

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202492138 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.09

(22) Дата подачи заявки
2023.02.16

(51) Int. Cl. *A01H 1/04* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 1/08 (2006.01)
A01H 5/08 (2018.01)

(54) МАРКЕРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ СО СПОНТАННЫМ УДВОЕНИЕМ ХРОМОСОМ

(31) PCT/CN2022/077351

(32) 2022.02.23

(33) CN

(86) PCT/US2023/062691

(87) WO 2023/164393 2023.08.31

(88) 2023.09.28

(71) Заявитель:
СИНГЕНТА КРОП ПРОТЕКШН АГ
(CH)

(72) Изобретатель:

Перумал Ажагувель (US), Я Чжан
(CN), Брайтингер Беки Уэлш, Делзер
Брент, Эггер Рэйчел Луиза (US)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В данном документе представлены способы отбора и получения зародышевой плазмы, которая демонстрирует спонтанное удвоение хромосом при нахождении в гаплоидном состоянии. Способы включают выделение нуклеиновых кислот из первого растения или зародышевой плазмы маиса и выявление SCD-QTL1, ассоциированного с удвоением хромосом. Кроме того, способы включают отбор указанного первого растения или зародышевой плазмы маиса или потомка указанного первого растения или зародышевой плазмы маиса, содержащих SCD-QTL1, ассоциированный со спонтанным удвоением хромосом.

A1

202492138

202492138

A1

МАРКЕРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ СО СПОНТАННЫМ УДВОЕНИЕМ ХРОМОСОМ

5

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Раскрытый в настоящем документе объект изобретения в целом относится к селекции и удвоению хромосом у растений. Более конкретно, объект изобретения относится к способам получения и создания растений, демонстрирующих спонтанное удвоение хромосом при нахождении в гаплоидном состоянии. Кроме того, способы в данном документе относятся к интрогрессии локуса, представляющего интерес, и QTL, ассоциированного со спонтанным удвоением хромосом.

10

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] К настоящей заявке относится перечень последовательностей под названием 82610_ST26.xml, созданный 15 декабря 2022 г., размер которого составляет примерно 24 килобайта. Этот перечень последовательностей включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Этот перечень последовательностей подается вместе с данной заявкой и соответствует § 1.824(a)(2)-(6) и (b) раздела 37 C.F.R.

20

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Спонтанное удвоение хромосом ("SCD") является редким признаком у маиса. Понимание его механизма действия и локусов, ассоциированных с признаком, в последние годы представляет область интереса для научных исследований вследствие его потенциальной ценности для селекции удвоенных гаплоидов. Гаплоидные растения не способны образовывать фертильные гаметы во время мейоза, и у них должно произойти удвоение генетического материала для получения фертильной пыльцы и яйцеклеток. Таким образом, ожидается, что гаплоидные растения маиса без какого-либо вмешательства будут иметь полностью стерильную пыльцу, за исключением

наличия SCD, что позволит обеспечить корректную мейотическую редукцию числа хромосом и последующее образование зрелой пыльцы. В различных исследованиях было идентифицировано 35 QTL и SNP, ассоциированных с признаком в популяциях биаллельного маиса (обзор представлен в Voegtman, 2020). В нескольких исследованиях,

30

сосредоточенных на картировании QTL, связанных с SCD у *Zea mays*, были выявлены локусы на всех хромосомах маиса (Chaikam, 2019; Chaikam, 2020; Fuente, 2019; Ma, 2018; Molenaar, 2019; Ren, 2019; Vanous, 2019; Ren, 2017; Trampe, 2020; Wu, 2017; Yang, 2019). Тем не менее, было опубликовано относительно небольшое количество последующих исследований. Исключением является сильный QTL на хромосоме 5, идентифицированный в нескольких исследованиях и содержащий ген-кандидат BUBR1, идентифицированный в US20190106703. Однако QTL на хромосоме 5 не демонстрировал предсказуемой пенетрантности в различных образцах зародышевой плазмы, имеющейся в наличии. Следовательно, существует необходимость в идентификации QTL SCD, который обеспечивает лучшую предсказуемость и пенетрантность в образцах зародышевой плазмы.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Растения, являющиеся удвоенными гаплоидами, представляют большой интерес, применение и преимущество для селекционеров растений. Селекционеры скрещивают инбредные родительские линии (также называемые элитными линиями), при этом одна выступает в качестве мужской особи, а другая – в качестве женской особи, с образованием гибридного семени. Процесс разработки инбредных родительских линий, которые по сути являются гомозиготными, обычно требует отбора и самоопыления (самооплодотворения) растения в течение многих поколений, чтобы стать практически гомозиготным. Этот процесс является времязатратным и дорогостоящим. Для сокращения времени для разработки гомозиготных инбредных растений маиса, риса, пшеницы, ячменя и других сельскохозяйственных культур селекционеры могут предпочесть использовать линию, являющуюся гаплоиндуктором, для индуцирования продуцирования гаплоидных семян у гибридной родительской особи. Как правило, получение растений, являющихся удвоенными гаплоидами, предусматривает получение гаплоидного растения в результате скрещивания нормального растения и растения, являющегося гаплоиндуктором, или путем культивирования гаплоидных гаметофитов до гаплоидных спорофитов посредством культивирования микроспор, культивирования пыльников, культивирования семяпочек или культивирования завязи. Гаплоидные спорофиты растений, у которых отсутствует какая-либо форма спонтанного удвоения числа хромосом, являются стерильными, если им позволяют развиваться без дополнительного вмешательства человека, и содержат только половину нормального количества хромосом для такого вида растения. См. S.T. Chalyk, *Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize*

breeding, EUPHYTICA 79:13-18 (1994), стр. 14, столбец 2. Например, маис считается диплоидным организмом, содержащим 20 хромосом (т. е. по две копии каждого набора из 10 различных хромосом). См., например, M.P. Maguire, *Chromosome behavior at premeiotic mitosis in maize*, J. HEREDITY 74:93-96 (1983), в таблице 1. Для сравнения, гаплоидное растение маиса содержит только 10 хромосом (т. е. по одной копии каждой из 10 хромосом). Для того, чтобы сделать гаплоидное растение фертильным, набор хромосом должен быть удвоен, по меньшей мере в мужских и женских клетках репродуктивной линии, если не во всем растении. Удвоение числа хромосом растения обычно осуществляют с применением жидкого(жидких) митотического(митотических) веретенного(веретенных) яда(ядов) – токсичных химических веществ, которые иногда применяются в лечении различных форм рака у людей, или эти химические вещества могут представлять собой гербициды, ингибирующие образование микротрубочек. См. Y. Wan, et al., *The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus*, THEOR. APPL. GENET. 81(2):205-211 (1991).

Хромосомы гаплоидных растений удваиваются посредством применения такого средства, удваивающего число хромосом (например, колхицина), с получением гомозиготных инбредных линий, являющихся удвоенными гаплоидами.

[0005] Без этого этапа удвоения гаплоидные растения маиса характеризуются мужским бесплодием, т. е. им не хватает способности образовывать пыльцу. В данном документе авторы настоящего изобретения идентифицировали QTL SCD на хромосоме 7 маиса, который, при его наличии, указывает на то, что растение маиса способно спонтанно удвоить свой гаплоидный геном, по меньшей мере в цветках, без необходимости применения средства, удваивающего число хромосом. Как только это спонтанное удвоение происходит, растение восстанавливает мужскую фертильность, т. е. оно восстанавливает способность образовывать пыльцу. Авторы настоящего изобретения обеспечивают способы отбора первого растения или зародышевой плазмы маиса, демонстрирующих SCD при нахождении в гаплоидном состоянии.

Дополнительно предусмотрены способы получения растения, являющегося спонтанно удвоенным гаплоидом, которое является мужским фертильным. Авторы настоящего изобретения также обеспечивают способы скрещивания указанного первого растения или зародышевой плазмы маиса со вторым растением или зародышевой плазмой маиса для интрогрессии локуса, представляющего интерес, где растение с интрогрессией демонстрирует SCD в гаплоидном состоянии. Кроме того, авторы настоящего изобретения обеспечивают способы интрогрессии локуса, представляющего интерес,

между первым и вторым растениями маиса, при этом получают растение маиса, демонстрирующее локус, представляющий интерес, и QTL SCD. Локус, представляющий интерес, предусматривает локус или аллель количественного признака, ассоциированный с признаком, выбранным из группы, состоящей из

5 повышенной урожайности, повышенной оптимизации потребления воды, повышенной устойчивости к заболеваниям, повышенной толерантности к засухе и повышенной устойчивости к гербицидам.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ПЕРЕЧНЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

10

[0006] SEQ ID NO: 1 представляет собой прямой праймер, используемый для амплификации маркера SM0077AQ в анализе TaqMan.

[0007] SEQ ID NO: 2 представляет собой обратный праймер, используемый для амплификации маркера SM0077AQ в анализе TaqMan.

15

[0008] SEQ ID NO: 3 представляет собой прямой праймер, используемый для амплификации маркера SM11142 в анализе TaqMan.

[0009] SEQ ID NO: 4 представляет собой прямой праймер, используемый для амплификации маркера SM11142 в анализе TaqMan.

20

[0010] SEQ ID NO: 5 представляет собой обратный праймер, используемый для амплификации маркера SM11142 в анализе TaqMan.

[0011] SEQ ID NO: 6 представляет собой целевую последовательность маркера SM0077AQ.

[0012] SEQ ID NO: 7 представляет собой целевую последовательность маркера SM11142.

25

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0013] Хотя предполагается, что следующие термины хорошо понятны специалисту в данной области техники, следующие определения приведены для облегчения пояснения раскрытого в данном документе объекта изобретения.

30

[0014] Все используемые в данном документе технические и научные термины, если ниже не указано иначе, предполагаются как имеющие такое же значение, которое обычно понятно специалисту в данной области техники. Ссылки на используемые в данном документе методики предполагаются как относящиеся к методикам, общепринятым в данной области техники, в том числе к изменениям этих методик

и/или заменам на эквивалентные методики, которые будут очевидны специалистам в данной области техники. Хотя предполагается, что следующие термины хорошо понятны специалисту в данной области техники, следующие определения приведены для облегчения пояснения раскрытого в данном документе объекта изобретения.

5 **[0015]** Следуя устоявшемуся договору в патентном праве, формы существительного в единственном числе относятся к "одному или нескольким" при использовании в данной заявке, включая формулу изобретения. Например, фраза "клетка" относится к одной или нескольким клеткам и в некоторых вариантах осуществления может относиться к ткани и/или органу. Аналогичным образом, фраза
10 "по меньшей мере один" при использовании в данном документе для обозначения объекта относится, например, к 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100 или большему количеству этих объектов, включая без ограничения все целочисленные значения от 1 до 100, а также целые числа больше 100.

[0016] Если не указано иное, то все числа, выражающие количества
15 ингредиентов, условия реакции и т. п., используемые в настоящем описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицированные во всех случаях с помощью термина "приблизительно". Термин "приблизительно", используемый в данном документе в отношении измеряемого значения, такого как величина массы, веса, времени, объема, концентрации или процентного значения, предназначен для охвата
20 изменений, составляющих в некоторых вариантах осуществления $\pm 20\%$, в некоторых вариантах осуществления $\pm 10\%$, в некоторых вариантах осуществления $\pm 5\%$, в некоторых вариантах осуществления $\pm 1\%$, в некоторых вариантах осуществления $\pm 0,5\%$ и в некоторых вариантах осуществления $\pm 0,1\%$, от указанного количества, поскольку такие изменения подходят для осуществления раскрытых способов и/или
25 использования раскрытых композиций, нуклеиновых кислот, полипептидов и т. п. Соответственно, если не указано обратное, числовые параметры, изложенные в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приблизительными величинами, которые могут варьироваться в зависимости от требуемых свойств, которых стремятся достичь с помощью раскрытого в данном документе объекта
30 изобретения.

[0017] Используемый в данном документе термин "0% фертильности пыльцы" или "мужская стерильность" или "полная стерильность пыльцы" в контексте настоящего изобретения относится к 0% спонтанного удвоения хромосом (SCD). Более конкретно, в этом контексте 0% фертильности пыльцы относится к гаплоидному

растению, которое не способно образовывать фертильную пыльцу. В настоящем изобретении, поскольку гаплоидное растение (геном $1n$) не может быть восстановлено до генома $0,5n$, гаплоидное растение также не способно образовывать фертильную пыльцу вследствие невозможности полного мейоза. Следовательно, когда в настоящем раскрытии упоминается 0% фертильности пыльцы, настоящее раскрытие относится к 0% SCD. Для получения фертильной пыльцы из гаплоидного растения геном должен быть удвоен либо химически, либо посредством SCD.

[0018] Используемый в данном документе термин "аллель" относится к варианту или альтернативной форме последовательности в генетическом локусе. У диплоидов отдельный аллель наследуется особью-потомком от каждой родительской особи отдельно в каждом локусе. Два аллеля данного локуса, присутствующие в диплоидном организме, занимают соответствующие места на паре гомологичных хромосом, хотя специалист в данной области техники понимает, что аллели у любой конкретной особи необязательно представляют все аллели, которые присутствуют у данного вида.

[0019] Термин "амплифицированный" или "амплифицировать", используемый в данном документе, означает конструирование нескольких копий молекулы нуклеиновой кислоты или нескольких копий, комплементарных молекуле нуклеиновой кислоты, с использованием по меньшей мере одной из молекул нуклеиновой кислоты в качестве матрицы. Системы амплификации включают систему на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), систему на основе лигазной цепной реакции (LCR), систему амплификации, основанной на последовательности нуклеиновой кислоты (NASBA, Cangene, Миссиссога, Онтарио), системы на основе репликазы Q-бета, систему амплификации, основанной на транскрипции (TAS), и амплификацию с замещением нитей (SDA). См., например, *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, PERSING et al., Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1993). Продукт амплификации называется "ампликоном".

[0020] Применяемый в данном документе термин "и/или", при использовании в контексте перечня объектов, относится к объектам, присутствующим по отдельности или в комбинации. Таким образом, фраза "A, B, C и/или D" включает A, B, C и D по отдельности, но также включает все возможные комбинации и подкомбинации A, B, C и D (например, AB, AC, AD, BC, BD, CD, ABC, ABD и BCD). В некоторых вариантах осуществления один или несколько элементов, к которым относится "и/или",

могут также отдельно присутствовать в одном или множестве случаев в комбинации(комбинациях) и/или подкомбинации(подкомбинациях).

[0021] Используемая в данном документе фраза "ассоциированный с" относится к распознаваемой и/или анализируемой взаимосвязи между двумя объектами.

- 5 Например, фраза "ассоциированный со спонтанным удвоением хромосом (SCD)" относится к признаку, локусу, гену, аллелю, маркеру, фенотипу и т. п. или их экспрессии, присутствие или отсутствие которых может влиять на меру и/или степень, в которой растение способно к SCD. Таким образом, маркер является "ассоциированным с" признаком, если он сцеплен с ним и если наличие маркера
- 10 является индикатором того, будут ли и/или в какой степени требуемые признак или форма признака будут проявляться у растения/в зародышевой плазме, содержащих маркер. Аналогичным образом, маркер является "ассоциированным с" аллелем в том случае, если он сцеплен с ним, и в том случае, если присутствие маркера является индикатором присутствия аллеля в растении/зародышевой плазме, содержащих маркер.
- 15 Например, "маркер, ассоциированный с SCD", относится к маркеру, наличие или отсутствие которого можно использовать для прогнозирования того, будет ли и/или в какой степени растение будет демонстрировать SCD.

- [0022]** Используемый в данном документе термин "возвратное скрещивание" в пределах объема настоящего изобретения понимают как относящийся к процессу, при
- 20 котором гибридное потомство подвергается многократному возвратному скрещиванию с одним из родительских особей.

[0023] Используемый в данном документе термин "сDNA" относится к однонитевой или двухнитевой ДНК, которая происходит из mRNA и комплементарна ей.

- 25 **[0024]** Используемый в данном документе термин "хромосома" используется в данном документе как общепризнанный в данной области техники, означающий самовоспроизводящуюся генетическую структуру в клеточном ядре, содержащую клеточную ДНК и несущую линейный набор генов.

- [0025]** Термин "содержащий", который является синонимичным для
- 30 "включающий", "вмещающий" и "характеризующийся", является включающим или открытым и не исключает дополнительных, не упомянутых элементов и/или стадий способа. "Содержащий" представляет собой термин из уровня техники, который означает, что названные элементы и/или стадии присутствуют, но могут быть

добавлены другие элементы и/или стадии, которые при этом по-прежнему находятся в пределах объема соответствующего объекта изобретения.

[0026] Используемая в данном документе фраза "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, конкретно не упомянутые. Если фраза "состоит из" появляется в основной части пункта формулы изобретения, а не сразу после ограничительной части, то она ограничивает только элемент, изложенный в данной части; другие элементы не исключаются из пункта формулы изобретения в целом.

[0027] Используемая в данном документе фраза "по сути состоящий из" ограничивает объем связанного раскрытия или пункта формулы изобретения указанными материалами и/или стадиями, а также материалами и/или стадиями, которые существенно не влияют на основную(основные) и новую(новые) характеристику(характеристики) раскрытого и/или заявленного объекта изобретения.

[0028] Что касается терминов "содержащий", "по сути состоящий из" и "состоящий из" в том случае, если в данном документе используется один из этих трех терминов, то раскрытый в данном документе и заявленный объект изобретения может включать в некоторых вариантах осуществления использование любого из двух других терминов. Например, справедливо, если объект изобретения относится в некоторых вариантах осуществления к нуклеиновым кислотам, кодирующим полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности, которые на по меньшей мере 95% идентичны SEQ ID NO: 2 или 3. Таким образом, следует понимать, что раскрываемый объект изобретения также охватывает нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, которые в некоторых вариантах осуществления по сути состоят из аминокислотных последовательностей, которые на по меньшей мере 95% идентичны этим SEQ ID NO: 2 или 3, а также нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, которые в некоторых вариантах осуществления состоят из аминокислотных последовательностей, на по меньшей мере 95% идентичных этим SEQ ID NO: 2 или 3. Аналогичным образом, также следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления способы согласно раскрываемому объекту изобретения включают стадии, раскрытые в данном документе, в некоторых вариантах осуществления способы согласно раскрываемому в данном документе объекту изобретения по сути состоят из раскрываемых стадий, и в некоторых вариантах осуществления способы согласно раскрываемому в данном документе объекту изобретения состоят из стадий, которые раскрываются в данном документе.

[0029] Используемый в данном документе термин "индуцирование гаплоидии *de novo*" относится к инициации индуцирования гаплоидии посредством введения средства, индуцирующего спонтанную гаплоидию. Такое введение можно осуществлять посредством местного опрыскивания, опыления ручным способом, мутагенеза или трансгенных способов. Термины "индуцирование гаплоидии *de novo*", "НП *de novo*" и "индуцирование гаплоидии *de novo*" используются взаимозаменяемо по 5 всему настоящему описанию.

[0030] Используемые в данном документе термины "элитная линия" и "инбредная линия" относятся к любой линии, которая была получена в результате селекции и отбора по превосходящим агрономическим характеристикам. Элитная 10 линия характеризуется стабильной генетикой, т. е. она в достаточной степени или практически изогенна по всему своему геному. Другими словами, элитная линия является в достаточной степени или практически гомозиготной для всех аллелей в своем геноме.

[0031] Используемый в данном документе термин "экспрессия" при использовании в отношении полинуклеотида, такого как ген, ORF или их часть, или трансгена в растениях относится к процессу преобразования генетической информации, закодированной в гене, в РНК (например, mRNA, rRNA, tRNA или snRNA) посредством "транскрипции" гена (т. е. благодаря ферментативному действию РНК- 20 полимеразы) и в белок в соответствующих случаях (например, если ген кодирует белок) посредством "трансляции" mRNA. Экспрессия гена может регулироваться на многих стадиях в ходе этого процесса. Например, в случае антисмысловых конструкций или dsRNA-конструкций соответственно экспрессия может относиться к транскрипции только антисмысловой РНК или только dsRNA. В вариантах 25 осуществления "экспрессия" относится к транскрипции и стабильному накоплению смысловой (mRNA) или функциональной РНК. "Экспрессия" может также относиться к продуцированию белка.

[0032] Используемый в данном документе термин "ген" относится к единице наследственности, содержащей последовательность ДНК, которая занимает конкретное 30 местоположение на хромосоме и которая содержит генетическую инструкцию для определенной характеристики или признака, свойственных организму.

[0033] Используемый в данном документе термин "генотип" относится к генетической конституции клетки или организма. "Генотип с набором генетических маркеров" особи включает специфические аллели для одного или нескольких локусов

генетических маркеров, присутствующих у особи. Как известно из уровня техники, генотип может относиться к одному локусу или к нескольким локусам, независимо от того, являются ли локусы связанными или несвязанными и/или сцепленными или несцепленными. В некоторых вариантах осуществления генотип особи относится к
5 одному или нескольким генам, которые связаны таким образом, что один или несколько генов вовлечены в экспрессию представляющего интерес фенотипа (например, количественного признака, определенного в данном документе). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления генотип содержит совокупность одного или нескольких аллелей, присутствующих у особи в одном или нескольких
10 генетических локусах, определяющих количественный признак. В некоторых вариантах осуществления генотип экспрессируется в виде гаплотипа (определенного в данном документе ниже).

[0034] "Генетическая карта" представляет собой описание взаимосвязей при генетическом сцеплении между локусами на одной или нескольких хромосомах в
15 пределах данного вида, обычно изображаемое в форме схемы или таблицы.

[0035] Используемый в данном документе термин "зародышевая плазма" относится ко всей совокупности генотипов в популяции или другой группе особей (например, у вида). Термин "зародышевая плазма" может также относиться к растительному материалу; например, к группе растений, которые выступают в качестве
20 вместилища для различных аллелей. Фраза "адаптированная зародышевая плазма" относится к растительным материалам с доказанным генетическим превосходством; например, для данной среды обитания или географической области, тогда как фразы "неадаптированная зародышевая плазма", "необработанная зародышевая плазма" и "экзотическая зародышевая плазма" относятся к растительным материалам с
25 неизвестной или недоказанной генетической ценностью; например, для данной среды обитания или географической области; таким образом, фраза "неадаптированная зародышевая плазма" относится в некоторых вариантах осуществления к растительным материалам, которые не являются частью устойчивой популяции для селекции и для которых неизвестно родство с представителем устойчивой популяции для селекции.

[0036] При использовании в данном документе растение, называемое
30 "гаплоидным", содержит один набор (геном) хромосом, и уменьшенное количество хромосом ($1n$) в гаплоидном растении равняется количеству хромосом в гаметах. При использовании в данном документе растение, называемое "удвоенным гаплоидом", развивается при удвоении гаплоидного набора хромосом (от $1n$ до $2n$). Растение или

семя, полученные из растения, являющегося удвоенным гаплоидом, самооплодотворяемого в течение любого количества поколений, все еще можно идентифицировать как растение, являющееся удвоенным гаплоидом. Растение, являющееся удвоенным гаплоидом, считается гомозиготным растением. Растение считается удвоенным гаплоидом, если оно является фертильным, даже если целая вегетативная часть растения не состоит из клеток с удвоенным набором хромосом; то есть растение будет считаться удвоенным гаплоидом, если оно содержит жизнеспособные гаметы, даже если оно является химерным.

[0037] Используемый в данном документе термин "гетерологичный" при применении в отношении гена или нуклеиновой кислоты относится к гену, кодирующему фактор, который не находится в его естественном окружении (т. е. который был изменен посредством вмешательства человека). Например, гетерологичный ген может предусматривать ген из организма одного вида, введенный в организм другого вида. Гетерологичный ген также может предусматривать ген, нативный по отношению к организму, но который был изменен определенным образом (например, подвергнут мутации, добавлен в виде множества копий, связан с ненативным промоторным или энхансерным полинуклеотидом и т. п.). Гетерологичные гены дополнительно могут содержать полинуклеотиды генов растения, которые содержат cDNA-формы гена растения; cDNA могут экспрессироваться либо в смысловой (с получением mRNA), либо в антисмысловой ориентации (с получением антисмыслового РНК-транскрипта, который комплементарен mRNA-транскрипту). В одном аспекте настоящего изобретения гетерологичные гены отличаются от эндогенных генов растения тем, что полинуклеотид гетерологичного гена, как правило, присоединен к полинуклеотидам, содержащим регуляторные элементы, такие как промоторы, которые не обнаружены в природе, ассоциированные с геном белка, кодируемого гетерологичным геном, или с полинуклеотидом гена растения в хромосоме, или ассоциированные с частями хромосомы, в которых они не обнаружены в природе (например, гены экспрессируются в локусах, в которых ген в норме не экспрессируется). Кроме того, в вариантах осуществления "гетерологичный" полинуклеотид представляет собой полинуклеотид, в природных условиях не ассоциированный с клеткой-хозяином, в которую его вводят, в том числе не встречающиеся в природе множественные копии полинуклеотида, встречающегося в природе.

[0038] Используемый в данном документе термин "гетерозиготный" означает генетическое состояние, существующее, когда в соответствующих локусах на гомологичных хромосомах расположены различные аллели.

5 **[0039]** Используемый в данном документе термин "гомозиготный" означает генетическое состояние, существующее, когда в соответствующих локусах на гомологичных хромосомах расположены идентичные аллели.

10 **[0040]** Используемый в данном документе термин "показатель НМФ" или "показатель гаплоидной мужской фертильности" относится к количеству дней, в течение которых растение сбрасывает пыльцу. В способе, используемом в данном документе, измеряется каждое отдельное растение. Растения проверяют в отношении сбрасывания фертильной пыльцы каждый день в течение периода выделения пыльцы (7-14 дней в поле), и каждому растению присваивается число, равное количеству дней, в течение которых оно сбрасывает пыльцу (например, растению присваивается число 5, эквивалентное сбрасыванию пыльцы растением в течение 5 дней). Стерильное растение
15 оценивается как ноль, что означает, что оно сбрасывало пыльцу в течение нуля дней. В отсутствие других вмешательств любое гаплоидное растение с показателем больше нуля является гаплоидным растением с некоторым уровнем SCD.

[0041] Используемый в данном документе термин "выделенный" при применении в контексте молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов по
20 настоящему изобретению относится к полинуклеотиду, который идентифицируют в пределах его хромосомного полинуклеотидного окружения и выделяют/отделяют от него в соответствующем организме-источнике. Выделенная нуклеиновая кислота или полинуклеотид не является нуклеиновой кислотой, которая встречается в своем естественном окружении, если она действительно имеет встречающийся в природе
25 аналог. Напротив, нуклеиновые кислоты, не являющиеся выделенными, представляют собой нуклеиновые кислоты, такие как ДНК и РНК, которые встречаются в состоянии, в котором они существуют в природе. Например, определенный полинуклеотид (например, ген) встречается в хромосоме клетки-хозяина в непосредственной близости от соседних генов. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты может присутствовать
30 в однонитевой или двухнитевой форме. В качестве альтернативы она может содержать как смысловую, так и антисмысловую нити (т. е. молекула нуклеиновой кислоты может быть двухнитевой). В предпочтительном варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению следует понимать как выделенные.

[0042] Используемый в данном документе термин "локус" относится к положению (например, гена, генетического маркера или т. п.) на хромосоме данного вида.

5 **[0043]** Используемый в данном документе термин "индуктор матроклиной гаплоидии" относится к линии, которая продуцирует пыльцу и при скрещивании с мужской особью приводит к гиногенному развитию гаплоидных семян. "Индуктор андроклиной гаплоидии" относится к линии, которая при использовании в качестве женской особи при скрещивании приводит к андрогенному развитию гаплоидных семян. Растение-гаплоиндуктор может использовать любой из этих материнских или
10 отцовских механизмов для получения гаплоидов.

[0044] Используемый в данном документе термин "индуцированная человеком мутация" относится к любой мутации, которая появляется в результате непосредственного или опосредованного человеком действия. Данный термин включает без ограничения мутации, получаемые посредством любого способа
15 направленного мутагенеза.

[0045] Используемый в данном документе термин "гибрид" относится к потомку, полученному путем скрещивания двух генетически несходных родительских растений. Потомство, полученное в результате этого скрещивания, представляет собой "двуродительскую" популяцию.

20 **[0046]** Используемый в данном документе термин "логарифм шансов" или "показатель LOD" относится к статистической вероятности того, что два гена находятся в непосредственной близости на хромосоме.

[0047] Используемые в данном документе термины "маркерный зонд" и "зонд" относятся к нуклеотидной последовательности или молекуле нуклеиновой кислоты, которые могут быть использованы для выявления присутствия или отсутствия
25 последовательности в пределах большей последовательности посредством гибридизации нуклеиновых кислот, например, к зонду на основе нуклеиновой кислоты, который комплементарен всему маркеру или маркерному локусу или его части. Для гибридизации нуклеиновых кислот можно использовать маркерные зонды, содержащие
30 приблизительно 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или больше смежных нуклеотидов.

[0048] Используемый в данном документе термин "молекулярный маркер" может быть использован для обозначения генетического маркера, определенного выше, или кодируемого им продукта (например, белка), применяемого в качестве исходной

точки при идентификации присутствия/отсутствия SCD или другого локуса, представляющего интерес. Молекулярный маркер может быть получен из геномных нуклеотидных последовательностей или из экспрессируемых нуклеотидных последовательностей (например, из РНК, cDNA и т. п.). Данный термин также
5 относится к нуклеотидным последовательностям, комплементарным маркерным последовательностям или фланкирующим их, таким как нуклеотидные последовательности, используемые в качестве зондов и/или праймеров, способных обеспечивать амплификацию маркерной последовательности. Нуклеотидные последовательности являются "комплементарными", если они специфически
10 гибридизируются в растворе (например, согласно правилам спаривания оснований Уотсона-Крика). Данный термин также относится к генетическим маркерам, которые указывают на признак по отсутствию нуклеотидных последовательностей, комплементарных маркерным последовательностям или фланкирующих их, таких как нуклеотидные последовательности, используемые в качестве зондов и/или праймеров,
15 способных обеспечивать амплификацию маркерной последовательности.

[0049] Используемые в данном документе термины "нуклеотидная последовательность", "полинуклеотид", "последовательность нуклеиновой кислоты", "молекула нуклеиновой кислоты" и "фрагмент нуклеиновой кислоты" относятся к полимеру РНК или ДНК, который является одно- или двухнитевым, необязательно
20 содержащему синтетические, неприродные и/или измененные нуклеотидные основания. "Нуклеотид" представляет собой мономерное звено, из которого сконструированы полимеры ДНК или РНК и которое состоит из пуринового или пиримидинового основания, пентозы и группы фосфорной кислоты. Нуклеотиды (обычно находящиеся в их форме 5'-монофосфата) называют их однобуквенным
25 обозначением следующим образом: "А" в случае аденилата или дезоксиаденилата (в случае РНК или ДНК соответственно), "С" в случае цитидилата или дезоксицитидилата, "G" в случае гуанилата или дезоксигуанилата, "U" в случае уридилата, "Т" в случае дезокситимидилата, "R" в случае пуринов (А или G), "Y" в случае пиримидинов (С или Т), "K" в случае G или Т, "H" в случае А, или С, или Т, "I" в
30 случае инозина и "N" в случае любого нуклеотида.

[0050] Термины "идентичность" или "идентичный" в контексте двух последовательностей нуклеиновой кислоты или аминокислотных последовательностей относятся к процентной доле идентичных нуклеотидов или аминокислот в линейной полинуклеотидной или аминокислотной последовательности у эталонной

("запрашиваемой") последовательности (или ее комплементарной нити) при сравнении с тестируемой ("рассматриваемой") последовательностью, когда две последовательности подвергнуты глобальному выравниванию. Если не указано иное, то термин "идентичность последовательности", используемый в данном документе, 5 относится к значению, полученному с применением алгоритма Нидлмана и Вунша ((1970) J. Mol. Biol. 48:443-453), реализованного в инструменте выравнивания EMBOSS Needle с применением файлов по умолчанию с матрицей EBLOSUM62 для белка с параметрами по умолчанию (открытие гэпа = 10, продолжение гэпа = 0,5, штраф за внесение концевого гэпа = ложно, открытие концевого гэпа = 10, продолжение 10 концевого гэпа = 0,5) или DNAfull для нуклеиновых кислот с параметрами по умолчанию (открытие гэпа = 10, продолжение гэпа = 0,5, штраф за внесение концевого гэпа = ложно, открытие концевого гэпа = 10, продолжение концевого гэпа = 0,5), или любой эквивалентной ему программы. EMBOSS Needle является доступным, например, от EMBL-EBI, как, например, на следующем веб-сайте: 15 ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/ и как описано в следующей публикации: "The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019." Madeira et al. Nucleic Acids Research, June 2019, 47(W1):W636-W641. Термин "эквивалентная программа", используемый в данном документе, относится к любой программе сравнения последовательностей, 20 которая для любых двух рассматриваемых последовательностей создает выравнивание, характеризующееся идентичными совпадениями нуклеотидных или аминокислотных остатков и идентичным процентом идентичности последовательностей при сравнении с соответствующим выравниванием, созданным с помощью EMBOSS Needle. В некоторых вариантах осуществления по сути идентичные последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотные последовательности могут выполнять по 25 сути одинаковую функцию.

[0051] Используемые данным документе термины "интрогрессия", "интрогрессированный" и "интрогрессирующий" относятся как к естественному, так и к искусственному процессу, посредством которого области генома из одного вида, сорта или культивара перемещаются в геном другого вида, сорта или культивара путем 30 скрещивания этих видов. Процесс необязательно можно выполнять путем возвратного скрещивания с рекуррентным родительским растением.

[0052] Термин "открытая рамка считывания" (ORF) относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид. В некоторых вариантах осуществления ORF содержит кодон инициации трансляции, кодон

терминации трансляции (т. е. стоп-кодон) и последовательность нуклеиновой кислоты между ними, которая кодирует аминокислоты, присутствующие в полипептиде. Термины "кодон инициации" и "кодон терминации" относятся к единице из трех смежных нуклеотидов (т. е. кодону) в кодирующей последовательности, которая
5 определяет соответственно инициацию и терминацию цепи в синтезе белка (трансляция mRNA).

[0053] Используемые в данном документе термины "фенотип", "фенотипический признак" или "признак" относятся к одному или нескольким признакам растения или растительной клетки. Фенотип можно наблюдать
10 невооруженным глазом или с помощью любых других средств оценки, известных из уровня техники, например, с помощью микроскопии, биохимического анализа или электромеханического анализа. В некоторых случаях фенотип непосредственно контролируется одним геном или генетическим локусом (т. е. соответствует "признаку, определенному одним геном"). Например, в случае гаплоидного растения,
15 оцениваемого в отношении SCD, фенотип может относиться к сбрасыванию фертильной пыльцы и/или семени, полученного посредством опыления этой пыльцой. В других случаях фенотип является результатом взаимодействий между несколькими генами, и в некоторых вариантах осуществления он также является результатом взаимодействия растения и/или растительной клетки с их окружающей средой.

[0054] Используемый в данном документе термин "растение" может относиться к целому растению, любой его части или культуре клеток или тканей, полученным из растения. Таким образом, термин "растение" может относиться к любому из целых растений, компонентов или органов растения (например, листьям, стеблям, корням и т. п.), растительных тканей, семян и/или растительных клеток, если не указано иное.

[0055] Растительная клетка представляет собой клетку растения, взятую из растения или полученную посредством культивирования из клетки, взятой из растения. Таким образом, термин "растительная клетка" включает без ограничения клетки в семенах, суспензионных культурах, зародышах, участках меристемы, каллусной ткани, листьях, побегах, гаметофитах, спорофитах, пыльце и микроспорах. Фраза "часть
30 растения" относится к части растения, в том числе к отдельным клеткам и клеточным тканям, таким как растительные клетки, которые являются интактными в растениях, скоплениям клеток и тканевым культурам, из которых можно регенерировать растения. Примеры частей растения включают без ограничения отдельные клетки и ткани из пыльцы, семязачатков, листьев, зародышей, корней, кончиков корней, пыльников,

цветков, плодов, стеблей, побегов и семян; а также привоев, подвоев, протопластов, каллусов и т. п.

5 **[0056]** Используемый в данном документе термин "популяция" означает генетически гетерогенную совокупность растений, имеющих общее генетическое происхождение.

10 **[0057]** Используемый в данном документе термин "праймер" относится к олигонуклеотиду, который способен отжигаться с целевой нуклеиновой кислотой (в некоторых вариантах осуществления отжигаться специфически с целевой нуклеиновой кислотой), обеспечивая присоединение к ней ДНК-полимеразы и/или обратной транскриптазы, выступая таким образом в качестве точки инициации синтеза ДНК при помещении в условия, в которых индуцируется синтез продукта удлинения праймера (например, в присутствии нуклеотидов и средства для полимеризации, такого как ДНК-полимераза, и при подходящих температуре и рН). В некоторых вариантах осуществления для амплификации нуклеиновых кислот растения используют одну или 15 несколько совокупностей праймеров (например, с помощью полимеразной цепной реакции; ПЦР).

20 **[0058]** Используемый в данном документе термин "зонд" относится к нуклеиновой кислоте (например, одностречевой нуклеиновой кислоте или нити двухстречевой нуклеиновой кислоты или нуклеиновой кислоты более высокого порядка или их подпоследовательности), которая может образовывать стабилизированный водородными связями дуплекс с комплементарной последовательностью в целевой последовательности нуклеиновой кислоты. Как правило, зонд имеет достаточную длину для образования стабильной и специфической в отношении последовательности дуплексной молекулы с ее комплементарной последовательностью, а следовательно, 25 может применяться в некоторых вариантах осуществления для выявления представляющей интерес последовательности, присутствующей во множестве нуклеиновых кислот.

30 **[0059]** Используемые в данном документе термины "потомство" и "растение-потомок" относятся к растению, полученному в результате вегетативного или полового размножения от одного или нескольких родительских растений. При индуцировании гаплоидии семя на женской родительской особи является гаплоидным, следовательно, не является потомством линии, индуцирующей гаплоидию. Потомство гаплоидного семени не является единственным требуемым потомством. Существует также семя НИ и последующее растение и семя-потомок растения, индуцирующего гаплоидию. Как

гаплоидное семя, так и семя НИ могут быть потомством. Растение-потомок может быть получено путем клонирования или самооплодотворения одного родительского растения или путем скрещивания двух или более родительских растений. Например, растение-потомок может быть получено путем клонирования или самооплодотворения одного родительского растения или путем скрещивания двух родительских растений, и оно включает продукты самооплодотворения, а также F1 или F2 или более далекие поколения. F1 представляет собой потомство первого поколения, полученное от родительских особей, по меньшей мере одну из которых впервые используют в качестве донора признака, тогда как потомство второго поколения (F2) или последующих поколений (F3, F4 и т. п.) представляет собой образцы, полученные в результате самооплодотворений, перекрестных опылений, возвратных скрещиваний и/или других скрещиваний F1, F2 и т. п. Таким образом, F1 может представлять собой (и в некоторых вариантах осуществления представляет собой) гибрид, полученный в результате скрещивания двух родительских особей из чистых линий (т. е. каждая из родительских особей из чистых линий является гомозиготной по признаку, представляющему интерес, или его аллелю), тогда как F2 может представлять собой (и в некоторых вариантах осуществления представляет собой) потомка, полученного в результате самоопыления гибридов F1.

[0060] Используемый в данном документе термин "поколение F1-Н" относится к потомству, полученному посредством первого скрещивания инбредной особи, содержащей признак SCD, с инбредной линией без признака SCD (F1). Потомство от указанного первого скрещивания затем скрещивали с линией, являющейся индуктором матроклинной гаплоидии, что приводит к получению поколения F1-Н. Используемый в данном документе термин "поколение F2-Н" относится к потомству, продуцируемому указанными растениями F1 выше уровня самоопыления с образованием F2, которое затем скрещивали с гаплоиндуктором.

[0061] Используемый в данном документе термин "пенетрантность QTL" относится к наличию ассоциированного фенотипа с локусом QTL.

[0062] Используемый в данном документе термин "локус количественного признака" или "локусы количественных признаков" или "QTL" относится к локусу, ассоциированному с конкретным признаком.

[0063] Используемый в данном документе термин "R1-nj" относится к антоцианиновому маркеру R1-Navajo. Это хорошо известный из уровня техники

маркер, используемый в качестве визуального маркера для различения гаплоидов от диплоидов (или анеуплоидов).

5 **[0064]** Используемая в данном документе фраза "рекомбинация" относится к обмену фрагментами ДНК между двумя молекулами ДНК или хроматидами парных хромосом ("кроссинговеру") в участке сходных или идентичных нуклеотидных последовательностей. "Событие рекомбинации" в данном документе понимают как относящееся в некоторых вариантах осуществления к мейотическому кроссинговеру.

10 **[0065]** Используемый в данном документе термин "эталонная последовательность" относится к определенной нуклеотидной последовательности, используемой в качестве основы для сравнения нуклеотидных последовательностей.

[0066] Используемый в данном документе термин "регенерировать" и его грамматические варианты относятся к получению растения из тканевой культуры.

15 **[0067]** Используемые в данном документе термины "спонтанное удвоение хромосом" ("SCD") или "спонтанное удвоение гаплоидного генома" или "гаплоидная мужская фертильность" или "спонтанное удвоение генома" используются взаимозаменяемо для описания удвоения гаплоидных геномов без какого-либо вмешательства. SCD обеспечивает корректную мейотическую редукцию числа хромосом и последующее образование зрелой пыльцы. В настоящем изобретении SCD рассчитывали путем деления количества фертильных гаплоидных растений на общее количество растений.

20

[0068] Используемый в данном документе термин "растение, являющееся спонтанно удвоенным гаплоидом" относится к растению, цветки которого подверглись спонтанному удвоению генетического материала. Другие ткани растения, являющегося спонтанно удвоенным гаплоидом, могут сохранять свое гаплоидное состояние (например, корень, лист, стебель).

25

[0069] Используемый в данном документе термин "SCD-QTL1" относится к идентифицированному в настоящее время QTL на хромосоме 7. Этот QTL определяется областью хромосомы 7, фланкированной двумя маркерами, SM0077AQ и SM11142. Эти маркеры соответствуют их физическим положениям в эталонном геноме B73_v4.

30

[0070] Используемая в данном документе фраза "жесткие условия гибридизации" относится к условиям, при которых полинуклеотид гибридизируется со своей целевой подпоследовательностью, как правило в сложной смеси нуклеиновых кислот, но по сути не осуществляет этого с другими последовательностями. Жесткие

условия зависят от последовательности и могут различаться при разных обстоятельствах.

[0071] Как правило, более длинные последовательности специфически гибридизируются при более высоких температурах. Исчерпывающее руководство по 5 гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в Sambrook & Russell, 2001. Как правило, жесткие условия выбирают так, чтобы температура была на приблизительно 5-10°C ниже температуры точки плавления (T_m) для конкретной последовательности при определенных ионной силе и pH. T_m представляет собой температуру (при 10 определенных ионной силе, pH и концентрации нуклеиновой кислоты), при которой 50% зондов, комплементарных мишени, гибридизируются с целевой последовательностью в равновесном состоянии (поскольку целевые последовательности присутствуют в избытке, то при T_m в равновесном состоянии занято 50% зондов). Иллюстративные жесткие условия являются такими, при которых концентрация соли составляет менее приблизительно 1,0 М ионов натрия, как правило, 15 концентрация ионов натрия (или других солей) составляет приблизительно 0,01-1,0 М при pH 7,0-8,3, а температура составляет по меньшей мере приблизительно 30°C для коротких зондов (например, 10-50 нуклеотидов) и по меньшей мере приблизительно 60°C для длинных зондов (например, более 50 нуклеотидов).

[0072] Жесткие условия также могут быть достигнуты путем добавления 20 дестабилизирующих средств, таких как формамид. Дополнительные иллюстративные жесткие условия гибридизации включают инкубирование в 50% формамиде, 5x SSC и 1% SDS при 42°C или инкубирование в SSC, 1% SDS при 65°C; с одной или несколькими стадиями отмычки в 0,2x SSC и 0,1% SDS при 65°C. Для ПЦР температура, составляющая приблизительно 36°C, является типичной для 25 амплификации в условиях низкой жесткости, хотя температуры отжига могут варьироваться от приблизительно 32°C до 48°C (или выше) в зависимости от длины праймера. Дополнительные руководства для определения параметров гибридизации представлены в многочисленных ссылках (см., например, Ausubel et al., 1999).

[0073] Используемый в данном документе термин "признак" относится к 30 фенотипу, представляющему интерес, гену, который вносит вклад в фенотип, представляющий интерес, а также к последовательности нуклеиновой кислоты, ассоциированной с геном, который вносит вклад в фенотип, представляющий интерес.

[0074] Используемый в данном документе термин "трансген" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, введенной в организм или один или несколько его

предков посредством определенной формы методики искусственного переноса. Таким образом, посредством методики искусственного переноса создают "трансгенный организм" или "трансгенную клетку". Следует понимать, что методика искусственного переноса может осуществляться в организме-предке (или в его клетке и/или клетке, из которой может развиваться организм-предок), и при этом любая особь-потомок, которая содержит искусственно перенесенную молекулу нуклеиновой кислоты или ее фрагмент, все еще считается трансгенной, даже если в результате одного или нескольких природных и/или принудительных скрещиваний искусственно перенесенная молекула нуклеиновой кислоты присутствует в особи-потомке.

[0075] Используемый в данном документе термин "направленный мутагенез" или "стратегия мутагенеза" относится к любому способу мутагенеза, который приводит к преднамеренному мутагенезу выбранного гена. Направленный мутагенез включает способы с использованием CRISPR, TILLING, TALEN и другие способы, которые еще не разработаны, но которые можно использовать для достижения такого же результата.

[0076] Используемый в данном документе термин "уровень индуцирования гаплоидии" ("HIR") означает количество выживших гаплоидных зерен по сравнению с общим количеством зерен после опыления початка пыльцой, являющейся гаплоиндуктором.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0077] Настоящее изобретение относится, среди прочего, к растениям, являющимся спонтанными удвоенными гаплоидами. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способ отбора первого растения или зародышевой плазмы маиса, которые демонстрируют спонтанное удвоение хромосом ("SCD") при нахождении в гаплоидном состоянии. Способ включает выделение нуклеиновых кислот из первого растения или зародышевой плазмы маиса и выявление SCD-QTL1, содержащего SEQ ID NO: 6 и 7, который ассоциирован со спонтанным удвоением хромосом. Кроме того, способ включает отбор указанного первого растения или зародышевой плазмы маиса или отбор потомка указанного первого растения или зародышевой плазмы маиса, содержащих SCD-QTL1, ассоциированный со спонтанным удвоением хромосом. В другом варианте осуществления вышеуказанный способ дополнительно включает скрещивание указанного выбранного первого растения или зародышевой плазмы маиса со вторым растением или зародышевой плазмой маиса.

Интрогрессированные растение или зародышевая плазма маиса демонстрируют повышенное спонтанное удвоение хромосом ("SCD") при нахождении в гаплоидном состоянии. SCD-QTL1 выявляют с использованием композиции, содержащей выявляемую метку.

5 **[0078]** В другом варианте осуществления настоящее изобретение включает способ получения растения, являющегося спонтанно удвоенным гаплоидом. Способ включает получение первого растения маиса, содержащего SCD-QTL1, содержащий SEQ ID NO: 6 и 7, который ассоциирован со спонтанным удвоением хромосом, скрещивание первого растения маиса со вторым растением маиса, получение потомства от указанного скрещивания, отбор из него гаплоидного потомка и обеспечение спонтанного удвоения хромосом у гаплоидного потомка. Растение, являющееся спонтанно удвоенным гаплоидом, может содержать репродуктивные ткани, способные продуцировать фертильные гаметы. Растение, являющееся спонтанно удвоенным гаплоидом, характеризуется мужской фертильностью.

15 **[0079]** В другом варианте осуществления первое растение маиса представляет собой растение маиса, являющееся гаплоиндуктором. Первое растение маиса содержит мутацию в CENH3 или IG1 (см., например, патент США № 8618354 и публикацию патентной заявки согласно PCT № WO2011/044132, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В другом варианте осуществления второе растение маиса представляет собой растение маиса, являющееся гаплоиндуктором. Второе растение маиса содержит мутацию в ZmMATL (см., например, патент США № 9677082, патент США № 10448588 и публикацию патентной заявки согласно PCT № WO2017/087682, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

25 **[0080]** В другом варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способ интрогрессии локуса, представляющего интерес. Способ включает первое получение первого растения маиса, содержащего SCD-QTL1, содержащий SEQ ID NO: 6 и 7, который ассоциирован со спонтанным удвоением хромосом. Затем способ включает скрещивание первого растения маиса со вторым растением маиса, содержащим локус, представляющий интерес, и получение потомства от скрещивания первого растения маиса и второго растения маиса. Кроме того, способ необязательно включает возвратное скрещивание потомства, полученного в результате скрещивания первого и второго растений маиса в результате вышеуказанного, с первым растением маиса или вторым растением маиса. Способ дополнительно

включает скрининг потомства ранее упомянутых скрещиваний в отношении наличия локуса, представляющего интерес, и QTL SCD, и отбор потомка, по меньшей мере гетерозиготного по локусу, представляющему интерес, и по меньшей мере гетерозиготного по QTL SCD. В одном варианте осуществления скрининг потомства в отношении наличия локуса, представляющего интерес, и SCD-QTL проводят по генотипу. В другом варианте осуществления скрининг потомства в отношении наличия локуса, представляющего интерес, и SCD-QTL проводят по фенотипу. Кроме того, указанным способом получают растение маиса, и указанное растение маиса относится к гетерозисной группе с нежестким стеблем, гетерозисной группе с жестким стеблем или тропической гетерозисной группе. Из растения маиса получают растение-потомок маиса. Растение маиса представляет собой гибридное растение маиса или элитное растение маиса.

[0081] В другом варианте осуществления локус, представляющий интерес, из способа интрогрессии локуса, представляющего интерес, предусматривает локус количественного признака, который ассоциирован с признаком, выбранным из группы, состоящей из повышенной урожайности, повышенной оптимизации потребления воды, повышенной устойчивости к заболеваниям, повышенной толерантности к засухе и повышенной устойчивости к гербицидам. Кроме того, локус, представляющий интерес, предусматривает трансген.

20

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Скрининг в отношении SCD в зародышевой плазме маиса Syngenta

[0082] Для лучшего понимания признака SCD авторы настоящего изобретения проводили скрининг 20 линий, у которых, как сообщалось селекционерами маиса, наблюдалось SCD. Этот скрининг проводили путем скрещивания запатентованных инбредных линий с гаплоиндуктором, выделения гаплоидов с использованием генетического цветового маркера и выращивания регенерированных гаплоидных растений в отсутствие каких-либо химических средств для удвоения генетического материала в типичных тепличных условиях. В этих условиях типичные гаплоиды маиса будут на 100% мужскими стерильными и не будут сбрасывать пыльцу (0% фертильности пыльцы определяется как 0% SCD). Растения оценивали в отношении фертильности пыльцы на ежедневной основе в течение периода сбрасывания пыльцы, и любое сбрасывание пыльцы (т. е. высвобождение в воздух) из метелок предполагалось как фертильное. Мужские стерильные растения маиса, как правило, не имеют каких-

30

либо пыльников, выходящих из метелки, и в этих случаях сбрасывание пыльцы не наблюдается. Однако четыре из этих линий (SYN004, SYN007, SYN013 и K22) демонстрировали SCD на уровне более 15%. Для остальных 16 тестируемых линий среднее значение SCD составляло 5% (см. таблицу 1). Подгруппу линий, включая некоторые из наиболее перспективных, также выращивали в полевых условиях для подтверждения наблюдений в теплице (см. таблицу 1). Четыре из наиболее перспективных линий совершенствовали для получения популяций для картирования QTL, определяющего признак SCD.

[0083] Таблица 1. Фенотипические оценки 20 линий, подвергнутых скринингу в отношении признака SCD в тепличных и полевых условиях

Название линии	Степень проявления SCD в тепличных условиях (фертильные гаплоиды/общее количество)	Степень проявления SCD в полевых условиях (фертильные гаплоиды/общее количество)
Zheng58	0% (0/24)	5% (1/20)
SYN001	5% (1/22)	Нет данных
SYN002	15% (2/13)	Нет данных
SYN003	8% (2/25)	Нет данных
SYN004	100% (23/23)	100% (21/21)
SYN005	12% (3/25)	Нет данных
SYN006	4% (1/24)	Нет данных
SYN007	96% (24/25)	85% (18/21)
SYN008	4% (1/24)	Нет данных
SYN009	10% (2/21)	Нет данных
SYN010	8% (2/24)	Нет данных
SYN011	0% (0/15)	Нет данных
K22	72% (13/18)	68% (13/19)
SYN012	0% (0/24)	Нет данных
SYN013	63% (15/24)	Нет данных
NP2222	10% (2/21)	10% (2/20)
SYN014	0% (0/20)	Нет данных
SYN015	5% (1/20)	Нет данных
SYN016	4% (1/23)	Нет данных
SYN017	0% (0/23)	Нет данных

Пример 2. Идентификация и валидация QTL

[0084] Идентификация QTL в двуродительской популяции F1-N

[0085] Для картирования признака SCD двуродительские популяции получали путем скрещивания инбредной линии с признаком SCD (примеры: SYN004 и SYN007) с инбредными линиями, которые не демонстрировали высокой степени проявления

фенотипа SCD (примеры: NP2222 и SYN006). Потомство F1 от этого скрещивания (предположительно гетерозиготное по любым локусам, ассоциированным с SCD) затем скрещивали с линией, являющейся индуктором матроклиной гаплоидии, RWK, и сортировали семена для выявления гаплоидов с использованием селектируемого маркера (см., например, веб-сайт Университета штата Айова: www.doubledhaploid.biotech.iastate.edu/haploid-selection) ("способ Хоэнхайма") с получением поколения F1-Н. Гаплоидные семена высевали в теплицу с солнечным освещением. Отдельные растения фенотипировали путем подсчета количества дней последовательного сбрасывания пыльцы (показатель НМФ) и путем оценки зерен, полученных в результате самоопыления, для подтверждения того, что наблюдаемая пыльца была жизнеспособной. Отдельные растения генотипировали с применением микрочипа Affymetrix Axiom (см., например, thermofisher.com/us/en/home/life-science/microarray-analysis/agrigenomics-solutions-microarrays-gbs/axiom-genotyping-solution-agrigenomics) и результаты анализа с применением микрочипа коррелировали с фенотипическими результатами для определения областей генома, ассоциированных с признаком удвоения. В случае двух инбредных линий SCD при ассоциативном картировании не было идентифицировано значимого QTL. Для остальных линий (SYN004 и SYN007) в общей сложности четыре QTL с показателями LOD > 5 считались значимыми, особенно когда сходные локусы появлялись в нескольких популяциях F1-Н (таблица 2).

[0086] Таблица 2. QTL идентифицировали в популяциях F1-Н с относительными показателями LOD и объясненной дисперсией для признака, ассоциированного с этой областью. QTL с перекрывающимися интервалами группировали вместе в таблице, когда они появились в независимых популяциях F1-Н. Физические положения на их соответствующих хромосомах соответствуют геному маиса B73_v4, который общедоступен по адресу maizegdb.org (maizegdb.org/genome/assembly/Zm-B73-REFERENCE-GRAMENE-4.0).

Родительские линии популяции F1-Н	Хромосома	Физический левый фланкирующий маркер B73_v4	Физический правый фланкирующий маркер B73_v4	Среднее значение LOD	Объясненная дисперсия
NP2222-SYN007	2	3,825,522	3,876,621	16,02	41,52
SYN007-KDJ4350	7	122,017,320	122,293,652	5,28	27,37
SYN006-SYN004	7	122,293,652	122,333,069	5,67	10,75
SYN007-KDJ4350	7	130,298,062	130,348,021	5,26	25,53
SYN004 NP2222	7	130,393,825	129,448,023	26,02	40,77
SYN007-KDJ4350	10	143,284,946	143,503,768	5,63	29,65

Родительские линии популяции F1-Н	Хромосома	Физический левый фланкирующий маркер B73_v4	Физический правый фланкирующий маркер B73_v4	Среднее значение LOD	Объясненная дисперсия
SYN007-KDJ4350	10	148,400,298	148,409,257	6,91	49,35

[0087] Валидация QTL в двуродительской популяции F2-Н

[0088] Валидацию этих четырех QTL проводили в следующем поколении.

Растения F1 из двуродительской популяции самооплодотворяли с получением F2, которое затем скрещивали с гаплоиндуктором с получением гаплоидной популяции F2-Н. Эти популяции F2-Н выращивали на трех участках. Отдельные гаплоидные растения подвергали скринингу посредством ежедневных проверок пыльцы (показатели НМФ) и измерений количества зерен, как описано ранее. Затем наблюдаемые фенотипы (см. таблицу 3) сравнивали с результатами генотипирования с применением Axiom для популяции из 475 растений и ассоциативного картирования QTL, выполненного с использованием того же способа, который применяли для поколения F1-Н. QTL, ранее идентифицированные на хромосомах 2 и 10 (таблица 2), не характеризовались столь же значительными показателями в этом втором поколении. Однако QTL на хромосоме 7 был одинаково сильным во втором поколении (показатель LOD > 5) в обеих популяциях, где это ожидалось. Этот QTL на хромосоме 7 обозначен как SCD-QTL1.

[0089] Таблица 3. Все QTL, наблюдаемые в исследованиях поколения F2-Н посредством ассоциативного картирования, отсортированные по интенсивности показателя LOD. Показатели LOD > 5 считаются значимыми. Единственные локусы из этих анализов, которые также проявились как значимые QTL в популяциях F1-Н, встречаются на хромосоме 7 между 119,8 и 133,4 т. о. в пределах SCD-QTL1.

Популяция F2-Н, родители	Хромосома	Физический левый фланкирующий маркер B73_v4	Физический правый фланкирующий маркер B73_v4	Растения в исследовании	Показатель LOD	Объясненная дисперсия	Значимый в исследовании поколения F1-Н
SYN004 - NP2222	7	123,731,235	123,980,818	240	20,23	16,4	Y
SYN004 - NP2222	7	119,807,228	121,417,971	240	16,77	14,13	Y
SYN004 - NP2222	1	279,919,886	279,939,641	240	10,32	7,44	N
SYN004 - SYN006	7	132,975,504	133,378,292	310	6,63	7,28	Y
SYN004 - SYN006	3	208,702,590	208,734,331	310	6,15	5,87	N

Популяция F2-Н, родители	Хромосома	Физический левый фланкирующий маркер B73_v4	Физический правый фланкирующий маркер B73_v4	Растения в исследовании	Показатель LOD	Объясненная дисперсия	Значимый в исследовании поколения F1-Н
SYN004 - NP2222	2	219,293,152	219,456,766	240	5,74	4,03	N
SYN004 - SYN006	2	53,485,817	53,591,523	310	4,89	4,55	N
SYN004 - NP2222	1	52,592,197	53,184,649	240	4,76	3,26	N
SYN004 - SYN006	9	108,418,716	110,030,821	310	4,32	4,62	N
NP2222 - SYN007	6	127,319,447	128,895,525	196	2,97	6,51	N
NP2222 - SYN007	6	129,108,045	131,093,258	196	2,88	6,31	N
SYN004 - SYN006	7	177,902,979	178,663,798	310	2,63	2,78	N
SYN004 - SYN006	7	173,494,985	173,859,507	310	2,35	2,5	N
SYN004 - SYN006	1	286,170,579	286,208,468	310	2,11	2,23	N

Пример 3. Точное картирование границ QTL

[0090] Точное картирование и генотипирование SNP в популяциях F2-Н

[0091] В тех же популяциях F2-Н, выращенных для валидации QTL, растения также генотипировали в пределах ожидаемого интервала QTL на хромосоме 7 с использованием маркеров для анализа TaqMan на основе SNP с прогнозируемыми полиморфизмами между родительскими аллелями популяций F2-Н (см. таблицу 4). Эти маркеры охватывали область хромосомы 7 от 113,9 до 154,6 т. о. (положения из эталонного генома B73_v4) и их отбирали и/или конструировали на основе последовательностей генома для родительских линий. Сравнивая эти результаты, генотип от родителя с признаком SCD (линия В в таблице 5) ассоциирован с более высокими, чем в среднем, значениями степени фертильности гаплоидной пыльцы между маркерами SM0077AQ и SM11142. Эти два маркера фланкируют область размером 2,54 п. о. (координаты B73_v4), содержащую 46 аннотированных моделей генов, и характеризовались 74% диагностической ценностью для определения фертильности пыльцы в этом исследовании. Для подтверждения статистической значимости интервала, определенного посредством рекомбинационного картирования, для однофакторного анализа ANOVA отбирали 466 гаплоидов из популяции F2-Н, которые характеризовались генотипами А-А или В-В по маркерам SM0077AQ и SM11142. При сравнении показателей HMF для группы линии А и группы линии В

(средние значения составляют 1,94 и 6,27 единицы показателя HMF соответственно) было обнаружено, что они статистически значимо отличаются с P-значением, равным $8,44 \cdot 10^{-32}$. На основе всех анализов авторы настоящего изобретения определяют SCD-QTL1 по области хромосомы 7, фланкированной маркерами SM0077AQ и SM11142, соответствующими их физическим положениям в B73, которые были определены путем поиска последовательностей ДНК, ассоциированных с каждым из анализов ТаqMan в этом эталонном геноме. Последовательности ДНК для этих маркеров ТаqMan приведены в таблице 6.

[0092] Таблица 4. Положения полиморфных маркеров для анализа SNP, используемых для точного картирования границ QTL в популяциях F2-N. Маркеры конструировали и отбирали на основании прогнозируемых различий между родителями биаллельных популяций на основе последовательностей генома, затем валидировали в родительских материалах. Не все маркеры было возможно валидировать и поэтому не все они включены в окончательный анализ.

Хромосома	Название маркера	Физическое положение B73_v4	Единица
7	SM4510	112,540,490	п. о.
7	SM3802	112,555,427	п. о.
7	SM1496EQ	113,574,327	п. о.
7	SM3773	114,658,138	п. о.
7	SM3428	115,920,405	п. о.
7	SM1157AQ	118,721,983	п. о.
7	SM11124	118,786,031	п. о.
7	SM11129	119,353,581	п. о.
7	SM11120	119,377,549	п. о.
7	SM11108	119,380,216	п. о.
7	SM11135	119,506,978	п. о.
7	SM11123	119,602,354	п. о.
7	SM11115	119,801,633	п. о.
7	SM11130	120,115,075	п. о.
7	SM11114	120,243,414	п. о.
7	SM11117	120,391,868	п. о.
7	SM11128	121,270,456	п. о.
7	SM11137	121,355,533	п. о.
7	SM11133	121,398,656	п. о.
7	SM11121	121,546,326	п. о.
7	SM11127	121,550,070	п. о.
7	SM11109	121,654,842	п. о.
7	SM11113	121,679,311	п. о.
7	SM11126	121,736,796	п. о.

Хромосома	Название маркера	Физическое положение B73_v4	Единица
7	SM11118	121,740,908	п. о.
7	SM11112	121,986,702	п. о.
7	SM11111	122,059,610	п. о.
7	SM11122	122,206,231	п. о.
7	SM11116	122,356,146	п. о.
7	SM11136	122,713,813	п. о.
7	SM11103	122,751,504	п. о.
7	SM11105	122,819,769	п. о.
7	SM11134	122,826,461	п. о.
7	SM11138	122,834,646	п. о.
7	SM11131	122,852,574	п. о.
7	SM11119	123,259,873	п. о.
7	SM11139	123,473,353	п. о.
7	SM11104	123,636,820	п. о.
7	SM0077AQ	123,982,736	п. о.
7	SM11165	124,122,936	п. о.
7	SM11163	124,766,387	п. о.
7	SM11164	126,034,078	п. о.
7	SM11161	126,321,545	п. о.
7	SM11142	126,520,521	п. о.
7	SM11141	126,703,448	п. о.
7	SM11143	126,939,888	п. о.
7	SM11162	128,277,353	п. о.
7	SM11107	128,285,939	п. о.
7	SM11106	128,419,115	п. о.
7	SM11132	128,495,322	п. о.
7	SM11125	128,589,230	п. о.
7	SM11140	128,750,237	п. о.
7	SM11110	128,989,703	п. о.
7	SM4152	129,166,619	п. о.
7	SM11101	130,286,707	п. о.
7	SM11100	130,287,037	п. о.
7	SM1255AQ	131,676,810	п. о.
7	SM1255CQ	131,676,828	п. о.
7	SM1255BQ	131,676,933	п. о.
7	SM11102	134,895,500	п. о.
7	SM3975	135,238,418	п. о.
7	SM2485	139,327,889	п. о.
7	SM0711BQ	139,470,524	п. о.
7	SM0711AQ	139,470,715	п. о.
7	SM4519	139,492,603	п. о.
7	SM3432	154,611,128	п. о.

[0093] Таблица 5. Группы рекомбинации наблюдали при сегрегации гаплоидной популяции F2-Н от 123,4 до 128,8 т. о. с использованием полиморфных анализов TaqMan. Генотипы оценивали как соответствующие либо родителю А (без признака SCD), либо родителю В (с признаком SCD) по каждому маркеру, а затем сравнивали с показателями НМF пыльцы. Компилировали генотипические группы в области и показатели НМF для растений, соответствующих этому генотипу, усредняли с определением характеристик, относящихся к SCD, на основе генотипа в этой области. На основании положений рекомбинации (переключение с А на В или наоборот) и средних показателей НМF QTL-SCD1 находится между маркерами SM0077AQ и SM11142. Среднее значение НМF для всех гаплоидов в популяции F2-Н составляло 4,0.

		Физическое положение	123,473,353	123,636,820	123,982,736	126,520,521	128,419,115	128,589,230	128,750,237
		Название маркера	SM11139	SM11104	SM0077AQ	SM11142	SM11106	SM11125	SM11140
Группа	Количество растений с этим генотипом	Среднее значение показателя НМF	Генотип в положении маркера (А или В)						
Диплоидный родитель NP2222 (линия А)	14	13	А	А	А	А	А	А	А
Диплоидный родитель SYN004 (линия В)	11	13	В	В	В	В	В	В	В
Гаплоиды F2-Н	199	6	В	В	В	В	В	В	В
Гаплоиды F2-Н	12	6	В	В	В	В	А	А	А
Гаплоиды F2-Н	4	5	В	В	В	А	А	А	А
Гаплоиды F2-Н	2	0	В	В	А	А	А	А	А
Гаплоиды F2-Н	5	6	А	А	А	В	В	В	В
Гаплоиды F2-Н	6	2	А	А	А	А	В	В	В
Гаплоиды F2-Н	247	2	А	А	А	А	А	А	А

[0094] Таблица 6. Последовательности ДНК для маркеров, определяющих SCD-QTL1

Название маркера	SM0077AQ	SM11142
Физическое положение B73_v4	123,982,736	126,520,521
Прямой праймер	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 3 и 4
Обратный праймер	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 5
Целевая последовательность	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7

5 Пример 4. Сравнительное картирование SCD-QTL1 с ранее опубликованными QTL и/или SNP

[0095] В двух опубликованных исследованиях с применением полногеномного ассоциативного картирования Ma (2018) и Yang (2019) ранее идентифицировали QTL, ассоциированный с SCD, на хромосоме 7 маиса. Однако QTL, определенный в этих исследованиях, не перекрывается с SCD-QTL1, как определено в данном документе с использованием эталонного генома B73_v4. Ma (2018) идентифицировал два SNP, ассоциированные с SCD, в популяции для их картирования, один из которых находился в положении 113165535 п. о., а другой – в положении 170671328 п. о. в геноме B73_v2 (доступно по адресу maizegdb.org). Поиск BLAST целевой последовательности (SEQ ID NO: 6) для маркера SM0077AQ на maizegdb.org демонстрирует относительное положение этой последовательности между B73_v2 и B73_v4, где левая граница SCD-QTL1 начинается с 120202757 п. о. в B73_v2. Эта область не перекрывается с областью, определенной Ma (2018). Yang (2019) идентифицировал 3 QTL, ассоциированные с хромосомой 7, в двух разных линиях маиса и предоставил их примерные геномные положения в cM (расстояние на карте) в карте сцепления, полученной для их исследования, которую они описывают как согласующуюся с картами, полученными для B73_v2. Они также предоставили номера хромосомных бинов для QTL, но они являются неточными, поскольку бины могут быть очень большими (например, бин 7.02 охватывает от 13,8 до 128,1 т. о., покрывая 62% хромосомы 7 в эталонном геноме B73_v2). С применением карты сцепления, полученной в исследовании, было обнаружено, что три идентифицированных локуса (qHMF7a, qHMF7b и qHMF7c)

расположены на расстоянии 26,51-28,51 сМ, 41,51-43,51 сМ и 74,41 сМ. SCD-QTL1, согласно результатам поиска BLAST целевой последовательности, полученным в геномном браузере maizeGDB, находится на более чем 97,2 сМ от начала хромосомы и, таким образом, не может перекрываться ни с одним из QTL, идентифицированных в Yang (2019). Рассмотрев эти относительные координаты, авторы настоящего изобретения уверены, что SCD-QTL1 представляет собой новый QTL, ранее не идентифицированный в академической литературе.

Пример 5. Фенотипический анализ

[0096] Для сравнения фенотипов спонтанного удвоения хромосом (SCD), наблюдаемых в линиях с высокой степенью удвоения, наблюдаемой при исходном скрининге, отбирали две линии, SYN007 и SYN004, для более глубокого фенотипического анализа, включая тестирование жизнеспособности пыльцы и анализ плоидности различных типов тканей. Анализ плоидности может быть легко проведен на различных тканях растений с использованием проточной цитометрии с определением среднего содержания ДНК в популяции ядер, экстрагированных из свежей ткани (Dolezel, 2007). У диплоидов из этих линий не наблюдали SCD при анализе тканей листа проростка, взрослого листа, пыльцы и шелухи с использованием проточной цитометрии. Однако у гаплоидных растений удвоение было легко выявляемым с применением проточной цитометрии мужских репродуктивных тканей (пыльников, пыльцы, колосков). Однако SCD не наблюдали в вегетативных тканях (лист, корень, стебель), что указывает на то, что в процессе развития SCD, наблюдаемое в этих линиях, происходит только после инициации цветковых органов.

[0097] Метаболическая активность пыльцы может быть определена с применением колориметрического анализа с бромидом 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) (Firmage and Dafni, 2001). В присутствии активных ферментов оксидоредуктаз в пыльцевых зернах МТТ восстанавливается из желтого раствора до нерастворимого пурпурного формазана. Пыльцевые зерна, которые становятся пурпурными в присутствии МТТ, считаются метаболически активными и считаются жизнеспособными. Поскольку гаплоидная пыльца всегда стерильна в отсутствие удвоения хромосом, наличие жизнеспособной пыльцы в гаплоидном растении является прямым результатом SCD. В этом эксперименте собирали пыльники от каждой из двух линий на стадии сбрасывания зрелой пыльцы. Затем пыльцу из отдельных пыльников высвобождали в раствор МТТ посредством аккуратного измельчения ткани пластиковым пестиком. Пыльца, собранная с отдельных пыльников

линии SYN007, обычно демонстрировала смесь жизнеспособной и нежизнеспособной пыльцы. Однако пыльца из отдельных пыльников линии SYN004 была либо на 100% жизнеспособной, либо на 0% жизнеспособной. Кроме того, при сравнении отдельных пыльников по длине, пыльники с жизнеспособной (т. е. с удвоением) пыльцой были в
 5 два раза длиннее пыльников с нежизнеспособной (т. е. без удвоения) пыльцой только в линии SYN004. Обычно все пыльники в цветках были одинаковой длины. Эти данные подразумевают, что время развития SCD SYN007 наступает намного позже, после того, как клетки-предшественники пыльцы уже сформировались и отличаются друг от друга. Тем не менее, SCD SYN004 должно происходить на более ранних стадиях цветочного
 10 развития, примерно в то время, когда формируются отдельные цветки, но до того, как начнут образовываться пыльники. Эти выводы основаны на принципах цветочного развития маиса, где изначально небольшая группа меристематических клеток являются основателями всей метелки через ряд событий дифференцировки. Если SCD
 15 происходит очень рано в ходе развития, авторы настоящего изобретения ожидают, что большие части, возможно даже вся метелка, продемонстрируют SCD. Фенотип увеличенных пыльников (более крупные клетки указывают на более высокий уровень пloidности) в SYN004 и целых популяциях жизнеспособной пыльцы подразумевает, что SCD в этой линии происходит в клетке, которая предшествует всему пыльнику в ходе развития. Смесь жизнеспособной пыльцы в отдельных пыльниках и отсутствие
 20 пыльников с полным удвоением (более крупных) подразумевает, что SGD в SYN007 происходит позже, после того, как большинство цветочных органов уже присутствуют, но до того, как пыльца созреет.

Пример 6. Пенетрантность QTL в разнообразной зародышевой плазме и в отсутствие дополнительной обработки для удвоения

25 **[0098]** Обычно пенетрантность QTL зависит от зародышевой плазмы на основе других, часто не идентифицированных генетических факторов, сегрегирующих в различных фоновых условиях в зародышевой плазме. Для тестирования того, насколько более высокой пенетрантностью будет обладать SCD-QTL1 в более разнообразном наборе линий, отбирали панель из 17 элитных инбредных линий из
 30 числа популяций для селекции Syngenta в Северной Америке. Эти линии представляли собой несколько гетерозисных групп (жесткий стебель, нежесткий стебель и содержание йода) и ряд групп по зрелости. Для получения разнообразных популяций зародышевой плазмы для фенотипического скрининга, SYN004, донора QTL, скрещивали с каждой из 17 элитных линий. Затем эти популяции F1 подвергли

возвратному скрещиванию с 17 рекуррентными родительскими особями с получением поколения BC1 и повторно подвергали возвратному скрещиванию с получением поколения BC2. В популяциях BC2 маркеры для анализа SNP, определяющие QTL (таблица 5), использовали для генотипирования линий по интервалу QTL и
5 идентификации растений, которые были гетерозиготными по благоприятному (SYN004, удвоение) аллелю. Затем эти гетерозиготы скрещивали с линией, являющейся гаплоиндуктором, и полученные гаплоиды идентифицировали в зрелых семенах на основе цветкового маркера R-nj. Из полученных гаплоидов 50% были положительными в отношении благоприятного аллеля и 50% были отрицательными, что приводит к
10 получению идеальной контрольной группы для сравнения характеристик в полевых условиях.

[0099] Зрелое гаплоидное семя непосредственно высевали в поле и проростки повторно генотипировали с применением маркеров SNP (таблица 5) для подтверждения статуса аллеля QTL, а также для удаления любых потенциальных диплоидов из
15 популяции. Растения выращивали в стандартных условиях полевого питомника с добавлением теневого тканевого чехла для уменьшения интенсивности света до сбрасывания пыльцы. Фенотипы индивидуальных растений определяли для каждого гаплоида, измеряя количество дней сбрасывания пыльцы и количество зерен на початок после самоопыления. В отсутствие обработки колхицином или другой химической
20 обработки для удвоения ожидание для гаплоидных фенотипов составляет ноль дней сбрасывания пыльцы и ноль зерен. Действительно, это ожидание наблюдали в рекуррентных родительских контролях, где отсутствовал благоприятный аллель SCD-QTL1. Однако в популяции гаплоидов BC2 было обнаружено, что многие линии имеют более фертильную пыльцу, присутствующую у особей с генотипом благоприятного
25 аллеля SCD-QTL1 (таблица 7). Это было верно для 7 из 17 элитных линий, что указывает на умеренный уровень пенетрантности QTL. Эти же линии имели умеренный набор семян (у 5 из 17 линий было больше зерен на початок в присутствии
30 благоприятного аллеля SCD1-QTL), что, возможно, указывает на то, что дополнительный фактор, способствующий удвоению у женской особи (гаплоидная женская фертильность), может отсутствовать в некоторых линиях.

[00100] Таблица 7. Фенотипы пыльцы и зерен в популяциях гаплоидов BC2, выращенных в отсутствие химической обработки для удвоения

Рекуррентная родительская инбредная линия BC2	Генотип SCD1-QTL	Процент растений, которые сбрасывают пыльцу	Среднее количество дней сбрасывания пыльцы на растение	Процент самооплодотворенных растений с зернами	Среднее количество зерен на растение
Линия 1	Неблагоприятный аллель	22,2%	1,2	5,6%	1,3
Линия 1	Аллель SCD	42,1%	2,5	10,5%	2,0
Линия 2	Неблагоприятный аллель	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Линия 2	Аллель SCD	1,8%	0,1	1,8%	0,1
Линия 3	Неблагоприятный аллель	12,1%	0,5	0,0%	0,0
Линия 3	Аллель SCD	75,9%	4,2	17,9%	0,6
Линия 4	Неблагоприятный аллель	32,0%	2,1	20,0%	3,1
Линия 4	Аллель SCD	25,0%	1,4	6,3%	1,7
Линия 5	Неблагоприятный аллель	27,3%	1,5	0,0%	0,0
Линия 5	Аллель SCD	15,0%	1,0	5,0%	0,4
Линия 6	Неблагоприятный аллель	3,4%	0,2	0,0%	0,0
Линия 6	Аллель SCD	8,7%	0,6	0,0%	0,0
Линия 7	Неблагоприятный аллель	0,0%	0,0	0,0%	0,0
Линия 7	Аллель SCD	0,0%	0,0	0,0%	0,0
Линия 8	Неблагоприятный аллель	71,9%	5,8	46,9%	2,6
Линия 8	Аллель SCD	90,6%	6,5	50,0%	5,3
Линия 9	Неблагоприятный аллель	14,3%	0,6	0,0%	0,0
Линия 9	Аллель SCD	5,6%	0,2	0,0%	0,0
Линия 10	Неблагоприятный аллель	81,4%	6,1	51,2%	9,6
Линия 10	Аллель SCD	94,3%	6,5	51,4%	11,0
Линия 11	Неблагоприятный аллель	78,6%	4,4	2,4%	0,0
Линия 11	Аллель SCD	64,3%	3,6	7,1%	0,1
Линия 12	Неблагоприятный аллель	52,0%	3,0	36,0%	6,3
Линия 12	Аллель SCD	77,8%	4,6	66,7%	10,1
Линия 13	Неблагоприятный аллель	30,0%	1,8	22,5%	1,5
Линия 13	Аллель SCD	50,0%	3,6	40,0%	5,6
Линия 14	Неблагоприятный аллель	0,0%	0,0	0,0%	0,0
Линия 14	Аллель SCD	0,0%	0,0	0,0%	0,0
Линия 15	Неблагоприятный аллель	29,4%	1,2	0,0%	0,0
Линия 15	Аллель SCD	50,0%	3,6	5,0%	0,1
Линия 16	Неблагоприятный аллель	78,8%	5,0	18,2%	2,2
Линия 16	Аллель SCD	77,4%	5,0	29,0%	4,8
Линия 17	Неблагоприятный аллель	8,7%	0,4	4,3%	0,0
Линия 17	Аллель SCD	10,5%	0,6	5,3%	0,1
Диплоидная рекуррентная родительская особь	Неблагоприятный аллель	100,0%	9,5	100,0%	320,3
Диплоидная родительская особь, являющаяся донором SCD	Аллель SCD	100,0%	9,0	100,0%	318,7

Пример 7. Пенетрантность QTL в разнообразной зародышевой плазме в комбинации с обработкой колхицином для удвоения

[00101] Для тестирования того, можно ли использовать SCD-QTL1 в комбинации с химической обработкой для удвоения, например, обработкой колхицином, и оказать аддитивный эффект на гаплоидную мужскую фертильность, авторы настоящего изобретения брали 17 элитных линий BC2 из примера 6 через одно дополнительное поколение возвратного скрещивания для получения BC3. Генотипирование использовали для идентификации гетерозигот в SCD-QTL1 и затем эти материалы скрещивали с гаплоиндуктором, зародышами, выделенными из незрелых початков, и гаплоиды регенерировали для пересадки в полевых условиях. Сразу после выделения зародыши из каждой из 17 популяций BC3 разделяли на 2 группы обработки. Одна группа получала обработку колхицином для удвоения, а вторая группа не получала никакого химического средства для удвоения. Таким образом, имелись 4 группы обработки для сравнения в каждой элитной популяции BC3: (1) SCD-QTL1 с колхицином (гаплоидная мужская фертильность плюс колхицин), (2) неблагоприятный аллель QTL с колхицином (положительный контроль), (3) SCD-QTL1 без колхицина (только гаплоидная мужская фертильность) (4) и неблагоприятный аллель QTL без колхицина (отрицательный контроль). Все линии высевали в трех повторностях в ходе испытания в течение примерно 6 месяцев и данные объединяли для анализа.

[00102] В этом испытании размеры выборки были достаточно большими (минимум 50 гаплоидов на группу обработки) для проведения статистического анализа, чтобы подтвердить, были ли наблюдаемые различия в наборе зерен между группами с благоприятным аллелем SCD-QTL1 и без него статистически значимыми с использованием Т-критерия Стьюдента (таблица 8). Три из 17 линий характеризовались значимым увеличением (р-значение < 0,05) в наборе зерен в присутствии SCD-QTL1, в то время как 3 из 17 линий демонстрировали значимое уменьшение (р-значение < 0,05). Семь линий не демонстрировали какого-либо значимого влияния QTL, а 4 были невосприимчивы ко всем процедурам, связанным с удвоенными гаплоидами (они были исключены из анализа). Среди 7 линий, которые не демонстрировали какие-либо статистически значимые различия, несколько линий характеризовались положительными, но незначимыми тенденциями. 3 линии, которые демонстрировали отрицательную ассоциацию с SCD-QTL1, вероятно, указывают на другой фактор, косегрегирующий с SCD-QTL1, который все еще является относительно большой

областью (~2 т. о.) и содержит 62 потенциальных гена-кандидата. При образовании удвоенных гаплоидов основным показателем успеха является количество отдельных гаплоидов, которые продуцируют початки с более чем 5 зернами на початок при обработке колхицином. Сравнивая только группы, обработанные колхицином (которые в целом характеризовались лучшими результатами как по образованию пыльцы, так и по образованию зерен, чем только SCD-QTL1), 5 линий демонстрировали увеличение процента гаплоидов, которые образовывали самооплодотворенный початок с более чем 5 зернами, что указывает на то, что в некоторых линиях наличие благоприятного аллеля SCD-QTL1 повысило бы эффективность образования удвоенных гаплоидов (таблица 8).

[00103] Таблица 8. Фенотипы пыльцы и зерен для 4 групп обработки в примере 7

Рекуррентная родительская инбредная линия ВСЗ	Генотип SCD1-QTL	Химическая обработка	Среднее количество дней сбрасывания пыльцы на растение	Среднее количество зерен на растение	Процент растений с початками с более чем 5 зернами
Линия 1	Аллель SCD	Колхицин	3,1	23,8	53,9%
Линия 1	Неблагоприятный аллель	Колхицин	2,4	13,5	26,6%
Линия 1	Аллель SCD	Нет	0,66	1,05	3,6%
Линия 1	Неблагоприятный аллель	Нет	0,57	0,72	4,3%
Линия 2	Аллель SCD	Колхицин	1,72	5	12,0%
Линия 2	Неблагоприятный аллель	Колхицин	2,35	9,62	13,5%
Линия 2	Аллель SCD	Нет	0,03	0,166	0,0%
Линия 2	Неблагоприятный аллель	Нет	0,18	6,79	3,1%
Линия 3	Аллель SCD	Колхицин	1,76	7,62	6,9%
Линия 3	Неблагоприятный аллель	Колхицин	1,45	9,03	9,1%
Линия 3	Аллель SCD	Нет	0,75	0,11	1,2%
Линия 3	Неблагоприятный аллель	Нет	0,21	0	0,0%
Линия 4	Аллель SCD	Колхицин	0,04	0	0,0%
Линия 4	Неблагоприятный аллель	Колхицин	0,57	7,1	13,2%
Линия 4	Аллель SCD	Нет	0	0	0,0%
Линия 4	Неблагоприятный аллель	Нет	0,55	23,8	10,2%
Линия 5	Аллель SCD	Колхицин	2,34	2,31	3,1%
Линия 5	Неблагоприятный аллель	Колхицин	2,19	4,88	7,6%
Линия 5	Аллель SCD	Нет	0,04	0	0,0%

Рекуррентная родительская инбредная линия ВС3	Генотип SCD1-QTL	Химическая обработка	Среднее количество дней сбрасывания пыльцы на растение	Среднее количество зерен на растение	Процент растений с початками с более чем 5 зернами
Линия 5	Неблагоприятный аллель	Нет	0,28	10,5	4,8%
Линия 6	Аллель SCD	Колхицин	1,675	11,23	25,0%
Линия 6	Неблагоприятный аллель	Колхицин	2,01	19,09	27,2%
Линия 6	Аллель SCD	Нет	0,03	0,006	0,0%
Линия 6	Неблагоприятный аллель	Нет	0,2	7,75	4,1%
Линия 7	Аллель SCD	Колхицин	1,58	53,5	37,9%
Линия 7	Неблагоприятный аллель	Колхицин	1,298	54,18	29,9%
Линия 7	Аллель SCD	Нет	0,055	0	0,0%
Линия 7	Неблагоприятный аллель	Нет	0,026	0,23	0,7%
Линия 8	Аллель SCD	Колхицин	1,72	37,34	31,1%
Линия 8	Неблагоприятный аллель	Колхицин	1,466	26,17	32,0%
Линия 8	Аллель SCD	Нет	0,605	1,85	7,9%
Линия 8	Неблагоприятный аллель	Нет	1,034	50,21	7,0%
Линия 9	Аллель SCD	Колхицин	2,58	27,9	36,0%
Линия 9	Неблагоприятный аллель	Колхицин	2,51	24,067	29,3%
Линия 9	Аллель SCD	Нет	0,35	3,12	5,2%
Линия 9	Неблагоприятный аллель	Нет	0,13	2,68	1,2%
Линия 10	Аллель SCD	Колхицин	1,12	23,17	34,2%
Линия 10	Неблагоприятный аллель	Колхицин	1,005	13,75	26,4%
Линия 10	Аллель SCD	Нет	0,82	2,66	15,9%
Линия 10	Неблагоприятный аллель	Нет	0,75	2,275	10,7%
Линия 11	Аллель SCD	Колхицин	1,09	4,97	8,7%
Линия 11	Неблагоприятный аллель	Колхицин	1,2	18,11	17,5%
Линия 11	Аллель SCD	Нет	0,22	2,07	4,9%
Линия 11	Неблагоприятный аллель	Нет	0,41	7,02	5,7%
Линия 12	Аллель SCD	Колхицин	1,25	19,56	28,5%
Линия 12	Неблагоприятный аллель	Колхицин	0,96	22,12	21,3%
Линия 12	Аллель SCD	Нет	1,13	8,79	18,2%
Линия 12	Неблагоприятный аллель	Нет	0,72	11,49	11,0%
Линия 13	Аллель SCD	Колхицин	1,45	32,5	25,8%
Линия 13	Неблагоприятный аллель	Колхицин	1,33	24,5	24,7%
Линия 13	Аллель SCD	Нет	2,14	3,72	20,7%

Рекуррентная родительская инбредная линия ВС3	Генотип SCD1-QTL	Химическая обработка	Среднее количество дней сбрасывания пыльцы на растение	Среднее количество зерен на растение	Процент растений с початками с более чем 5 зернами
Линия 13	Неблагоприятный аллель	Нет	1	1,36	6,5%
Линия 14	Аллель SCD	Колхицин	1,28	31	29,9%
Линия 14	Неблагоприятный аллель	Колхицин	1,1	40,57	26,2%
Линия 14	Аллель SCD	Нет	0,04	2,24	1,7%
Линия 14	Неблагоприятный аллель	Нет	0,06	0,03	0,0%
Линия 15	Аллель SCD	Колхицин	2,66	45,47	64,9%
Линия 15	Неблагоприятный аллель	Колхицин	2,81	72,9	72,2%
Линия 15	Аллель SCD	Нет	0,21	6,46	8,0%
Линия 15	Неблагоприятный аллель	Нет	0,36	9,34	11,0%
Линия 16	Аллель SCD	Колхицин	1,65	31,56	34,1%
Линия 16	Неблагоприятный аллель	Колхицин	1,67	28,03	37,6%
Линия 16	Аллель SCD	Нет	0,97	6,67	21,9%
Линия 16	Неблагоприятный аллель	Нет	0,85	5,3	15,0%
Линия 17	Аллель SCD	Колхицин	2,63	52,86	49,1%
Линия 17	Неблагоприятный аллель	Колхицин	2,51	58,48	50,4%
Линия 17	Аллель SCD	Нет	1,23	2,41	1,6%
Линия 17	Неблагоприятный аллель	Нет	0,83	0,29	0,7%

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ отбора первого растения или зародышевой плазмы маиса, которые демонстрируют спонтанное удвоение хромосом ("SCD") при нахождении в гаплоидном состоянии, при этом способ включает
- 5
- a. выделение нуклеиновых кислот из первого растения или зародышевой плазмы маиса;
 - b. выявление в первом растении или зародышевой плазме маиса SCD-QTL1, содержащего SEQ ID NO: 6 и 7, который ассоциирован со спонтанным удвоением
 - 10 хромосом; и
 - c. отбор первого растения или зародышевой плазмы маиса или отбор потомка первого растения или зародышевой плазмы маиса, содержащих SCD-QTL1, который ассоциирован со спонтанным удвоением хромосом.
2. Способ по п. 1, дополнительно включающий скрещивание указанного выбранного первого растения или зародышевой плазмы маиса со вторым растением или зародышевой плазмой маиса с получением растения-потомка маиса, где растение-потомок или зародышевая плазма маиса демонстрируют повышенное спонтанное удвоение хромосом ("SCD") при нахождении в гаплоидном состоянии.
- 15
3. Способ по п. 1, где SCD-QTL1 выявляют с использованием композиции, содержащей выявляемую метку.
- 20
4. Способ получения растения, являющегося спонтанно удвоенным гаплоидом, при этом способ включает:
- a. получение первого растения маиса, содержащего SCD-QTL1, содержащий SEQ ID NO: 6 и 7, который ассоциирован со спонтанным удвоением
 - 25 хромосом;
 - b. скрещивание первого растения маиса со вторым растением маиса;
 - c. получение потомства от скрещивания на стадии b и отбор из него гаплоидного потомка; и
 - d. обеспечение спонтанного удвоения хромосом у гаплоидного потомка;
 - 30 за счет чего обеспечивается получение растения, являющегося спонтанно удвоенным гаплоидом.
5. Способ по п. 3, где растение, являющееся спонтанно удвоенным гаплоидом, содержит репродуктивные ткани, способные продуцировать фертильные гаметы.

6. Способ по п. 4, где растение, являющееся спонтанно удвоенным гаплоидом, характеризуется мужской фертильностью.
7. Способ по п. 3, где первое растение маиса представляет собой растение маиса, являющееся гаплоиндуктором.
- 5 8. Способ по п. 6, где первое растение маиса содержит мутацию в CENH3 или IG1.
9. Способ по п. 3, где второе растение маиса представляет собой растение маиса, являющееся гаплоиндуктором.
- 10 10. Способ по п. 8, где второе растение маиса содержит мутацию в ZmMATL.
11. Способ интрогрессии локуса, представляющего интерес, при этом способ включает
- 15 a. получение первого растения маиса, содержащего SCD-QTL1, содержащий SEQ ID NO: 6 и 7, который ассоциирован со спонтанным удвоением хромосом;
- b. скрещивание первого растения маиса со вторым растением маиса, содержащим локус, представляющий интерес;
- c. получение потомства от скрещивания на стадии b.;
- d. необязательно возвратное скрещивание потомства из стадии c. с первым 20 растением маиса или вторым растением маиса;
- e. скрининг потомства из стадии c. или стадии d. в отношении наличия локуса, представляющего интерес, и QTL SCD; и
- f. отбор потомка, по меньшей мере гетерозиготного по локусу, представляющему интерес, и по меньшей мере гетерозиготного по QTL SCD; 25 за счет чего обеспечивается получение растения маиса, содержащего локус, представляющий интерес, и QTL SCD.
12. Способ по п. 10, где скрининг потомства в отношении наличия локуса, представляющего интерес, и SCD-QTL проводят по генотипу.
13. Способ по п. 10, где скрининг потомства в отношении наличия локуса, представляющего интерес, и SCD-QTL проводят по фенотипу. 30
14. Способ по п. 10, где локус, представляющий интерес, предусматривает локус количественного признака, который ассоциирован с признаком, выбранным из группы, состоящей из повышенной урожайности, повышенной оптимизации

потребления воды, повышенной устойчивости к заболеваниям, повышенной толерантности к засухе и повышенной устойчивости к гербицидам.

15. Способ по п. 13, где локус, представляющий интерес, предусматривает трансген.
- 5 16. Растение маиса, полученное посредством способа по п. 10.
17. Растение маиса по п. 15, где растение маиса относится к гетерозисной группе с нежестким стеблем, гетерозисной группе с жестким стеблем или тропической гетерозисной группе.
18. Растение маиса по п. 15, где растение маиса представляет собой
- 10 гибридное растение маиса или элитное растение маиса.
19. Растение-потомок маиса, полученное из растения маиса по п. 15.
20. Набор для выявления, содержащий SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.
21. Способ получения растения маиса, являющегося спонтанно удвоенным
- 15 гаплоидом, при этом способ включает:
- a. идентифицирование первого растения или зародышевой плазмы маиса, которые содержат SCD-QTL1, содержащий SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, ассоциированный со спонтанным удвоением хромосом;
- b. скрещивание первого растения маиса со вторым растением маиса;
- 20 c. получение потомства от скрещивания на стадии b и отбор из него гаплоидного потомка; и
- d. обеспечение спонтанного удвоения хромосом у гаплоидного потомка, за счет чего обеспечивается получение растения, являющегося спонтанно удвоенным гаплоидом.