACCTCCTCCGTA TCTGATGGT
182	cfn1258380 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCTACTCATCTATTGCAGATGCTCTG
183	IWB72107* Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTATGACATGGAGGATTATATCGACGG
184	BS00090770 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTAGGTCGTAGCACATAGCCGTTTAT
185	cfn1239345 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGCTTCTTTTTTCTCCTATAATATGGG
186	RFL29_S2 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGGGCAACTCTCTTCTTCTTAATCAG
187	RFL29_S4 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTAATGATGACTCCATGAGGGTGGT
188	cfn0920459 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTAGCCAAGGAAGCC CAGATTTTG
189	cfn0915987 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCAGATCATTACCC AACGGCCAATT
190	cfn0920253 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGGTCATCCAAACA TTTACATCGTTC
191	cfn0448874 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCTCTTTGTTTCTAA ATAGCTGCGGCT
192	cfn0923814 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCAAGTCGCAAATGTAAGGTCAGC
193	cfn0924180 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCTTCCTCTTTTCATCATGCACCATTG
194	cfn0919484 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTATGCAAGTGGCGAATCTTATCTCTG
195	Excalibur_c96134_152 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGACTCTGGTGACACCATGTAACTTT
196	cfn3133296 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCAAGTGTCCCTCCTTGAGTCG
197	LWE1_chr6B_485210_Rf4S Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGTCATACTTGTAGAGATCGTCACCA
198	LWE1_chr6B_11287944_Rf4S Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCTTCTGTTTAGGACTACACATCAACC
199	LWE1_chr6B_19775886_Rf4S Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTAGGGCGCCGGCAC TGGC
200	LWE1_chr6B_28157776_Rf4S Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTAGAAACGATCTGCTTACTGATTACTAG

201	RFL46_S2 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGCCAGAGCTATGG ACAAAGCAG
202	cfn0523109 Общий	GTGTGTGCTAATGTGGATATACGTAAGTT
203	276113 96B22 97797 Общий	ACGACAATATAGACAAATAAAACCAAACAA
204	cfn0522096 Общий	AAGTAGTACTCGTAGAGAGTTAACACAGA
205	cfn0527763 Общий	CCTTGTCCACCGAGACATGTACAAA
206	104A4_105172 Общий	GCCATCCTCTCGGAGCCAGAA
207	104A4_105588 Общий	CAAGGATGGGGAGTATATGGCTCTT
208	cfn0373248 Общий	ATCATTGCCACGRAAAAAATCTCACAAGAT
209	cfn1097828 Общий	GCTTCCTCTCGGTAGCGATGGAT
210	cfn0527067 Общий	ATATGATTCACCCTAGATCCTTCACCTTA
211	cfn0528390 Общий	AATAACTCTTGTACTTCAGGATGAACGTTT
212	BWS0267 Общий	CTGCGTTAAGGTTTCAGGCAACTGAT
213	cfn0527718 Общий	GTTTCCTCCAATGTTCTTCCC
214	cfn0524469 Общий	GCCAATTTTCAAATCTAAGTCCACAGAGA
215	cfn0524921 Общий	GCCSTTTGGTAATTCATTTCAATCTTTT
216	cfn1122326 Общий	CAGATGGCCTAGTCGTGACATATCTT
217	RFL79_S7 Аллель Общий	CTCACTCCTTGTCTTCTGCATATCT
218	cfn1252000 Общий	GTGCCATAAGACGACTGGGACAA
219	IWB14060* Общий	CCGCGGCCGAAGCAGGCAA
220	cfn1249269 Общий	TAAAAGAACACAAATGTGGCCCTAGTGAT
221	219K1_166464 Общий	GACCGTGGTATATGCCACCACGTT
222	219K1_158251 Общий	TCCTCACAAATCACGGGCCCT
223	219K1_111446 Общий	AATATGATACAGACCCAAGACAAACCATTT
224	219K1_110042 Общий	GCATCTTCAAGGGAGCCACTCAAAA
225	219K1_110005 Общий	TTGACTCGATTCCGTGTGAGGCTAA
226	219K1_107461 Общий	GTTGATGCGAATTTGAAAATGACATAATAA
227	219K1_99688 Общий	GGGCGGGACCTGACTTGATGAT
228	219K1_37 Общий	GGCTTCATTATCAAATTCTGACCCATCTT
229	cfn1270524 Общий	TGTACCGAAACTCAACCAAATGACCATTT
230	136H5_3M5_7601 Общий	CTTCTCTGTGGCCGAAAACCTCTT
231	cfn1288811 Общий	GCACAATGTTTGACATTCGGTTTTCTAGTT
232	136H5_3M5_89176 Общий	CCTACCATCCTTAAATACTCTTGCTCAAA
233	136H5_3M5_89263 Общий	AAGCAACTAGAAAAATATTTGGACTAGCAT
234	136H5_3M5_138211 Общий	CCTCCCAACGGCCATCAATCAATTT
235	cfn0556874 Общий	CCTGCTGGAAATGGGATTTCTTGTTTATT
236	136H5_3M5_64154 Общий	GATCATCGGGGAACCTGATGATAGTT
237	136H5_3M5_68807 Общий	TTGGTTGGTTACGTCAGGTAAAGACTTA
238	136H5_3M5_77916 Общий	GCTKTAGACTCTAAGTACCACAGAAGAA
239	cfn1246088 Общий	GGGACGTGGAATTTGGAAAGACACAT
240	cfn1287194 Общий	CAGAAGGCACTGGGAGGGGATT
241	cfn1258380 Общий	TATAGGAGTGATAGCACCACACAATTCAT
242	IWB72107* Общий	ATACATGTCGGCGTCCCAGTCC
243	BS00090770 Общий	GAAACATTCCTTCGGACAACSTATGCATTA
244	cfn1239345 Общий	ACCCTCGCTGCAGTTCCTTCTTAAA
245	RFL29_S2 Аллель Общий	TTTAGGACCTCCAGTGCATTTAACTCTTT
246	RFL29_S4 Аллель Общий	CAGTGCAACCTGCGGAGAGCAT
247	cfn0917304 Общий	CAACTGCTTGGAGAAAGGCAACACAA

248	cfn0919993 Общий	CCATTAACAAGTACTGCATAGGTGCATAT
249	cfn0920459 Общий	CCTCCTCCTAATTAAGCTCCTATAGATA
250	cfn0915987 Общий	AAACGTGCAACGAGGCCAAACCTCAT
251	cfn0920253 Общий	GCCGCATGGTTTGGGCGGAAA
252	cfn0448874 Общий	GTGCCTCTAGGTTCAACATAAATTTAGGTA
253	cfn0923814 Общий	GATTTTCATTATCATGATCATTCATTT
254	cfn0924180 Общий	AATGGCTTCAGACAAAATAAGAGGGAGAT
255	cfn0919484 Общий	TCTCGCCTTTGTTTTGCCAAATGGTATAA
256	Excalibur_c96134_152 Общий	CAAACCTCCAACGGGTGGTGCCT
257	cfn3133296 Общий	GCAATCCACCACTGTGGTACAACCTT
258	LWE1_chr6B_485210_Rf4S Общий	GGCACGATGACAGTAATGGGATGTT
259	LWE1_chr6B_11287944_Rf4S Общий	AGAGTACACAGCATTTTCCCAGGAATATA
260	LWE1_chr6B_19775886_Rf4S Общий	GTGGCAAGCAGATCATGACAGGTT
261	LWE1_chr6B_28157776_Rf4S Общий	CTTGACGCATAAGGTGAAAGCCTGAA
262	RFL46_S2 Общий	CCTTTATCAATCATCTGCCGGAGGAA
265	LWE1_chr7B_658281643_Rf7 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGGGTCTGTAAAC TTGTGACGGA
266	LWE1_chr7B_658281643_Rf7 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGGGTCTGTAAACT TGTGACGGC
267	LWE1_chr7B_658281643_Rf7 Общий	CTCTAACGATTCTTACACACGCACCAA
268	LWE1_chr7B_711539100_Rf7 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCTCTTCTCCAGAT AATCAATCCTC
269	LWE1_chr7B_711539100_Rf7 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCTCTTCTCCAGA TAATCAATCCTA
270	LWE1_chr7B_711539100_Rf7 Общий	GGCGACGGAGCTCGATGAGAAA
286	LWE1_chr6B_3871398_Rf4S Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCACAACCACTGCC AGGCC
287	LWE1_chr6B_3871398_Rf4S Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCCACAACCACTGC CAGGCCA
288	LWE1_chr6B_3871398_Rf4S Общий	GTTTTGGTTGTGCATTTGGGTCAGGTA
289	LWE1_chr6B_14093785 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTTCCACTCGCTCT CGTCC
290	LWE1_chr6B_14093785 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCTCTTCCACTCGCT CTCGTCT
291	LWE1_chr6B_14093785 Общий	GGACATGTTCCGCGATGTGCACCAA
292	LWE1_chr6B_14295343 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCTCAGCCTAAA CAGGAATGA
293	LWE1_chr6B_14295343 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCTCAGCCTAAAC AGGAATGG
294	LWE1_chr6B_14295343 Общий	TGCTATCTGTGAGATGTTTGCATAGGTTT
295	LWE1_chr6B_14299330 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTGTCGCCGCGTG CAGAG
296	LWE1_chr6B_14299330 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCTGTGTCGCCGCGT GCAGAA
297	LWE1_chr6B_14299330 Общий	GGCCTGGCCCCGGGTGTAATATT

298	LWE1_chr6B_14299539 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACCGCGTTGCCGA CTTGCG
299	LWE1_chr6B_14299539 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTACCGCGTTGCCG ACTTGCA
300	LWE1_chr6B_14299539 Общий	TCCTGACTGGTGCTGGCAGGTA
301	LWE1_chr6B_14311571 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCATAGATGCGTC GTCTCCAAG
302	LWE1_chr6B_14311571 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGCCATAGATGCGT CGTCTCCAAA
303	LWE1_chr6B_14311571 Общий	CCGAAGAGTGGAAGGTAGTACTCTA
304	LWE1_chr6B_14340935 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTATGCTTGAATGC CCGGAGGAATT
305	LWE1_chr6B_14340935 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGCTTGAATGCCCG GAGGAATC
306	LWE1_chr6B_14340935 Общий	CTGCGCCTCTTCGGCTCCTT
307	LWE1_chr6B_14340966 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCGAGGTTGTGTGA GAGGAGA
308	LWE1_chr6B_14340966 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGAGGTTGTGTGA GAGGAGG
309	LWE1_chr6B_14340966 Общий	TCCGGGCATTCAAGCATAACCACAA
310	LWE1_chr6B_15132053_Rf4 S Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCATGCAACATGCA CTAATGCATTCTA
311	LWE1_chr6B_15132053_Rf4 S Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGCAACATGCA CTAATGCATTCTT
312	LWE1_chr6B_15132053_Rf4 S Общий	GCATGTCACAATTAATGTAATGTGATTTA
313	cfn0871746 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAGGATAGCAGCA TCAACTGAGA
314	cfn0871746 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGAGGATAGCAGCA TCAACTGAGG
315	cfn0871746 Общий	TCTCGAAACAAAGGCAGTACTACACAAT
316	LWE1_chr6B_16546535_Rf4 S Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCCTGCGTTTGGT AGACTGGC
317	LWE1_chr6B_16546535_Rf4 S Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGCCTGCGTTTGGT AGACTGGA
318	LWE1_chr6B_16546535_Rf4 S Общий	GCCTGGGCGAACGCATCACAAA
319	LWE1_chr6B_17703725_Rf4 S Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGACTTCTCGGTGG CAGCATAGT
320	LWE1_chr6B_17703725_Rf4 S Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTACTTCTCGGTGGC AGCATAGC
321	LWE1_chr6B_17703725_Rf4 S Общий	CAGGAAAGAAGCAGCCGGTACTTTA
322	cfn3066673 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAGTATTACCACA AATGCGACCAAGT
323	cfn3066673 Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTAGTATTACCACAA ATGCGACCAAGG
324	cfn3066673 Общий	CAACGCTGAGAGGCGGCTCTT
325	LWE1_chr6B_25556418_Rf4 S Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCGATGGGGAAAGA ATAATAATGCTTAC
326	LWE1_chr6B_25556418_Rf4 S Аллель Y	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTGCGATGGGGAAA GAATAATAATGCTTAT

327	LWE1_chr6B_25556418_Rf4 S Общий	GTTTGTTCGAACSTTTTTCGCGTGGTTA
328	cfn0870569 Аллель X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTAATGCTCTATT ATAGCCTTGATG
329	cfn0870569 Аллель Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCGGTAATGCTCTA TTATAGCCTTGATA
330	cfn0870569 Общий	ACTTTAGAACATAGCACCGGGGCTT

Способы применения растений пшеницы по изобретению

Растение по изобретению может быть скрещено с любой другой инбредной линией для получения новой линии, включающей либо повышение, либо снижение уровня фертильности.

Альтернативно, генетический признак, который был интегрирован в конкретную линию с использованием вышеуказанных методов, может быть перенесен в другую линию с использованием традиционных методов возвратного скрещивания, которые хорошо известны в области селекции растений. Например, подход возвратного скрещивания может быть использован для переноса сконструированного признака из общедоступной, неэлитной инбредной линии в элитную инбредную линию, или из инбредной линии, содержащей чужеродный ген в своем геноме, в инбредную линию или линии, которые не содержат этот ген.

Растение пшеницы по изобретению также является растением пшеницы, в котором один или несколько необходимых признаков были дополнительно введены с помощью методов возвратного скрещивания, независимо от того, встречается ли такой признак в природе или нет.

Изобретение также относится к использованию растения пшеницы, как описано выше, или его семян для пищевых целей, предпочтительно для производства муки и кормов, или для селекции, например, в способе повышения агрономической ценности растения, линии, гибрида или сорта пшеницы.

Как используется в настоящей заявке, селекционные приложения охватывают селекционное разведение для улучшения агрономической ценности растения, линии, гибрида или сорта.

Семена, собранные с растений, описанных в настоящей заявке, могут быть использованы для производства муки любыми доступными в данной области техники способами. Растения пшеницы или мука из них также полезны в качестве пищевого продукта.

Последовательности SNP-маркеров

Таблица 7. Последовательности SNP-маркеров

ID маркера	Аллель X	Аллель Y	Последовательность
276113_96B22_977 97	C	T	AAATTCGACAAGTACTATGGCTATGTCTCTGAAT G[C/T]TTGTTTGGTTTTATTTGTCTATATTGTCGTT GTAT
cfn0522096	C	G	ATGCAAAGTAGTACTCGTAGAGAGTTAACACAGA C[C/G]AGTGATTTATTGGGTGGTATTCTACTTGAT ATTG
cfn0527763	T	C	ATAAAGAAAAGTAGAGGAAGCTTATGAATAAAAT GGAAAAGGAATTCAAAATTGCCGATAAATATAAAA CTCATAACAAATCTAGCCACGCAAATGCCCG[T/C] GCCGCTCTGCTCGTTTGTACATGTCTCGGTGGAC AAGGAAGAACCCAACAATTGCACAGGTCAATCTT ATCCAGCAAAACAAGGAAGCAAACCAACAGG
104A4_105172	TG	CA	ATGTTGCCTCTCGCTAGCCGCTGTGMACCCAAT GAATAATGTT[TG/CA]TGGGTTCTGGCTCCGAGAG GATGGCCGGCTYCCC
104A4_105588	A	C	GTTCTTGTGACATGTACTCATA[A/C]ACAAGAGC CATATACTCCCCATCCTTGCA
cfn0373248	T	A	GACATAATGTGTAATAACAGGCCATAATGCAATAA ATATCAATATAAAAGCATGATGCAAAATGGACGTA TCATTGCCACGRAAAAAATCTCACAAAGATG[T/A]G ACCATTTGATCCTCCTAATTGTTGTTCTAGACCCA CTCCTAAGTMTAACATTCTTTATGTCTATYCTTCA AATCCCGAAGAGTAATGAAAAGTATCGAA
cfn1097828	T	C	CCATGAGTACCCGCTACTATCGATCTCCCTCCTC CCTGTAGGAGGCCTACGAACGATGCCCTCAGGT CCTGCTTCCCTCTCGGTAGCGATGGATCCACCTG[T/C]GGTTGCTCTCTCAGGAACCAAGTGTGGCGGC GGCTCATCCGGGGCGCTGGATCTTGGTGATGTG CTGGAACAACCTCAACTTGAAGACGAAGAATTTG AT
cfn0527067	A	G	GACAATATGATTCACCCTAGATCCTTCACCTTACA [A/G]TTCGAAAAAATAAAAGAACAAGTAATTTG ACA
cfn0528390	A	G	ACGAAGATGAGGAAGGTCTTCATGTTGGGTTTAT G[A/G]TACTAATACTTGCTTGAATAGATGTTTTT GATC
BWS0267	A	G	GTTACCCCAATATGCTCCCTCCTTGACATTTTCT TCAGCTGCATAAAAAMCAGAATACC[A/G]CATCAG TTGCCTGAACCTTAACGCAGGTGCAGAAATAAGG CGACATAATTTYCACTAATC
cfn0527718	C	T	AGGAAAATAAATTGTTTACAACATGGACATGAGA A[C/T]GGGGCAACCAAAAAGGGAAGAACATTGGA GGAAC
cfn0524469	G	T	TTTGTACTGCACGTAGTAAGTATTGATTTTTCTGT[G/T]TGCTCTCTGTGGACTTAGATTTGAAAATTGGC CTT

cfn0524921	A	G	ATGCACATTGTTTCCATGTTAAGCTTATATTGTGC[A/G]TAACTCAAAGATTGAAATGGAATTACCAAAG GGC
cfn1122326	C	T	ACTGACTGTTGGAATCTGATTAAGACGCTGGAGA A[C/T]CCGAGCCAAGATATGTCACGACTAGGCCA TCTGGA
RFL79_S7	G	A	TGGGAAGCTTGATAAGGCTATGCTTATATTTA[G/A]AGATATGCAGAAACAAGGAGTGAG
cfn1252000	A	G	AATCAGATCCTGTTAATGCTGTAGCCATTCTTGCA [A/G]GCGACACCTTGTCACGTCGTCCTTATGGGC ACTTA
IWB14060	A	G	GGCAGAGCCGGTCCGACGGAGAGGAGCGCCATT CGACGCGTCTTCCGCAAT[A/G]GTTTTGCCTGCTT CGGCCGCGGCCATTCCGCGAGCTCCCACGCTTC GTCC
cfn1249269	A	G	CGTTTAAAAGAACACAAATGTGGCCCTAGTGATC A[A/G]GTACACATATTTGTCACCTCTTTGAATCTTA CTTA
219K1_166464	C	T	CGGGCTGATGAGGCTCTCGACGTGCTGCTTCAC AGGATGCCTGAGCTGGGCTGCAC[C/T]CCCAACG TGGTGGCATATACCACGGTCATCCACGGCTTCTT TAAGGAAGGC
219K1_158251	G	A	GCGCTATCCGGCGTTCGTGTTCCCTCTTGGGGGA ATCGTCTGGAGATGGATCCGGTCA[G/A]AGGGG CCCGTGATTTGTGAGGATGTGTGTGTTGTTTCCC GAAAGGCG
219K1_111446	A	C	CTTTGACCTTAAATTCTTGTACTAATTTAGCAGAA TCGTTCTTCGAGAAGCACTC[A/C]AAAAATGTTTT GTCTTGGTCTGTATCATATTTTCTCTGAACAAAC AGGCGTGA
219K1_110042	T	C	GACTTAGCCTCACACGGAATCGAGTCAACCAATT CC[T/C]GTCGGTTTTGAGTGGCTCCCTGAAGATG CAATCGTTTTCAGCATGGTCAGATTAATCAGCGA GCGTGC
219K1_110005	C	T	CATGTAGTGGCTGGCGTCTAAGCGCCTTTTCTTC TTCCAGCATCTA[C/T]GACTTAGCCTCACACGGAA TCGAGTCAACCAATTCCTGTCGGTTTTGAGTGGC TCCCTTGAAGATG
219K1_107461	A	C	GTCGTATATATTGTTGTATTA AAAAGTTGTGTGT TTTG[A/C]GTCATAATTTTTAAAATATTATTATGTCA TTTTCAAATTCGCATCAAC
219K1_99688	T	C	AATCTTCTTGACTTCATCCATCCGCCTTGTGGCC TGCGCAAATCAAAC[T/C]CCCCGTCTTATCAT CAAGTCAGGTCCCGCCCTGGGCAGAGAGAG
219K1_37	C	T	CGGCAGATATCACAAAGGGCTATCCTGGTGAACA A[C/T]AAGATGGGTCAGAATTTGATAATGAAGCCT CAAGCCC
cfn1270524	A	T	AATAGATGCACGCATCGGCGACCATTTTTAGTA CTTTTTGCCTTTTTGAAAATTTGTCAATAAAAGA CAAATGCCTAGTCTATACCTGATAAACTAA[A/T]AT CATACATAGAGAAAATGGTCATTTGGTTGAGTTTC GGTACATGCTGAGATGGTTGCACTTCGGTGCATC TGCTTTGCTTCCATCACATCATAATGTCT
136H5_3M5_7601	T	C	GCTGCTGTAGCGTCCCCATGGCACCTG[T/C]G AAGAGGTTTTCGGCCACAGAGAAGGGGAAGGCT C
cfn1288811	T	G	AAAATTACTTTTCACGCGCTTCGTTGGTCTGACA GTGCGAGCATAATTTACTTTTTCTCAGTTTTACT TAATTTGGTTAACC AAATCOTTTTTGATTTT[T/G]A ACTAGAAAACCGAATGTCAAACATTGTGCAAATTT GGAAACTGAAACTGAAACCAAAAACCTAAAAAAA TGATTAGTTTGTTTTTTTGTTCTTGTTCG

136H5_3M5_89176	A	G	gtatttCTTAGGATTTTCTCACCGGCATCTCC[A/G]TT TTTTGAGCAAGAGTATTTAAGGATGGTAGGC
136H5_3M5_89263	C	T	AACAAAGATGCTAGTAAGAACATGAACCTAGTTG CTCATTTTTAACAACAATTGCCACCAACCTGACA TGCTCTTCCCATGTTCTTTTTTGTCAA[A/C/T]A GAGATGCTAGTCCAAATATTTTTCTAGTTGCTTAC ATTTAAACAACAATTGCCTACCATCCTTAAATAC TCTTGCTCAAAAAACGGAGATGCCGGTGA
136H5_3M5_13821 1	T	A	AATACAGACTGGGTGCAAAGCCAAGATGAT[T/A]G TAAAATTGATTGATGGCCGTTGGGAGGT
cfn0556874	C	T	TGTAAGAAGCTTAACCAGGAAAGCTATCAGGGC CATAGGGAATGGCTGGTTAGTGACAATTTGCCT GCTGGAATGGGATTTCTTGTATTTCAGTT[C/T] TGCATTGTGCTGACATGCTCTTTCTTTGGGGC CAGGCTGAAGTGAATTACCTTGACAACCTATCGC ACCCGAATCTTGTAAGCTCGTTGGGTAAGT
136H5_3M5_64154	T	C	TGGCCGAGCTGGGGCTGTTCCCTACGCAGGC GAACTTCGCCCGGATAAA[T/C]GGAACATCATC AGGTTCCCGATGATCCATACG
136H5_3M5_68807	A	G	ACAAGCAACCGAGACAAGTTGCTCTTAATTATCT GTGCGT[A/G]CACCTCTAAGTCTAACCTGACGTA ACCAACCAACCGTGT
136H5_3M5_77916	A	G	GATGGTTACAAGGCATGCATAGCAAGTAGAGTTA ACTTATCAAGTTATT[A/G]GATTTTTCTTCTGTGG TACTTAGAGTCTAMAGCTTGAGC
cfn1246088	A	C	AATGGAAGCTGATGTGCGTTAGCGATAAAGCAAC AGCGATAACGACGCATGGATCACCATGCTACTTG GGGAAGCAGGGACATCTGATGAGCCAGCATAC[A /C]CCAGATATGTGCTTTCCAAATCCACGTCC CAACAGATGAGCTATAAATTAATGCCACCTTCT CCTACAGCTAAATACTCCATCCGTTTCATAATGT
cfn1287194	G	A	CAGAGGCATTGCGTAATTGGGCGAATCAGAAG CAAGGAGCAGCGATGTTGAGCGCAGAAGGCACT GGGAGGGGATTCCAGGGAGGCTGCCACCAGC CC[G/A]CCATCAGATACGGAGGAGTGGATCCAT GGCCCTACCTGTGTCCTGCGCCGAATCTGGACT GTGGTAACCTACAGCGCCTGAATCTAGAGGTTGAG CCTGG
cfn1258380	A	C	GATCCATCTCCCTTAATAATTTGCTATTGGTATT GGGTATGGACATCTGAAGTGAAGTTACGGCCG ATTTATAGGAGTGATAGCACCACACAATTCAT[A/C]AGAGCATCTGCAATAGATGAGTAGATGTAAGACT ACTTAACTTTTACATCTCCGGCCCTAAAAACGCAT CTGTAATAAGATAATGTAGATGTAAGAAAA
IWB72107	A	G	CGACGACGACGAGGATGCCGAGTTTGATGACAT GGAGGATTATATCGACG[A/G]CGCGGACTGGGAC GCCGACATGTATGATGATGTGTTGATGTCTGAA GGA
BS00090770	C	T	TAGCCGTAGGTCGTAGCACATAGCCGTTT[A/C/T]G TAATGCATAGTTGTCCGAAGGAATGTTTC
cfn1239345	A	G	TAACCTGGGGCTTCTTTTTCTCCCTATAATATGG [A/G]CTGCCCTTTAAGAAGGAAGTGCAGCGAGG GTGCA
RFL29_S2	A	G	CTATTCGATGGGCGTGTTTAATTAACCGGGCAA CTCTCTTCTTAAATCA[A/G]TGAAAATGGCAAGT CTTTACCTCGTTTCAAAAAGAGTTAATGCACTG GAGGTCCTAAAGGTTTCG
RFL29_S4	C	T	CATGCGGCGGGGGCCCTGCGGCAATGATGACTC CATGAGGGTGG[C/T]TTCGGCGGACGATGCTCTC CGCAGTTGCACTGGACTAGCTTGGTGTGAGGC TTGCAACTTCTCCTGTGATGCTCATCAACAAAAT
cfn0917304	G	T	GACTACGCGTTCCTCCCGGTGGTGGCGCTCTAC CC[G/T]TTGTGTTGCCTTTCTCCAAGCAGTTGTGC CCTCG

cfn0919993	G	T	ATATCTTTACAAGTCATCGACTTACATGCTTCTTT[G/T]TATTATATGCACCTATGCAGTACTTGTTAATG GGT
cfn0920459	C	G	GATGATATAACCGTAGCCAAGGAAGCCCAGATTT T[C/G]TTCTGTGTATCTATAGGAGCTTAATTAGGA GGAGG
cfn0915987	G	T	AAGTCTGCCATCCAGATCATTACCCAACGGCCAA T[G/T]GAGCCATGAGGTTTGCCTCGTTGCACGTTT TGGCT
cfn0920253	A	C	GCAACAAAGCTGGTCATCCAAACATTTACATCGT T[A/C]GGCAGGCTTTCCGCCAAACCATGCGGCC GACCTG
cfn0448874	C	T	TATGTA AAAACCTCTTTGTTTCTAAATAGCTGCGGC [C/T]CGCTACCTAAATTTATGTTGAACCTAGAGGC ACCC
cfn0923814	A	C	GTTCCGGCAGAATCCAAGTCGCAAATGTAAGGTCA G[A/C]AAATGAATGATGATCATGATAATGAAAATC ATAAG
cfn0924180	A	G	ACGTATGGAGCTTCCTCTTTTCATCATGCACCATT [A/G]TGATCTCCCTCTTATTTTGTCTGAAGCCATTC ATG
cfn0919484	A	G	AGGTCATGAAAATGCAAGTGGCGAATCTTATCTC T[A/G]TTATACCATTTGGCAAACAAAGGCGAGAG TTCTG
TaContig158085_6 1_BS00011513	A	G	AGTAATTACAACCTTGGCGGCATTTCCAAG[A/G]A CTTCTTTGTCTGCTTTGTCCAGGGACAGT
cfn0864865	C	T	CGGTTTATCTGTTATCATTGTGCACCAGGAAAAC C[C/T]GACTCCTGAGTTCAAAAATATGTTGATTCTA TAAA
EXCALIBUR_C961 34_152	T	C	GGCTTAAGGGAGACTCTGGTGACACCATGTAACT T[C/T]ACGGCCACGCACCACCCGTTGGAGTTTGA CAGTTC
cfn3133296	A	G	CTCCCCTGCCAAACCCAAGTGTCCCTCCTTGAGT C[A/G]CAAAGTTGTACCACAGTGGTGGATTGCAA CAGATT
LWE1_chr6B_4852 10_R14S	G	T	ACTGGGAAC TGGCTACACCTTCTACGTGGATAA TGGCGACTKCGACGAGCTAMGGGGCGTCTGGCA CGATGACAGTAATGGGATGTTGTGCTACTGGCT[G/T]GGTGACGATCTCTACAAGTATGACACCAGTA AGAAGGGTCAACAAC TACC GCCGATAGTGTCTT GGAGTGGGACCATCGGATCCCCCTGCCGGCAAC TA
LWE1_chr6B_1128 7944_R14S	A	G	CTATAAGGAAAAGCATATCACTGTAAACAGTATACT ATGACAGAAAACAAAGAGTACACAGCATTTCCCA GGAATATATAATATATACTTCATTTACTGGT[A/G]G TTGATGTGTAGTCCTAAACAGAAGATGAAGGCTA TGCTTTCAATATCAAAAAGCGAAAATAAACAGAAT AACCAGCATAGTTGCAGTAATTACAATTTG
LWE1_chr6B_1977 5886_R14S	A	G	TAATTTCTATATACACACATACAACATGTGCACAT ACAATGCGTACGTGGCAAGCAGATCATGACAGG TTGGCGGACGCGTTCTCCGCCGCGGGACGAC[A/G]CCAGTGCCGGGCCCTTCATCTCGGCCCGA AATTTGGCGGAGAGTGCCTTTCTCCCGGCTGCG GGAGCCGTGGGCCAAAAGAGGCCCATGCTGACA GCCA
LWE1_chr6B_2815 7776_R14S	A	C	TTKATAGTAAAACCAAGCGTACAGAATTAATTTTA GAGCAAACAAAATACTATAATAGAAGTCAAGCCT TGACGCATAAGGTGAAAGCCTGAACCGACG[A/C] TAGTAATCAGTAAGCAGATCGTTTCTAAATAAGAT GATGAATGGTTTATGTTTTCCCGCTGTTAGAATAT TGTTACGCAAACAGCATAGCTAGGACTGTT

RFL46_S2	A	G	ATTGATGCGCTGTGCAAGGCCAGAGCTATGGAC AAAGCA[A/G]AGTTGTTCTCCGGCAGATGATTGA TAAAGGTGTTTC
LWE1_chr7B_6582 81643_Rf7	T	G	GAACAATCTCCCCCTACGATTGACTGACGACGAC GAGATCCCACAGTCAAGCCCTCCATTTTCTCAG AAAACCTAACGATTCTTACACACGCACCAA[A/T/G]CCGTACAAGTTTACAGACCCCTGGCATGGATG CACGCACGGTGCAGCCAGCCGGCCAGGATTTT CATACGTTTGCTATACGTTACGTCGAGAGGGAGT
LWE1_chr7B_7115 39100_Rf7	C	A	TCAATTCCTTGTTGTCCTTCTCAGTTCCTCGTTG TGCTTGCCAGCTTCTTTTGCCCTCCACCAGCA
			CCTCGTTCCTTCTCCAGATAATCAATCCT[C/A] ATCTTTTTTTCTCATCGAGCTCCGTCCCAACTT TCCTTTCTTCCACCAGCGCATTTTTTGCCTTTT CCAGATCTGCAATATCTGTTCCCTTTTTTT
LWE1_chr6B_3871 398_Rf4S	C	A	CAACCATTACCAGACCCAAACCCGAAGCCATTAC CTGGACCGCAACCTGATOCAAACCCAGAACCATT ACCAGATCCAAATCCACAACCACTGCCAGGCC[C/ A]ACTACCTGACCCAAATGCACAACCAAAACCACC ACTTAGGACACAAGCAGAAAAAGGAAATGGGGA AGCAAACRTCCAAGAGGAACCGTTGGCATGAGA T
LWE1_chr6B_1409 3785	C	T	AGTAGATCTCAATTACTGACAAGGGGCCAACAC CGGCATGATCTTGAATCGTCGCTGAATCCAGCA TCGGAAAAGATCCTCTTCCACTCGCTCTCGTC[C/ T]CGCTCAACCCCGTTGGTGCACATCGCGAACAT GTCCTGCAAGGCTTCCAYCTGCCGATCTTCTTG TCGCCGAGCAGAGACCCCTTACCATGTCTATGA
LWE1_chr6B_1429 5343	T	C	ACACCTTTCTCCGTGAATATGGTTTCTGCCGATG TAAAAAAAATCCTTGCTATCTGCAGATGTTTGC ATAGTTTTTTTCACTTCTGATTCTTTATCA[T/C] ATTCTGTTTAGGCTGAGGAAGGAAGGCCTCATT TCATTGGTAGGATCACCGAACTTTTTGAGGGAAC AGACCGCGTCAAGTACTTCAACTGCCGCTGG
LWE1_chr6B_1429 9330	G	A	TTCTGATCTGGCCATTTAGGAAGCACGCAACCC TTTTGTTCCGTTTTGACCGTGTGAGGTCTAGAAT CTCTAAACGTGTTTCGTGTCCGCCGTGCAGA[G/ A]AATATTACACCCGGGCCAGGCCCGGGTTCTGA CCGTCCGCGAGAACGCGAGGCTGCAGGGATTCC CGGATTACTACCGCCTGGACGGTCCCATCAAGG AG
LWE1_chr6B_1429 9539	C	T	TTACGAAGTCTGCTAGTCGTGCTTTCCTCGT AACTCAAGACTGAAACTGAACATCTGTTGGTGMT GAAATGAATCCTGACTGGTGTGGCAGGTACA[C/ T]GCAAGTCGGCAACGCGGTGGCGGTCCCTGTG GCCCGGGCCCTGGGGTACTCGCTGGGCTGGC GTACCTGCGCAAACACGACGGGAGCGATGACGG CCCG
LWE1_chr6B_1431 1571	G	A	TCCTCGCCGGGTTACCCGGCCTCGGTCTATCGC CTTCTGATATCGCGCGCCTCGTCTCGCTCGCCC CGACCGAATCCGCCATAGATGCGTCTGCTCCAA [G/A]CTAGAGTACTACCTTCCACTCTTCGGCTCCA TCGACAACCTTGCTCCGGCCGCTCAAATGCTGCAC CGCCTTCTCGGCTCCACCTCGAGAGGGTGGT CA
LWE1_chr6B_1434 0935	A	G	GCGGACTCGTCCCGCTCACCGCCAACAACAAC CACTCCCGCAACAATCCGTGCTTCCAAGGTGS RCTACTACCTGCGCCTCTTCCGGTCTTGGAGG[A/G]ATTCCTCCGGGCATTCAAGCATAACCACAAY CTCCTCTACACAACCTCGAGACGGTGGTCAAG CGGAATGTCGGGTTGCTGCAGGAGTGCACGCTA GGT
LWE1_chr6B_1434 0966	T	C	ACCACTCCCGCAACAATCCGTGCTTCCAAGGT GSRCTACTACCTGCGCCTCTTCGGTCTTGGAG GRATTCTCCGGGCATTCAAGCATAACCACAA[T/ C]CTCCTCTACACAACCTCGAGACGGTGGTCAA

			GCGGAATGTCGGGTTGCTGCAGGAGTGCACGCT AGGTGCTTGCGACATTGCCAAGCTTGCCATCTCT A
LWE1_chr6B_1513 2053_Rf4S	A	T	CTTCTTTCACATCATCAAATTGGTGCAGCCGTT CACTAGGACCCGTCGAGCTACCCACGAAAATT CCTTACCATGCAACATGCACTAATGCATTCT[A/T]T GTGGATTTTAAATCACATTACATTTAATTGTGACA TGCATAATCTTTTCATGTTAATATTTTTTTGGCTTAT GCAAGAAAATCTCACATAGTTTAAATCG
cfn0871746	A	G	CTGTGAGGACGACCAGGATAGCAGCATCAACTG AG[A/G]GATTGTGTAGTACTGCCTTTGTTTCGAGA GCAAAC
LWE1_chr6B_1654 6535_Rf4S	C	A	CAAGCCAACCCTCCTGCTGCGGCGGCGACACCC GATACATGGCTGGAGGCCCATGTCCATGTTGC CGGTGATGTATGGTGCCTGCGTTTGGTAGACTG G[C/A]GGCTGCCCGCTCATTTTTGTGATGCGTTC GCCCAGGCCTTTGAGCATTAACCTCCAACCTCCAA CCCATGGTTGTGAGCTCCTCGATGTTTACAGGGA GGC
LWE1_chr6B_1770 3725_Rf4S	T	C	ATCGTCAACAGACTTTGTTGCGTCTCGCTTGGCA GCCACGACCTTTTCAGGTGTCGTGGCGGTTTCA GCCTTCTTGATGGACTTCTCGGTGGCAGCATAG[T/C]GTGCGGCAGCTAAAGTACCGGCTGCTTCTTT CCTGCCTGGGGAGATAGAAGAACCTTACCATTT GCCTGCTGAGAGATGGCATTGTACTTTAATACAG C
cfn3066673	C	A	ACTTTATATGCAACGCTGAGAGGCGGCTCTTCCC C[A/C]CTTGGTTCGCATTTGTGGTAATACTTATCAT CATGT
LWE1_chr6B_2555 6418_Rf4S	C	T	CCCAGTAAAATGGTGTACTAAAAGAAGCCACGAA ATACGAATAGCCTATTGTAAGCATGTTTTGTTAG GATAGCGATGGGGAAAGAATAATAATGCTTA[C/T] AAAATATAACCACGCAAAAAGGTTGAAAACAAA CAAATATATTTGATTCACTTACCTCACTGGAACCA CAAGACCTTTGAAACCACTGCTCATTGA
cfn0870569	C	T	GAACCTTLAGAACATAGCACCGGGGCTTGAGCCG AT[C/T]ATCAAGGCTATAATAGAGCATTACCGGCC GACGAG

Примеры ниже приведены только для иллюстрации.

Варианты осуществления

1. Восстановитель фертильности цитоплазмы растения пшеницы *T. timopheevii* с ЦМС, где растение содержит по меньшей мере локусы Rf1, Rf3 и Rf4s.

2. Растение пшеницы по варианту осуществления 1, в котором указанный локус Rf1 расположен в пределах хромосомного интервала между SNP-маркерами cfn0522096 из SEQ ID NO:3 и cfn05277067 из SEQ ID NO:9.

3. Растение пшеницы по варианту осуществления 2, в котором указанный локус Rf1 характеризуется наличием одного или нескольких из следующих аллелей-восстановителей SNP:

SNP#	Название маркера	SEQ ID NO: маркера	Аллель-восстановитель
SNP1	cfn0523109	1	A
SNP2	276I13_96B22_97797	2	C
SNP3	cfn0522096	3	C
SNP4	cfn0527763	4	C
SNP5	104A4_105172	5	TG

SNP6	104A4 105588	6	A
SNP7	cfn0373248	7	T
SNP8	cfn1097828	8	C
SNP9	cfn0527067	9	A
SNP10	cfn0528390	10	G
SNP11	BWS0267	11	A
SNP12	cfn0527718	12	T
SNP13	cfn0524469	13	G
SNP14	cfn0524921	14	G
SNP15	cfn1122326	15	C
SNP16	RFL79 S7	16	G

4. Растение пшеницы по любому из вариантов осуществления с 1 по 3, в котором указанный локус Rf1 характеризуется присутствием по меньшей мере нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 64 или нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую идентичность по меньшей мере 95%, предпочтительно 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 64.

5. Растение пшеницы по любому из вариантов осуществления с 1 по 4, в котором локус Rf3 расположен внутри хромосомного фрагмента между SNP-маркерами cfn1249269 из SEQ ID NO:19 и BS00090770 из SEQ ID NO:42.

6. Растение пшеницы по варианту осуществления 5, в котором указанный локус Rf3 характеризуется наличием одного или нескольких из следующих аллелей-восстановителей SNP:

SNP#	Название маркера	SEQ ID маркера	Аллель-восстановитель
SNP17	cfn1252000	17	A
SNP18	IWB14060*	18	G
SNP19	cfn1249269	19	G
SNP20	219K1 166464	20	T
SNP21	219K1 158251	21	G
SNP22	219K1 111446	22	A
SNP23	219K1 110042	23	T
SNP24	219K1 110005	24	C
SNP25	219K1 107461	25	A
SNP26	219K1 99688	26	T
SNP27	219K1 37	27	C
SNP28	cfn1270524	28	T
SNP29	136H5 3M5 7601	29	T
SNP30	cfn1288811	30	G
SNP31	136H5 3M5 89176	31	A
SNP32	136H5 3M5 89263	32	T
SNP33	136H5 3M5 138211	33	T
SNP34	cfn0556874	34	C
SNP35	136H5 3M5 64154	35	C
SNP36	136H5 3M5 68807	36	G
SNP37	136H5 3M5 77916	37	A
SNP38	cfn1246088	38	A
SNP39	cfn1287194	39	G
SNP40	cfn1258380	40	A
SNP41	IWB72107*	41	A
SNP42	BS00090770	42	T

SNP43	cfn1239345	43	A
SNP44	RFL29 S2	44	G
SNP 45	RFL29 S4	45	C

7. Растение пшеницы по любому из вариантов осуществления 5 или 6, в котором указанный локус Rf3 характеризуется присутствием нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности, предпочтительно по меньшей мере 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO:72.

8. Растение пшеницы по любому из вариантов осуществления 1-7, в котором указанный локус Rf4s расположен в пределах хромосомного интервала между SNP-маркерами TaContig158085_61_BS00011513 из SEQ ID NO:46 и cfn0864865 из SEQ ID NO:47.

9. Растение пшеницы по любому из вариантов осуществления с 1 по 8, в котором указанный локус Rf4s содержит любой SNP Ae. speltoides на коротком плече хромосомы 6B в области, находящейся в диапазоне от 0 до 32 334 597 оснований в соответствии со ссылкой IWGSC V1, предпочтительно из области, находящейся в диапазоне от 0 до 29 782 272 оснований в соответствии со ссылкой IWGSC V1.

10. Растение пшеницы по варианту осуществления 8 или 9, в котором указанный локус Rf4s характеризуется наличием одного или нескольких из следующих аллелей SNP:

SNP#	Название маркера	SEQ ID маркера	Алель-восстановитель
SNP46	TaContig158085_61_BS00011513	46	T
SNP47	cfn0864865	47	G
SNP48	EXCALIBUR_C96134_152	48	C
SNP49	cfn3133296	49	G
SNP50	LWE1_chr6B_485210_Rf4S	50	T
SNP51	LWE1_chr6B_11287944_Rf4S	51	G
SNP52	LWE1_chr6B_19775886_Rf4S	52	G
SNP53	LWE1_chr6B_28157776_Rf4S	53	C
SNP66	LWE1_chr6B_3871398_Rf4S	271	A
SNP67	LWE1_chr6B_14093785	272	T
SNP68	LWE1_chr6B_14295343	273	C
SNP69	LWE1_chr6B_14299330	274	A
SNP70	LWE1_chr6B_14299539	275	T
SNP71	LWE1_chr6B_14311571	276	A
SNP72	LWE1_chr6B_14340935	277	G
SNP73	LWE1_chr6B_14340966	278	C
SNP74	LWE1_chr6B_15132053_Rf4S	279	T
SNP75	cfn0871746	280	G
SNP76	LWE1_chr6B_16546535_Rf4S	281	A
SNP77	LWE1_chr6B_17703725_Rf4S	282	C
SNP78	cfn3066673	283	C
SNP79	LWE1_chr6B_25556418_Rf4S	284	T
SNP80	cfn0870569	285	C

11. Пшеница по любому из вариантов осуществления 1-10, где растение также содержит локус Rf7 и/или 6R.

12. Растение пшеницы по варианту осуществления 11, где локус Rf7 расположен не более чем в 10 сМ от SNP-маркера cfn0919993 из SEQ ID NO:55.

13. Растение пшеницы по варианту осуществления 11 или 12, в котором указанный локус Rf7 характеризуется наличием одного или нескольких из следующих аллелей-восстановителей SNP:

SNP#	Название маркера	SEQ ID маркера	Аллель-восстановитель
SNP54	cfn0917304	54	T
SNP55	cfn0919993	55	G
SNP56	cfn0920459	56	C
SNP57	cfn0915987	57	G
SNP58	cfn0920253	58	A
SNP59	cfn0448874	59	T
SNP60	cfn0923814	60	C
SNP61	cfn0924180	61	G
SNP62	cfn0919484	62	G
SNP64	LWE1_chr7B_658281643 Rf7	263	G
SNP65	LWE1_chr7B_711539100 Rf7	264	A

14. Растение пшеницы по любому из вариантов осуществления 11-13, в котором локус Rf7 характеризуется гаплотипом «T», «G», «C», «G», «A», «T», «C», «G», «G», «G», «G» и «A» аллелей-восстановителей SNP54-SNP62 и SNP64-SNP65, соответственно, как описано в Таблице по п.13.

15. Растение пшеницы по любому из вариантов осуществления 11-14, дополнительно включающее локус 6R, где указанный локус 6R расположен на хромосоме 6R и в пределах хромосомного интервала от 48,9 сМ до 114,8 сМ.

16. Растение пшеницы по любому из вариантов осуществления 11-15, в котором указанный локус 6R характеризуется наличием следующего аллеля-восстановителя SNP:

SNP#	Название маркера	SEQ ID маркера	Аллель-восстановитель
SNP63	RFL46_S2	63	A

17. Растение пшеницы по любому из вариантов осуществления 1-16, в котором типичные аллели Rf1, Rf3 и Rf4s получены из образца семян, выбранного из NCIMB 43746 и NCIMB 43747.

18. Растение пшеницы по любому из вариантов осуществления 1-17, которое является аллоплазматическим и содержит цитоплазму *T. timopheevii*.

19. Способ получения гибридного растения пшеницы, включающий этапы:

- скрещивания стерильного женского растения, содержащего цитоплазму *T. timopheevii*, с фертильным мужским растением пшеницы по любому из вариантов

осуществления 1-18;

- сбора гибридного семени;
- при необходимости определение наличия цитоплазмы *T. timopheevii* и/или по меньшей мере трех Rf-локусов, выбранных из Rf1, Rf3, Rf4s, Rf7 и 6R, в гибридных семенах;
- при необходимости определение уровня гибридности гибридных семян.

20. Способ по варианту осуществления 19, дополнительно включающий после этапа (b) этап детекции присутствия цитоплазмы *T. timopheevii* и/или аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf4s в гибридных семенах.

21. Способ по варианту осуществления 20, дополнительно включающий этап детекции наличия локусов Rf7 или 6R в гибридных семенах.

22. Способ получения гибридных семян пшеницы, включающий этапы:

- a) скрещивание первого и второго растений пшеницы в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-18;
- b) сбор гибридных семян;
- c) при необходимости определение уровня гибридности гибридных семян.

23. Способ по варианту осуществления 22, в котором показатель фертильности полученного растения пшеницы выше, чем у родительского растения пшеницы.

24. Гибридное растение пшеницы, полученное способом по вариантам осуществления 19-23.

25. Способ идентификации растения пшеницы по любому из вариантов осуществления 1-18, в котором указанное растение пшеницы идентифицируют путем детекции наличия по меньшей мере одного аллеля-восстановителя в пределах одного или нескольких локусов Rf1, Rf3, Rf4s, Rf7 и 6R, предпочтительно в пределах трех локусов Rf1, Rf3 и Rf4s.

26. Способ получения восстановителя фертильности растений пшеницы по любому из вариантов осуществления 1-18, включающий следующие этапы:

- a) получение первого растения пшеницы, содержащего один или два аллеля-восстановителя, выбранных среди аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf4s;
- b) скрещивание указанного первого растения пшеницы со вторым растением пшеницы, содержащим один или два аллеля-восстановителя, выбранных из аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf4s, где аллели-восстановители Rf1, Rf3 и Rf4s представлены по меньшей мере один раз в панели аллелей-восстановителей, обеспеченной первым растением и вторым растением;
- c) сбор гибридных семян F1;

d) получение гомозиготных растений из растений F1;

e) детекция наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf4s в гибридных семенах и/или в каждом поколении.

27. Способ получения восстановителя фертильности растения пшеницы, включающий следующие этапы:

e) получение первого растения пшеницы, содержащего по меньшей мере аллели-восстановители Rf1, Rf3 и Rf4s по любому из вариантов осуществления 1-18;

f) скрещивание указанного первого растения пшеницы со вторым растением пшеницы;

g) сбор семян гибрида F1;

h) получение гомозиготных растений из растений F1;

i) при необходимости детекция наличия аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf4s в гибридных семенах и/или в каждом поколении, и при необходимости дальнейшая детекция наличия аллелей-восстановителей Rf7 и/или 6R в гибридных семенах и/или в каждом поколении.

28. Способ получения восстановителя фертильности растения пшеницы, включающий следующие этапы:

d) скрещивание первого растения пшеницы по любому из пп. 1-18 со вторым растением пшеницы; с получением, таким образом, гибридного растения F1;

e) возвратное скрещивание указанного гибрида F1 со вторым растением пшеницы;

f) селекция восстановителя фертильности растения пшеницы среди растений пшеницы, полученных на этапе (b), путем детекции наличия по меньшей мере аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf4s, и при необходимости, дополнительная детекция наличия аллелей-восстановителей Rf7 и/или 6R.

29. Способ получения восстановителя фертильности растений пшеницы по п. 28, дополнительно включающий один или несколько этапов возвратного скрещивания растений пшеницы, выбранных путем детекции наличия по меньшей мере аллелей-восстановителей Rf1, Rf3 и Rf4s, и при необходимости путем дополнительной детекции наличия аллелей-восстановителей Rf7 и/или 6R.

30. Способ получения восстановителя фертильности растений пшеницы по п. 28 или 29, в котором второе растение пшеницы представляет собой элитную линию пшеницы.

Примеры

Пример 1. Происхождение, восстанавливающая эффективность и селекция локуса Rf4s у *Aegilops speltoides*

Rf4 расположен на 6В хромосоме образца R113, которая также несет ген-восстановитель Rf1, и частично восстанавливает фертильность аллоплазматической пшеницы с цитоплазмой *T. timopheevii* (Maan et al., 1984).

L13 - это линия, производная от R113, и содержит только Rf4 (Австралийский генный банк зерна 90819). Присутствие Rf4 было подтверждено с помощью идентификации QTL с расположением на 6BS в картируемой популяции из 117 особей F2 перекрестного «CMS line/L13» (данные не показаны). Локус на 6BS со значением $p = 1,08E^{-13}$ объясняет 70,5% общей дисперсии).

GSTR435 - интрогрессионная линия *Ae. speltoides* с Lr36 (Родословная: Неерава/Линия 2-9-2(Неерава*5/*Aegilops speltoides* 2-9)/3*Manitou; Министерство сельского хозяйства США, E84018). Интрогрессия локализована в дистальной части короткого плеча хромосомы 6В (Dvorak J and Knott DR, 1990).

GSTR435 частично восстанавливает фертильность аллоплазматической пшеницы с цитоплазмой *T. timopheevii*, и это частичное восстановление фертильности выше, чем у L13. См. таблицу 8.

Таблица 8. Уровень фертильности, выраженный как среднее количество зерен на колосе растений F1 (перекрестная стерильная линия CMS/GSTR435 или L13). Растения F1 = количество отдельных растений F1, σ = стандартное отклонение, \bar{x} = среднее количество зерен на колосе.

Генотип	Растения F1	σ	\bar{x}
GSTR435	10	1,0	1,7
L13	12	0,4	0,8

Картируемая популяция показала, что восстанавливающий локус GSTR435 расположен в дистальной части короткого плеча хромосомы 6В (данные не показаны). Эта картируемая популяция была составлена из популяции F2, состоящей из 94 растений перекрестной «линии CMS/GSTR435» (локус 6BS со значением $p = 3,15E^{-12}$, объясняет 68,4% общей дисперсии).

Этот новый локус-восстановитель был назван Rf4s, в противоположность локусу Rf4, присутствующему в R113 и L13 от *T. timopheevii*.

LGWR20-0485 - это аллоплазматическая линия восстановителей, разработанная компанией Limagrain путем племенной селекции от скрещивания доноров GSTR435, Rf1 и Rf3strong и элитных линий. LGWR20-0485 - это сорт озимой пшеницы, агрономически адаптированный к выращиванию в Западной Европе, и является гомозиготным по

аллелям-восстановителям Rf1, Rf3 и интрогрессией от GSTR435, несущего Rf4s (таблица 9). Сестринские линии с одинаковым гаплотипом были получены от одного и того же исходного скрещивания. Присутствие локуса Rf4s выявляют с помощью KASP *LWE1_chr6B_28157776_Rf4* и *LWE1_chr6B_11287944_Rf4S*.

Таблица 9. Гаплотипы для локусов Rf1, Rf3strong, Rf4s и цитоплазмы элитной линии-закрепителя Apache и линии-восстановителя LGWR20-0485.

Локус	Rf1	Rf3strong	Rf4s	Цитоплазма
Маркер	RFL79 S7	RFL29 S4	LWE1 chr6B 28157776 Rf4	ORF279 S4
APACHE	A	T	A	G
LGWR20-0485	G	C	C	C

Пример 2. Характеристика области генома, содержащей генетические детерминанты Rf4 *Aegilops speltoides*

Для определения области генома Rf4s у *Ae. speltoides* были использованы две стратегии. Популяция картирования F2 для выполнения точного картирования и секвенирования данных определяет размер интрогрессии *Ae. speltoides* из донорской линии GSTR435.

Сначала было проведено фенотипирование и генотипирование картируемой популяции F2, выделенной для Rf4 GSTR435 x Manenick_CMS, охватывающей 94 особи, с использованием 18100 SNP-маркеров с применением внутренней платформы генотипирования Limagrain.

Тесты на фертильность проводили в помещении при контролируемых условиях роста, либо в камерах для выращивания, либо в теплицах, что обеспечивало нормальную фертильность тестируемых растений пшеницы. Указанные показатели фертильности были рассчитаны путем деления общего количества семян, собранных с колоса, на количество подсчитанных колосьев. QTL-анализ всего генома был проведен на растениях F2 с использованием метода составного интервального картирования (внутренний инструмент) и внутренних генетических консенсусных карт.

Rf4 был впервые картирован на коротком плече хромосомы 6B между 6 cM и 43 cM на внутренней консенсусной карте Limagrain и физически ограничен SNP-маркерами TaContig158085_61_BS00011513 и cfn0864865. Эти два SNP-маркера ограничивают максимально возможный интервал, определенный тремя картируемыми популяциями.

На втором этапе локус был точно картирован путем скрининга 1811 и 3142 линий F3 из GSTR435 x Manenick_CMS, полученных от растений F2, гетерозиготных по локусу. Фенотипирование и анализ потомства рекомбинантных растений в пределах интервала дополнительно определили меньший интервал картирования между 6 и 36 cM, ограниченный SNP-маркерами EXCALIBUR_C96134_152 и cfn3133296. Используя этот

новый анализ QTL, мы пришли к выводу, что ген может находиться от начала 6В хромосомы до маркера *cfn3133296*, то есть от 0 до физической позиции 29 782 272 (ссылка на позицию IWGSC V1).

Во-вторых, мы использовали данные секвенирования для определения размера интрогрессии *GSTR435 Ae. speltoides*, содержащего локус *Rf4*. Из-за размера генома пшеницы мы выполнили внутреннее частичное секвенирование с использованием метода захвата экзона. Стратегия секвенирования экзона обычно используется в пшенице для детекции SNP и подчеркивает интрогрессию по отношению к геному дикого типа (Hu et al., 2019), но любая стратегия секвенирования всего генома может предоставить доступ к той же информации.

Путем вычисления вариаций покрытия считываемых последовательностей внутри экзонов между различными линиями пшеницы, отличными от *Rf4*, и линией *Rf4 GSTR435*, было подтверждено, что *GSTR435* содержит чужеродную интрогрессию (*Ae. speltoides*) на коротком плече 6В хромосомы. Мы оценили положение интрогрессии *Aegilops speltoides* от начала 0 до 32 334 597 п.н. на 6В (ссылка на физическое положение IWGSC V1).

Наконец, было выделено 377 полиморфных SNP, специфичных для интрогрессии *GSTR435 6В Ae. speltoides*, которые можно использовать для отслеживания и идентификации локуса *Rf4s*. Из 377 полиморфных SNP 4 были преобразованы в маркеры *Kaspar*, чтобы следовать интрогрессии *Rf4s*:

- *LWE1_chr6B_485210_Rf4S*,
- *LWE1_chr6B_11287944_Rf4S*,
- *LWE1_chr6B_19775886_Rf4S*, и
- *LWE1_chr6B_28157776_Rf4S*.

Пример 3. Происхождение, восстанавливающая эффективность и селекция интрогрессии ржи T4BS 6BL 6RL

Длинное плечо хромосомы 6R ржи из дополнительных линий восстанавливает фертильность аллоплазматической пшеницы с цитоплазмой *T. timopheevii* (Curtis and Lukaszewski, 1993).

Были созданы 4 транслокационные линии с 6RL, которые доступны по заказу в Ресурсном центре генетики пшеницы Университета штата Канзас. Они содержат три различных события транслокации между 6RL и хромосомами пшеницы:

- TA5030 (KS92WGRC17, PI592729) T6BS·6BL-6RL (Sebesta et al., 1997)
- TA5031(KS92WGRC18, PI592730) T4BS·4BL-6RL (Sebesta et al., 1997)
- TA5032 (KS92WGRC19, PI592731) T4BS·4BL-6RL (Sebesta et al., 1997)

• TA5041 (KS93WGRC28, PI583794) T6BS·6RL, потомок TA2929 (TAM104, Friebe et al., 1995)

Три индуцированные излучением хромосомные транслокации T6BS·6RL, T6BS·6BL-6RL и T4BS·4BL-6RL могут частично восстановить фертильность аллоплазматической пшеницы с цитоплазмой *T. timopheevii* (таблица 10). Плечо 6RL имеет проксимальную область, гомологичную группе 6 хромосомы пшеницы, одну интерстициальную область, гомологичную длинным плечам группы 3 хромосом пшеницы, и дистальную область, гомологичную длинным плечам группы 7 хромосом пшеницы (Devos et al., 1993). Следовательно, крайне маловероятно, что транслоцированный фрагмент хромосомы 6RL в T4BS·4BL-6RL может рекомбинировать с хромосомой группы.

Таблица 10. Уровень фертильности, выраженный как среднее количество зерен на колосе растений F1 (перекрестная стерильная линия CMS/TA2929, или TA5030 или TA5031). Растения F1 = количество отдельных растений F1, σ = стандартное отклонение, \bar{x} = среднее количество зерен на колосе.

Генотип	Растения F1	σ	\bar{x}
TA2929	16	0,46	1,04
TA5030	51	1,01	1,14
TA5031	64	0,87	1,69

LGWR17-0160 - это аллоплазматическая линия-восстановитель, разработанная компанией Limagrain путем племенной селекции от скрещивания доноров TA5031, Rf1 и Rf3 и элитных линий.

LGWR17-0160 - это линия озимой пшеницы, агрономически адаптированная к выращиванию в Западной Европе, гомозиготная по аллелям-восстановителям Rf1, Rf3 и с интрогрессией T4BS·4BL-6RL из TA5031 (таблица 11, транслокация T4BS·4BL-6RL называется «6RL»).

Транслокация T4BS·4BL-6RL выявляется по аллелю «А» для маркера KASP RFL46_S2, аллель «G» этого маркера указывает на отсутствие транслокации и, следовательно, на отсутствие способности к восстановлению фертильности. Образец TA5041 в равной степени несет аллель-восстановитель «А» для маркера KASP RFL46_S2.

Таблица 11. Гаплотипы для локусов Rf1, Rf3, интрогрессии T4BS·4BL-6RL (кодированной 6R) и цитоплазмы элитной линии-закрепителя Apache и линии-восстановителя LGWR17-0160

Локус	Rf1	Rf3	6RL	Цитоплазма
Маркер	RFL79 S7	RFL29 S4	RFL46 S2	ORF279 S4
APACHE	A	T	G	G
LGWR17-160	G	C	A	C

TA5031 должен иметь транслокацию T4BS·4BL-6RL. Но в соответствии с доминирующими профилями маркеров и тем фактом, что RFL46_S2 является «диагностическим», мы считаем, что этот донора является T6BL-6RL-транслоцированным. Мы заметили эти доминантные профили на 6В от 48,9 сМ до 114,8 сМ (=конец хромосомы).

Пример 4. Новые комбинации аллелей Rf для полного восстановления фертильности гибридов CMS

Общепризнано, что полное восстановление фертильности культивируемого гибрида CMS может быть достигнуто только путем кумулятивного воздействия нескольких локусов Rf с основным эффектом, возможно, с комбинированной помощью гена (генов)-модификатора, которые могут способствовать усилению общей экспрессии фертильности.

Минимум три Rf-гена должны быть скрещены вместе в линии-восстановителе, чтобы обеспечить своевременное и географически стабильное восстановление фертильности F1.

Поэтому необходимо использование молекулярных маркеров, тесно связанных с соответствующими локусами, поскольку одних показателей фертильности линий-восстановителей недостаточно для создания комбинации из трех Rf-аллелей.

Следующий пример демонстрирует невозможность создания линии-восстановителя с цитоплазмой *Triticum timopheevii*, гомозиготной по трем локусам или более, без использования молекулярных маркеров, строго связанных с генами.

Это относится к любому используемому методу селекции, такому как, например, получение двойных гаплоидов, селекционное разведение, индивидуальный отбор от одного семени, возвратное скрещивание.

Из 27 возможных различных гаплотипов, созданных в течение поколений, 17 могут привести к полной фертильности линии-восстановителя, вводя селекционера в заблуждение относительно создания полностью фертильных линий-восстановителей, не содержащих все три восстанавливающих аллеля (таблица 12).

Таблица 12. Расчетный уровень восстановления фертильности для каждого индивидуального гаплотипа комбинации аллелей-восстановителей (Rf) и невосстанавливающих аллелей (rf) 3 локусов Rf1, Rf3 и Rf4s в линиях аллоплазматических восстановителей.

Аллели-восстановители	Локус Rf1	Локус Rf3strong	Локус Rf4s	Фертильность
0	rf1/rf1	rf3/rf3	rf4s/rf4s	0%
1	rf1/Rf1	rf3/rf3	rf4s/rf4s	25-50%
1	rf1/rf1	rf3/Rf3	rf4s/rf4s	25-50%
1	rf1/rf1	rf3/rf3	rf4s/Rf4s	25-50%
2	<u>Rf1/Rf1</u>	rf3/rf3	rf4s/rf4s	50-75%
2	rf1/rf1	<u>Rf3/Rf3</u>	rf4s/rf4s	50-75%
2	rf1/rf1	rf3/rf3	<u>Rf4s/Rf4s</u>	50-75%
2	rf1/ <u>Rf1</u>	rf3/ <u>Rf3</u>	rf4s/rf4s	50-75%
2	rf1/Rf1	rf3/rf3	rf4s/Rf4s	50-75%
2	rf1/rf1	rf3/ <u>Rf3</u>	rf4s/ <u>Rf4s</u>	50-75%
3	<u>Rf1/Rf1</u>	rf3/ <u>Rf3</u>	rf4s/rf4s	полная
3	<u>Rf1/Rf1</u>	rf3/rf3	rf4s/ <u>Rf4s</u>	полная
3	rf1/ <u>Rf1</u>	<u>Rf3/Rf3</u>	rf4s/rf4s	полная
3	rf1/rf1	<u>Rf3/Rf3</u>	rf4s/ <u>Rf4s</u>	полная
3	rf1/ <u>Rf1</u>	rf3/rf3	<u>Rf4s/Rf4s</u>	полная
3	rf1/rf1	rf3/ <u>Rf3</u>	<u>Rf4s/Rf4s</u>	полная
3	rf1/Rf1	rf3/ <u>Rf3</u>	rf4s/ <u>Rf4s</u>	полная
4	<u>Rf1/Rf1</u>	<u>Rf3/Rf3</u>	rf4s/rf4s	полная
4	<u>Rf1/Rf1</u>	rf3/ <u>Rf3</u>	rf4s/ <u>Rf4s</u>	полная
4	rf1/rf1	<u>Rf3/Rf3</u>	<u>Rf4s/Rf4s</u>	полная
4	rf1/ <u>Rf1</u>	<u>Rf3/Rf3</u>	rf4s/ <u>Rf4s</u>	полная
4	rf1/rf1	<u>Rf3/Rf3</u>	<u>Rf4s/Rf4s</u>	полная
4	rf1/ <u>Rf1</u>	rf3/ <u>Rf3</u>	<u>Rf4s/Rf4s</u>	полная
5	<u>Rf1/Rf1</u>	<u>Rf3/Rf3</u>	rf4s/ <u>Rf4s</u>	полная
5	<u>Rf1/Rf1</u>	rf3/ <u>Rf3</u>	<u>Rf4s/Rf4s</u>	полная
5	rf1/ <u>Rf1</u>	<u>Rf3/Rf3</u>	<u>Rf4s/Rf4s</u>	полная
6	<u>Rf1/Rf1</u>	<u>Rf3/Rf3</u>	<u>Rf4s/Rf4s</u>	полная

На сегодняшний день идентифицировано девять Rf-генов, восстанавливающих фертильность цитоплазмы *T. timopheevii*: Rf1 (1A), Rf2 (7D), Rf3 (1B), Rf4 (6B), Rf5 (6D), Rf6 (5D), Rf7 (7B), Rf8 (2D) и Rf9 (6AS) (Tahir and Tsunewaki 1969; Yenet al., 1969; Bahl and Maan 1973; Mukai and Tsunewaki 1979; Wilson and Driscoll 1983; Maan et al., 1985; Du et al., 1991; Sinha et al., 2013; Shahinnia et al. 2020).

По отдельности все эти 9 Rf-локусов могут демонстрировать разные уровни экспрессивности, и их комбинации могут оказаться не совсем аддитивными, примером

чего может служить неаддитивный эффект локусов Rf4 и Rf1 (Geyer et al., 2017).

В таблице 13 ниже приведена серия показателей фертильности F1 при использовании линий-восстановителей с различными комбинациями от 3 до 4 аллелей-восстановителей.

Таблица 13. Уровень фертильности, выраженный как среднее количество семян на колосе, и набор семян, выраженный как среднее общее количество семян на колосе, растений F1, полученных с использованием серии линий-восстановителей, демонстрирующих различную комбинацию локусов-восстановителей Rf1, Rf3, Rf3w (Rf3 «слабый»), Rf4, Rf4s и 6R. nb = количество отдельных колосьев. σ = стандартное отклонение, \bar{x} = среднее значение.

	Фертильность			Набор семян		
	nb	Среднее значение	σ	nb	Среднее значение	σ
Rf1+Rf3+Rf7	119	2,84	0,51	119	57,21	13,69
Rf1+Rf3+6R	42	2,41	0,44	42	54,14	11,31
Rf1+Rf3+Rf4s	93	2,59	0,35	93	59,09	10,97
Rf1+Rf3+Rf4	7	2,08	0,45	7	37,00	9,09
Rf1+Rf3+Rf4+Rf7	9	2,16	0,32	9	49,00	7,55
Rf1+Rf3w+Rf4+Rf7	39	2,22	0,32	39	41,82	6,92
Rf1+Rf3w+Rf7	265	2,37	0,45	265	53,83	11,37
Rf3+Rf7+6R	18	2,62	0,22	18	52,28	7,09
Rf3w+Rf4+Rf7	10	1,80	0,48	10	34,40	10,52
Контроль	189	2,7	0,5	189	56,9	12,1

Четыре комбинации из трех аллелей-восстановителей Rf либо статистически лучше, либо эквивалентны ($\alpha = 0,05$) группе элитных линий (обозначенных как контрольные линии) либо по фертильности, либо по набору семян, либо по обоим параметрам: Rf1+Rf3+Rf7, Rf3+Rf7+6R, Rf1+Rf3+Rf4s и Rf1+Rf3+6R. Все остальные комбинации из трех или четырех Rf-аллелей статистически уступают контрольной группе ($\alpha = 0,05$) как по фертильности, так и по набору семян (таблицы 14 и 15).

Таблица 14. t-критерий Стьюдента для сравнения средней фертильности растений F1 и контроля (среднее количество зерен на колос). В столбце гаплотипов указана комбинация аллелей Rf линии-восстановителя, используемой для получения растений F1.

$\alpha = 0,05$

Гаплотип		Среднее значение
Rf1+Rf3+Rf7	A	2,8360804
Контроль	A	2,7353917
Rf3+Rf7+6R	A B C	2,6153608
Rf1+Rf3+Rf4s	B	2,5861419
Rf1+Rf3+6R	C D	2,4073307
Rf1+Rf3w+Rf7	D	2,3675521
Rf1+Rf3w+Rf4+Rf7	D	2,2183024
Rf1+Rf3+Rf4+Rf7	D E	2,1648731
Rf1+Rf3+Rf4	D E	2,0812417
Rf3w+Rf4+Rf7	E	1,7988889

Таблица 15. t-критерий Стьюдента для сравнения средних значений для набора семян растений F1 и контроля (среднее количество зерен на колос). В столбце гаплотипов указана комбинация аллелей Rf линии-восстановителя, используемой для получения растений F1. $\alpha = 0,05$.

Гаплотип		Среднее значение
Rf1+Rf3+Rf4s	A	59,086022
Rf1+Rf3+Rf7	A B	57,210084
checks	A B	56,888889
Rf1+Rf3+6R	B C	54,142857
Rf1+Rf3w+Rf7	C	53,826415
Rf3+Rf7+6R	B C	52,277778
Rf1+Rf3+Rf4+Rf7	C D	49,000000
Rf1+Rf3w+Rf4+Rf7	D E	41,820513
Rf1+Rf3+Rf4	E	37,000000
Rf3w+Rf4+Rf7	E	34,400000

В таблицах 14 и 15 для всех переменных с одинаковой буквой разница между средними значениями не является статистически значимой.

Список литературы

Ahmed et al., 2001. QTL analysis of fertility restoration against cytoplasmic male sterility in wheat. *Genes Genet Syst*, 76:33-38.

Bahl PN, Maan SS, 1973. Chromosomal location of fertility restoring genes in six lines of common wheat. *Crop Sci* 13: 317-320.

Bennetzen JL et al., 2012. Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. *Nat Biotechnol* 30 (6):555-+. doi:10.1038/nbt.2196.

Brenchley R, et al., 2012. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* 491 (7426):705-710. doi:10.1038/nature11650.

Cannarozzi G, et al., 2014. Genome and transcriptome sequencing identifies breeding targets in the orphan crop tef (*Eragrostis tef*). *Bmc Genomics* 15. doi:Artn 58110.1186/1471-2164-15-581.

Chen JF et al., 2013. Whole-genome sequencing of *Oryza brachyantha* reveals mechanisms underlying *Oryza* genome evolution. *Nature Communications* 4. doi:ARTN 159510.1038/ncomms2596.

Cheng SF, Gutmann B, Zhong X, Ye YT, Fisher MF, Bai FQ, Castleden I, Song Y, Song B, Huang JY, Liu X, Xu X, Lim BL, Bond CS, Yiu SM, Small I (2016) Redefining the structural motifs that determine RNA binding and RNA editing by pentatricopeptide repeat proteins in land plants. *Plant Journal* 85 (4):532-547. doi:10.1111/tpj.13121.

Christensen AH and Quail PH, 1996. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic*

Res, May;5(3):213-8.

Christian et al., 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol.* 18(4):675-89.

Curtis and Lukaszewski, 1993. Localization of genes in Rye that restore male fertility to hexaploid wheat with timopheevii cytoplasm. *Plant breeding*, 11:106-112.

Depigny-This D et al., 1992. The cruciferin gene family in radish. *Plant Molecular Biology*, 20: 467-479.

Du H, Maan SS, Hammond JJ (1991) Genetic analyses of male fertility restoration in wheat. III. Effects of aneuploidy. *Crop Sci* 31:319–322.

Fehr WR et al, 1987. *Principles of Cultivar Development Vol.1 Theory and Technique.* Macmillan, New York.

Fujii S, Bond CS, Small ID (2011) Selection patterns on restorer-like genes reveal a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout angiosperm evolution. *P Natl Acad Sci USA* 108 (4):1723-1728. doi:DOI 10.1073/pnas.1007667108.

Geyer M et al., 2016. Distribution of the fertility-restoring gene Rf3 in common and spelt wheat determined by an informative SNP marker. *Mol Breeding*, 36:167. DOI 10.1007/s11032-016-0592-6.

Götz H et al., 2011. Transgene Expression Systems in the Triticeae Cereals. *Journal of Plant Physiology* 168, no. 1 : 30–44. doi:10.1016/j.jplph.2010.07.007.

International Brachypodium I (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463 (7282):763-768. doi:10.1038/nature08747.

Jacquemin J, et al., 2013. The International Oryza Map Alignment Project: development of a genus-wide comparative genomics platform to help solve the 9 billion-people question. *Curr Opin Plant Biol* 16 (2):147-156. doi:10.1016/j.pbi.2013.02.014.

Jefferson, R.A., 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Report.* 5, 387–405. DOI:10.1007/BF02667740.

Jia J, et al., 2013. *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature* 496 (7443):91-95. doi:10.1038/nature12028.

Jones HD, 2015. Wheat Biotechnology: Current Status and Future Prospects. K. Azhakanandam et al. (eds.), *Recent Advancements in Gene Expression and Enabling Technologies in Crop Plants*, DOI 10.1007/978-1-4939-2202-4_8.

Kay R, et al., 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236:1299–1302.

Kawahara Y et al., 2013. Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome

using next generation sequence and optical map data. *Rice* 6. doi:Artn 410.1186/1939-8433-6-4.

Kihara, 1951, Genome analysis in *Triticum* and *Aegilops* X. Concluding review. *Cytologia*, 16: 101-123.

Kojima et al., 1997, High-resolution RFLP mapping of the fertility restoration (Rf3) gene against *Triticum timopheevii* cytoplasm located on chromosome 1BS of common wheat. *Genes Genet Syst*, 72: 353-359.

Krasileva KV et al., 2013. Separating homeologs by phasing in the tetraploid wheat transcriptome. *Genome Biol* 14 (6). doi:ARTN R66 10.1186/gb-2013-14-6-r66.

Li et al., 2003. OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes. *Genome Res.* 2003 Sep; 13(9): 2178–2189.

Li H. and Durbin R, 2010. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*, Epub. [PMID: 20080505].

Ling HQ et al., 2013. Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*. *Nature* 496 (7443):87-90. doi:10.1038/nature11997.

Longin et al., 2012 , Hybrid breeding in autogamous cereals. *Theor Appl Genet.*: 125:1007-1096. DOI 10.1007/s00122012-1967-7.

Ma ZQ and Sorrells ME, 1995, Genetic analysis of fertility restoration in wheat using RFLP. *Crop Sci.*, 35:1137-1143.

Maan, S. S. Genetic analyses of male-fertility restoration in wheat: isolation, penetrance, and expressivity of Rf genes. *Crop Sci.* 25, 743–748 (1985).

Mace ES et al., 2013. Whole-genome sequencing reveals untapped genetic potential in Africa's indigenous cereal crop sorghum. *Nat Commun* 4:2320. doi:10.1038/ncomms3320.

McElroy D et al., 1990. Isolation of an Efficient Actin Promoter for Use in Rice Transformation. *The Plant Cell*, Vol. 2, 163-171.

Martis MM et al., 2013. Reticulate Evolution of the Rye Genome. *Plant Cell* 25 (10):3685-3698. doi:10.1105/tpc.113.114553.

Mayer KFX, et al., 2014. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science* 345 (6194). doi:ARTN 125178810.1126/science.1251788.

Mayer KFX et al., Conso IBGS, 2012. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491 (7426):711-+. doi:10.1038/nature11543.

Melonek, J., Duarte, J., Martin, J. *et al.* The genetic basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in wheat. *Nat Commun* **12**, 1036 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21225-0>.

Mukai Y, Tsunewaki K (1979) Basic studies on hybrid wheat breeding. A new male

sterility-fertility restoration system in common wheat utilizing the cytoplasm of *Aegilops kotschy* and *Ae. Variabilis*. Theor Appl Genet 54:153-160.

Ouyang S et al, 2007. The TIGR Rice Genome Annotation Resource: Improvements and new features. Nucleic Acids Res 35:D883-D887. doi:10.1093/nar/gkl976.

Pallavi Sinha P et al., 2013. Genetic analysis and molecular mapping of a new fertility restorer gene Rf8 for *Triticum timopheevii* cytoplasm in wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers. Genetica, 141: 131-141.

Paterson AH et al., 2009. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. Nature 457 (7229):551-556. doi:10.1038/nature07723.

Rathburn and Hedgcoth, 1991. Chimeric open reading frame in the 5' flanking region of coxI mitochondrial DNA from cytoplasmic male-sterile wheat. Plant Mol. Biol., 16:909-912.

Rice P et al., 2000. A. EMBOSS: The European molecular biology open software suite. Trends Genet 16, 276–277, 10.1016/S0168-9525(00)02024-2.

Sakai H, et al., 2013. Rice Annotation Project Database (RAP-DB): An Integrative and Interactive Database for Rice Genomics. Plant Cell Physiol 54 (2):E6+. doi:10.1093/pcp/pcs183.

Schnable PS, et al., 2009. The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. Science 326 (5956):1112-1115. doi:10.1126/science.1178534.

Shahinnia F, Geyer M, Block A, Mohler V, Hartl L. Identification of *Rf9*, a Gene Contributing to the Genetic Complexity of Fertility Restoration in Hybrid Wheat. Front Plant Sci. 2020 Dec 10;11:577475. doi: 10.3389/fpls.2020.577475. PMID: 33362809; PMCID: PMC7758405.

Sinha, P., Tomar, S. M. S., Vinod, Singh, V. K., and Balyan, H. S. (2013). Genetic analysis and molecular mapping of a new fertility restorer gene *Rf8* for *Triticum timopheevi* cytoplasm in wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers. *Genetica* 141, 431–441. doi: 10.1007/s10709-013-9742-5.

Singh SK et al., 2010. Perspective of hybrid wheat research: a review. Indian J Agric Sci 80:1013–1027.

Song and Hedgcoth, 1994. Influence of nuclear background on transcription of a chimeric gene orf256 and cox1 in fertile and cytoplasmic male sterile wheats. Genome, vol.37.

Stojalowski S et al., 2013. The importance of chromosomes from the sixth homeologic group in the restoration of male fertility in winter triticale with *Triticum timopheevii* cytoplasm. J. Appl. Genetics, 54:179-184.

Tahir, C. M. & Tsunewaki, K. Monosomic analysis of *Triticum spelta* var. *duhamelianum*, a fertility-restorer for *T. timopheevi* cytoplasm. Jpn. J. Genet. 44, 1–9 (1969).

Ch. M. Tahir and K. Tsunewaki, 1971. Monosomic analysis of fertility-restoring genes in *triticum aestivum* strain p168. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. <https://doi.org/10.1139/g71-003>.

Verdaguer et al., 1996. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. *Plant Molecular Biology* 31: 1129–1139.

Wang MH et al., 2014. The genome sequence of African rice (*Oryza glaberrima*) and evidence for independent domestication. *Nat Genet* 46 (9):982-+. doi:10.1038/ng.3044.

Wilson JA, Ross WM. 1962. Male sterility interaction of the *Triticum aestivum* nucleus and *Triticum timopheevii* cytoplasm. *Wheat Information Service (Kyoto)* 14: 29–30.

Wilson JA, Ross WM. 1962. Male sterility interaction of the *Triticum aestivum* nucleus and *Triticum timopheevii* cytoplasm. *Wheat Information Service (Kyoto)* 14, 29–30.

Wilson P, Driscoll Cj, 1983. Hybrid Wheat. *Monographs on theoretical and applied genetics*, Vol. 6, 94-123.

Wilson, 1984. Hybrid wheat breeding and commercial seed development. *Plant Breeding Rev.*, 2: 303-319. 2.

Whitford R et al., 2013. Hybrid breeding in wheat: technologies to improve hybrid wheat seed production. *Journal of Experimental Botany*. Doi:10.1093/jxb/ert333.

Zhou et al., 2005. SSR marker associated with fertility restoration genes against *Triticum timopheevii* cytoplasm in *Triticum aestivum*. *Euphytica*, 141:33-40.

Sebesta EE, Hatchett JH, Friebe B, Gill BS, Cox TS, and Sears RG. 1997. Registration of KS92WGRC17, KS92WGRC18, KS92WGRC19, and KS92WGRC20 winter wheat germplasms resistant to Hessian fly. *Crop Sci* 37:635.

<https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700020065x>

Friebe B, Gill BS, Tuleen NA, and Cox TS. 1995. *Crop Sci* 35:1237.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации восстановителя фертильности цитоплазмы растения пшеницы *T. timopheevii* с ЦМС, включающий детекцию наличия по меньшей мере одного аллеля-восстановителя в пределах одного или нескольких локусов Rf1, Rf3, Rf4s, Rf7 и 6R, предпочтительно в пределах трех локусов Rf1, Rf3 и Rf4s.

2. Способ по п. 1, в котором указанный локус Rf1 расположен в пределах хромосомного интервала между SNP-маркерами cfn0522096 из SEQ ID NO:3 и cfn0527067 из SEQ ID NO:9.

3. Способ по п. 1, в котором указанный локус Rf1 характеризуется наличием одного или нескольких из следующих SNP аллелей-восстановителей:

SNP#	Название маркера	SEQ ID NO: маркера	Аллель-восстановитель
SNP1	cfn0523109	1	A
SNP2	276I13_96B22_97797	2	C
SNP3	cfn0522096	3	C
SNP4	cfn0527763	4	C
SNP5	104A4_105172	5	TG
SNP6	104A4_105588	6	A
SNP7	cfn0373248	7	T
SNP8	cfn1097828	8	C
SNP9	cfn0527067	9	A
SNP10	cfn0528390	10	G
SNP11	BWS0267	11	A
SNP12	cfn0527718	12	T
SNP13	cfn0524469	13	G
SNP14	cfn0524921	14	G
SNP15	cfn1122326	15	C
SNP16	RFL79_S7	16	G

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанный локус Rf1 характеризуется присутствием по меньшей мере нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, или нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую идентичность по меньшей мере 95%, предпочтительно 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 64.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором локус Rf3 расположен внутри хромосомного фрагмента между SNP-маркерами cfn1249269 из SEQ ID NO:19 и BS00090770 из SEQ ID NO:42.

6. Способ по п. 5, в котором указанный локус Rf3 характеризуется наличием одного или нескольких из следующих SNP аллелей-восстановителей:

SNP#	Название маркера	SEQ ID маркера	Аллель-восстановитель
SNP17	cfn1252000	17	A
SNP18	IWB14060*	18	G
SNP19	cfn1249269	19	G
SNP20	219K1_166464	20	T
SNP21	219K1_158251	21	G

SNP22	219K1 111446	22	A
SNP23	219K1 110042	23	T
SNP24	219K1 110005	24	C
SNP25	219K1 107461	25	A
SNP26	219K1 99688	26	T
SNP27	219K1 37	27	C
SNP28	cfn1270524	28	T
SNP29	136H5 3M5 7601	29	T
SNP30	cfn1288811	30	G
SNP31	136H5 3M5 89176	31	A
SNP32	136H5 3M5 89263	32	T
SNP33	136H5 3M5 138211	33	T
SNP34	cfn0556874	34	C
SNP35	136H5 3M5 64154	35	C
SNP36	136H5 3M5 68807	36	G
SNP37	136H5 3M5 77916	37	A
SNP38	cfn1246088	38	A
SNP39	cfn1287194	39	G
SNP40	cfn1258380	40	A
SNP41	IWB72107*	41	A
SNP42	BS00090770	42	T
SNP43	cfn1239345	43	A
SNP44	RFL29 S2	44	G
SNP 45	RFL29 S4	45	C

7. Способ по любому из пп. 5 или 6, в котором указанный локус Rf3 характеризуется присутствием нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности, предпочтительно по меньшей мере 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO:72.

8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором указанный локус Rf4s расположен в пределах хромосомного интервала между SNP-маркерами TaContig158085_61_BS00011513 из SEQ ID NO:46 и cfn0864865 из SEQ ID NO:47.

9. Способ по любому из пп. 1-8, в котором указанный локус Rf4s содержит любой SNP *Ae. speltoides* на коротком плече хромосомы 6B в области, находящейся в диапазоне от 0 до 32 334 597 оснований в соответствии со ссылкой IWGSC V1, предпочтительно из области, находящейся в диапазоне от 0 до 29 782 272 оснований в соответствии со ссылкой IWGSC V1.

10. Способ по п. 8 или 9, в котором указанный локус Rf4s характеризуется присутствием одного или нескольких из следующих SNP аллелей:

SNP#	Название маркера	SEQ ID маркера	Аллель-восстановитель
SNP46	TaContig158085_61_BS00011513	46	T
SNP47	cfn0864865	47	G
SNP48	EXCALIBUR C96134 152	48	C
SNP49	cfn3133296	49	G

SNP50	LWE1 chr6B 485210 Rf4S	50	T
SNP51	LWE1 chr6B 11287944 Rf4S	51	G
SNP52	LWE1 chr6B 19775886 Rf4S	52	G
SNP53	LWE1 chr6B 28157776 Rf4S	53	C
SNP66	LWE1 chr6B 3871398 Rf4S	271	A
SNP67	LWE1 chr6B 14093785	272	T
SNP68	LWE1 chr6B 14295343	273	C
SNP69	LWE1 chr6B 14299330	274	A
SNP70	LWE1 chr6B 14299539	275	T
SNP71	LWE1 chr6B 14311571	276	A
SNP72	LWE1 chr6B 14340935	277	G
SNP73	LWE1 chr6B 14340966	278	C
SNP74	LWE1 chr6B 15132053 Rf4S	279	T
SNP75	cfn0871746	280	G
SNP76	LWE1 chr6B 16546535 Rf4S	281	A
SNP77	LWE1 chr6B 17703725 Rf4S	282	C
SNP78	cfn3066673	283	C
SNP79	LWE1 chr6B 25556418 Rf4S	284	T
SNP80	cfn0870569	285	C

11. Способ по любому из пп. 1-10, в котором растение также содержит локус Rf7 и/или 6R.

12. Способ по п. 11, в котором локус Rf7 расположен не более чем в 10 сМ от SNP-маркера cfn0919993 из SEQ ID NO:55.

13. Способ по пп. 11 или 12, в котором указанный локус Rf7 характеризуется наличием одного или нескольких из следующих SNP аллелей-восстановителей:

SNP#	Название маркера	SEQ ID маркера	Аллель-восстановитель
SNP54	cfn0917304	54	T
SNP55	cfn0919993	55	G
SNP56	cfn0920459	56	C
SNP57	cfn0915987	57	G
SNP58	cfn0920253	58	A
SNP59	cfn0448874	59	T
SNP60	cfn0923814	60	C
SNP61	cfn0924180	61	G
SNP62	cfn0919484	62	G
SNP64	LWE1 chr7B 658281643 Rf7	263	G
SNP65	LWE1 chr7B 711539100 Rf7	264	A

14. Способ по любому из пп. 11-13, в котором локус Rf7 характеризуется гаплотипом «Т», «G», «C», «G», «A», «Т», «C», «G», «G», «G», «G» и «А» и SNP54-SNP62 и SNP64-SNP65 аллелей-восстановителей, соответственно, как описано в таблице по п. 13.

15. Способ по любому из пп. 11-14, дополнительно включающий локус 6R, расположенный на хромосоме 6R и в пределах хромосомного интервала от 48,9 сМ до 114,8 сМ, при необходимости указанный локус 6R характеризуется присутствием следующего SNP аллеля-восстановителя:

SNP#	Название маркера	SEQ ID маркера	Аллель-восстановитель
SNP63	RFL46_S2	63	A