



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 130656

(13) C2

(51) МПК

A01H 5/10 (2018.01)

A01H 6/46 (2018.01)

A01H 1/04 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2023 00525	(72) Винахідник(и): Шейерманн Даніела (DE), Оузунова Мілена (DE), Кессел Беттіна (DE), Келлер Біт (CH), Янг Пінг (CH)
(22) Дата подання заявки: 14.07.2021	(73) Володілець (володільці): КВС СААТ СЕ ЕНД КО. КГАА, Grimsehlstrasse 31, 37574 Einbeck, Germany (DE), ЮНІВЕРСИТЕТ ОФ ЦЮРИХ, Rämistrasse 71, 8006 Zürich, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 09.04.2026	(74) Представник: Нестеренко Наталія Олександрівна, реєстр. №413
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 20185759.6	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: DE 102013014637 A1, 05.03.2015. WO 2019/038326 A1, 28.02.2019. WO 2020/132188 A1, 25.06.2020. DATABASE EMBL [online] 24 July 2015 (2015-07-24), "Zea mays cultivar RP4Htn1 hypothetical proteins, DUF630 domain protein, putative zinc finger protein, esterase/lipase/thioesterase, wall-associated receptor-like protein (WAK-RLP1), wall-associated receptor-like kinase 1 (WAK-RLK 1), putative reticul", retrieved from EBI accession no. EM_STD:KR014666 Database accession no. KR014666. EP 3231874 A1, 18.10.2017.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 14.07.2020	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP	
(41) Публікація відомостей про заявку: 11.10.2023, Бюл.№ 41	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 08.04.2026, Бюл.№ 14	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/EP2021/069552, 14.07.2021	

(54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ І ВІДБОРУ РОСЛИНИ КУКУРУДЗИ, СТІЙКОЇ ДО ГЕЛЬМІНТОСПОРІОЗНОЇ ПЛЯМИСТОСТІ ЛИСТЯ КУКУРУДЗИ**(57) Реферат:**

Винахід стосується рослини кукурудзи, що має підвищену стійкість до патогену *Helminthosporium turcicum* та містить відповідні молекулярні маркери. Винахід також стосується способу ідентифікації та способу генерування такої рослини кукурудзи.

UA 130656 C2

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

Цей винахід стосується рослин кукурудзи, що мають підвищену стійкість або толерантність до патогену, зокрема, підвищену стійкість або толерантність до *Exserohilum turcicum*.

ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

У кукурудзі (*Zea mays* L.) міститься велика кількість грибкових патогенів, що викликають захворювання листя. Гриб, який може завдати найбільших збитків у тропічних, а також у помірних кліматичних умовах, як-от умови значної частини Європи та Північної Америки, а також Африки та Індії, відомий під назвою *Helminthosporium turcicum* або його синонім *Exserohilum turcicum* (Pass.) Леонард та Саггс (телеоморф: *Setosphaeria turcica* (Латтрелл) Леонард і Саггс). *H. turcicum* є причиною плямистості листя, відомої як "Гельмінтоспоріозна плямистість листя кукурудзи" (NCLB), яка може приймати епідемічні масштаби у вологі роки, вражаючи вразливі сорти кукурудзи і викликаючи величезні збитки і значні втрати врожаю на 30 % і більш широких територіях [Перкінс і Педерсен, 1987; Раймундо і Хукер, 1981; Ульstrup і Майлз, 1957]. Отже, з 1970-х років ведеться пошук природної стійкості генетичного матеріалу. Нині відома як кількісна, також і якісна стійкість. У той час, як оліго- або полігенно успадкована кількісна стійкість здається неповною і неспецифічною щодо раси, і залежить від додаткових і частково домінуючих генів, якісна стійкість зазвичай залежить від раси і може успадковуватися через окремі, переважно домінуючі гени, як-от Ht1, Ht2, Ht3, Htm1 або Htn1 [Ліпс і співавт., 1997; Вельц і Гейгер, 2000]. Зворотні схрещування в багатьох часто використовуваних інбредних лініях кукурудзи, як-от W22, A619, B37 або B73 успішно призвели до інтрогресії генів HT, де вони виявляють часткове домінування та експресію залежно від відповідного генетичного фону [Вельц, 1998].

Незважаючи на цю складну генетичну архітектуру стійкості до NCLB у кукурудзи, досі переважно використання гена Ht1 у кукурудзи разом з частковою кількісною стійкістю було достатнім для боротьби з гельмінтоспоріозом [Вельц, 1998]. Підставою для цього є те, що в усьому світі раси 0 і 1 *H. turcicum* найбільш поширені (приблизно 55 %) [Ліпс і співавт., 1997; Фергюсон і Карсон, 2007], у той час як інші раси, такі як 2N та 23N, зустрічаються рідко, та й то на географічно обмежених територіях [Могаддам і Патакі, 1994; Джордан і співавт., 1983; Ліпс і Хайт, 1982; Тхакур і співавт., 1989; Вельц, 1998]. Ця раса 0 є авірулентною відносно рослини кукурудзи з Ht1, тому при забезпеченні відповідної кількісної стійкості рослина кукурудзи виявляє достатню загальну стійкість до NCLB. Однак у багатьох дослідженнях повідомлялося про поширення менш популярних рас [Джордан і співавт., 1983; Вельц, 1998; Пратт і Гордон, 2006]. Причини цього пов'язані з популяційною динамікою патогену, яка дозволяє змінювати вірулентність патогену завдяки новим мутаціям у генах вірулентності та новим комбінаціям доступних генів вірулентності. Зрештою, це може призвести до появи нових, іноді більш агресивних патогенних рас. У Бразилії, наприклад, популяція *H. turcicum* вже, мабуть, значно більш різноманітна з точки зору расового складу, ніж, наприклад, в [Північній Америці. Джанасі і співавт. (1996)] повідомили про раси *H. turcicum*, які вже подолали стійкість, надану геном Ht1. Крім того, існує нестабільність генів стійкості до певних факторів навколишнього середовища, як-от температура та інтенсивність світла в деяких кліматичних зонах [Тхакур і співавт., 1989]. Наслідком цього розвитку є те, що глобальне використання нових генів стійкості до HT або таких генів, яким досі приділялося мало уваги при виробництві комерційних рослин кукурудзи, набуває все більшого значення з метою досягнення ширшої та тривалішої стійкості кукурудзи до *H. turcicum*. Початкові підходи щодо цього були здійснені ще у 1998 р. Патакі і співавт. Стійкість до NCLB у елітній кукурудзі sh2 була покращена за допомогою комбінації Ht1 та Htn1.

Тим часом відомо багато джерел нової стійкості до NCLB у формі QTL (локус кількісної ознаки) [Галіано-Карнейро, А.Л. та Міданер, Т. (2017). Генетика стійкості і патогенності в патосистемі кукурудза/*Setosphaeria turcica* і значення для селекції. *Frontiers in plant science*, 8, 1490], проте функціональна валідація цих QTL, а також молекулярна характеристика відсутніх - гени-збудники невідомі. Розробка маркерів дуже складна і оптимальне використання цієї стійкості в селекції обмежене. Проте, зберігається потреба в добре охарактеризованих генах стійкості, які можуть бути використані для виведення нових сортів рослин, стійких до NCLB.

Отже, метою цього винаходу є ідентифікація і/або додаткова характеристика генів стійкості рослин, що кодують поліпептиди, що надають або підвищують стійкість до грибкового патогену, як-от *Helminthosporium turcicum*.

КОРОТКИЙ ВИКЛАД СУТНОСТІ ВІНАХОДУ

Цей винахід стосується рослин кукурудзи, що мають підвищену стійкість або толерантність до патогену, зокрема, підвищену стійкість або толерантність до патогену, що викликає Гельмінтоспоріозну плямистість листя кукурудзи, тобто до *Exserohilum turcicum* (також відомому як *Helminthosporium turcicum*). Такі рослини кукурудзи можуть бути охарактеризовані як такі, що

мають конкретні молекулярні маркери, як визначено в цьому документі в іншому місці. Такі рослини кукурудзи можуть бути охарактеризовані як такі, що мають певний ген стійкості, як визначено в цьому документі в іншому місці. Цей винахід також стосується способів генерування таких рослин кукурудзи, а також способів ідентифікації таких рослин кукурудзи.

- 5 Цей винахід стосується використання таких рослин кукурудзи для боротьби з зараженістю патогеном. Цей винахід також стосується (виділених) полінуклеїнових кислот, таких як полінуклеїнові кислоти, що містять або кодують молекулярні маркери або гени стійкості, або полінуклеїнові кислоти, що специфічно гібридизуються з ними, а також використання таких полінуклеїнових кислот для ідентифікації або генерування рослин кукурудзи за цим винаходом.
- 10 Цей винахід також стосується рослин кукурудзи або частин рослин, отриманих або отримуваних описаним у цьому документі способом, а також рослин кукурудзи або частин рослин, що містять полінуклеїнові кислоти, як описано в цьому документі.

Маркери за цим винаходом, зокрема, придатні для ідентифікації як алелю HT2, так і алелю HT3, на відміну від раніше відомих маркерів. Отже, діагностична цінність маркерів за цим винаходом набагато вище, оскільки маркери можуть бути використані в широкому діапазоні генотипів. Маркери за цим винаходом (а також їхні комбінації), зокрема, унікальні для алелів як HT2, так і HT3.

Цей винахід, зокрема, охоплюється будь-яким або будь-якою комбінацією щонайменше одного з наведених нижче пронумерованих тверджень з 1 по 157, з будь-яким іншим

20 твердженням і/або варіантом здійснення цього винаходу.

1. Спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, переважно рослини кукурудзи або частини рослини, що має (підвищену) стійкість і/або толерантність до патогену, переважно при цьому згаданим патогеном є *Exserohilumturcicum*, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію полінуклеїнової кислоти (що міститься у

25 хромосомному інтервалі хромосоми кукурудзи 8 між молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005), що містить будь-який щонайменше один молекулярний маркер (алель) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 і MA0064 у рослині кукурудзи або частини рослини.

2. Спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, переважно рослини кукурудзи або частини рослини, що має (підвищену) стійкість і/або толерантність до патогену, переважно при цьому згаданим патогеном є *Exserohilumturcicum*, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію полінуклеїнової кислоти (що міститься у

30 хромосомному інтервалі хромосоми кукурудзи 8 між молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005), що містить будь-які щонайменше два молекулярних маркери (алелю) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 і MA0064 у рослині кукурудзи або частини рослини.

3. Спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, переважно рослини кукурудзи або частини рослини, що має (підвищену) стійкість і/або толерантність до патогену, переважно при цьому згаданим патогеном є *Exserohilumturcicum*, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію полінуклеїнової кислоти (що міститься у

35 хромосомному інтервалі хромосоми кукурудзи 8 між молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005), що містить будь-які щонайменше три молекулярних маркери (алелю) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 і MA0064 у рослині кукурудзи або частини рослини.

4. Спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, переважно рослини кукурудзи або частини рослини, що має (підвищену) стійкість і/або толерантність до патогену, переважно при цьому згаданим патогеном є *Exserohilumturcicum*, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію полінуклеїнової кислоти (що міститься у

40 хромосомному інтервалі хромосоми кукурудзи 8 між молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005), що містить молекулярний маркер (алель) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 і MA0064 у рослині кукурудзи або частини рослини.

5. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-4, при цьому згадана полінуклеїнова кислота додатково містить молекулярний маркер (алель) PZE-108095339.

6. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-4, при цьому згадана полінуклеїнова кислота додатково містить молекулярний маркер (алель) Affx-91328160.

7. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-6, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію будь-якого щонайменше одного молекулярного маркера (алелю) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 і MA0064, та необов'язково PZE-108095339 і/або Affx-91328160 у рослині кукурудзи або частини рослини.

8. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-6, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію будь-яких щонайменше двох молекулярних маркерів (алелів) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 і MA0064, та необов'язково PZE-108095339 і/або Affx-91328160 у

60 рослині кукурудзи або частини рослини.

9. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-6, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію будь-яких щонайменше трьох молекулярних маркерів (алелів) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 і MA0064, та необов'язково PZE-108095339 і/або Affx-91328160 у рослині кукурудзи або частини рослини.

5 10. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-6, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію будь-яких щонайменше чотирьох молекулярних маркерів (алелів) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064 та необов'язково PZE-108095339 і/або Affx-91328160 у рослині кукурудзи або частини рослини.

10 11. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-6, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію будь-яких щонайменше п'ятьох молекулярних маркерів (алелів) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064 та необов'язково PZE-108095339 і/або Affx-91328160 у рослині кукурудзи або частини рослини.

15 12. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-6, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію молекулярного маркера (алеля) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 і MA0064, PZE-108095339 та Affx-91328160 у рослині кукурудзи або частини рослини.

13. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-6, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію молекулярного маркера (алелю) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 та MA0064.

20 14. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-13, при цьому згадана полінуклеїнова кислота фланкована молекулярним маркером (алелем) MA0045 і Affx-91328160 і включає його.

15. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-13, при цьому згадана полінуклеїнова кислота фланкована молекулярним маркером (алелем) MA0045 і PZE-108095339 і включає його.

25 16. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-13, при цьому згадана полінуклеїнова кислота фланкована молекулярним маркером (алелем) MA0045 та MA0064, MA0045 та MA0063, MA0045 та MA0070 або MA0045 та MA0045 і включає його.

17. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-16, при цьому згадана полінуклеїнова кислота не містить (HT2 або HT3) молекулярний маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005.

18. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-16, при цьому згаданий полінуклеотид не містить (HT2 або HT3) молекулярний маркер (алель) PZE-108094590 і/або PZE-108096610.

30 19. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-16, при цьому згаданий полінуклеотид не містить (HT2 або HT3) молекулярний маркер (алель) PZE-108094590 і/або PZE-108096610.

20. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-16, при цьому згаданий полінуклеотид не містить (HT2 або HT3) молекулярний маркер (алель) MA0043 і/або MA0025.

35 21. Спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, переважно рослини кукурудзи або частини рослини, що має (підвищену) стійкість і/або толерантність до патогену, переважно, при цьому, згаданим патогеном є *Exserohilumturcicum*, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію будь-якого щонайменше одного молекулярного маркера (алелю) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 і MA0064, і необов'язково PZE-108095339 і/або Affx-91328160 (що міститься в хромосомному інтервалі хромосоми кукурудзи 8 між молекулярними маркерами PZE-108092843 та PZA-003182005) у рослині кукурудзи або частини рослини.

45 22. Спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, переважно рослини кукурудзи або частини рослини, що має (підвищену) стійкість і/або толерантність до патогену, переважно, при цьому, згаданим патогеном є *Exserohilumturcicum*, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію будь-яких щонайменше двох молекулярних маркерів (алелів) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 і MA0064, і необов'язково PZE-108095339 і/або Affx-91328160 (що містяться в хромосомному інтервалі хромосоми кукурудзи 8 між молекулярними маркерами PZE-108092843 та PZA-003182005) у рослині кукурудзи або частини рослини.

50 23. Спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, переважно рослини кукурудзи або частини рослини, що має (підвищену) стійкість і/або толерантність до патогену, переважно, при цьому, згаданим патогеном є *Exserohilumturcicum*, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію будь-яких щонайменше трьох молекулярних маркерів (алелів) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 і MA0064, і необов'язково PZE-108095339 і/або Affx-91328160 (що містяться в хромосомному інтервалі хромосоми кукурудзи 8 між молекулярними маркерами PZE-108092843 та PZA-003182005) у рослині кукурудзи або частини рослини.

60 24. Спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, переважно рослини кукурудзи або частини рослини, що має (підвищену) стійкість і/або толерантність до патогену, переважно, при цьому, згаданим патогеном є *Exserohilumturcicum*, що містить скринінг на

присутність, виявлення або ідентифікацію будь-яких щонайменше чотирьох молекулярних маркерів (алелів) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064 і необов'язково PZE-108095339 і/або Affx-91328160 (що містяться в хромосомному інтервалі хромосоми кукурудзи 8 між молекулярними маркерами PZE-108092843 та PZA-003182005) у рослині кукурудзи або частини рослини.

25. Спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, переважно рослини кукурудзи або частини рослини, що має (підвищену) стійкість і/або толерантність до патогену, переважно, при цьому, згаданим патогеном є *Exserohilum turcicum*, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію будь-яких щонайменше п'яти молекулярних маркерів (алелів) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064 і необов'язково PZE-108095339 і/або Affx-91328160 (що містяться в хромосомному інтервалі хромосоми кукурудзи 8 між молекулярними маркерами PZE-108092843 та PZA-003182005) у рослині кукурудзи або частини рослини.

26. Спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, переважно рослини кукурудзи або частини рослини, що має (підвищену) стійкість і/або толерантність до патогену, переважно, при цьому, згаданим патогеном є *Exserohilum turcicum*, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію молекулярного маркера (алелю) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064 і необов'язково PZE-108095339 і/або Affx-91328160 (що містяться в хромосомному інтервалі хромосоми кукурудзи 8 між молекулярними маркерами PZE-108092843 та PZA-003182005) у рослині кукурудзи або частини рослини.

27. Спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, переважно рослини кукурудзи або частини рослини, що має (підвищену) стійкість і/або толерантність до патогену, переважно, при цьому, згаданим патогеном є *Exserohilum turcicum*, що містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію молекулярного маркера (алелю) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064 (що містяться в хромосомному інтервалі хромосоми кукурудзи 8 між молекулярними маркерами PZE-108092843 та PZA-003182005) у рослині кукурудзи або частини рослини.

28. Спосіб за будь-яким із тверджень 21-27, що додатково містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію молекулярного маркера (алелю) PZE-108092843 і/або PZA-003182005.

29. Спосіб за будь-яким із тверджень 21-27, що додатково містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію молекулярного маркера (алелю) PZE-108094590 і/або PZA-108096610.

30. Спосіб за будь-яким із тверджень 21-27, що додатково містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію молекулярного маркера (алелю) PZE-108094590 і/або PZA-108096469.

31. Спосіб за будь-яким із тверджень 21-27, що додатково містить скринінг на присутність, виявлення або ідентифікацію молекулярного маркера (алелю) MA0043 і/або MA0025.

32. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-31, що додатково містить етап ідентифікації та необов'язково відбору згаданої рослини або частини рослини, якщо присутній згаданий щонайменше один, щонайменше два, щонайменше три, щонайменше чотири, щонайменше п'ять молекулярних маркерів (алелів) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064 і необов'язково PZE-108095339 і/або Affx-91328160.

33. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-31, що додатково містить етап ідентифікації та необов'язково відбору згаданої рослини або частини рослини, якщо відсутній молекулярний маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005, PZE-108092843 і/або PZA-003182005, PZE-108094590 і/або PZE-108096469, і/або MA0043 і/або MA0025.

34. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-33, при цьому:

- MA0045 являє собою SNP, який являє собою А у положенні, що відповідає положенню 156,789,751 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0062 являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,772,431 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0063 являє собою SNP, який являє собою Т у положенні, що відповідає положенню 156,543,061 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0070 являє собою SNP, який являє собою Т у положенні, що відповідає положенню 156,694,565 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0071 являє собою SNP, який являє собою С у положенні, що відповідає положенню 156,694,641 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0064 являє собою SNP, який являє собою С у положенні, що відповідає положенню 156,541,890 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- PZE-108095339 являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,378,424 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- Affx-91328160 являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,372,823 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- 5 - PZE-108092843, який являє собою SNP, який являє собою C у положенні, що відповідає положенню 154,456,106 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- PZE-108094590, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 155,860,812 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- 10 - MA0043, який являє собою SNP, який являє собою A у положенні, що відповідає положенню 155,999,733 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- MA0025, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,967,599 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- PZE-108096469, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 157,266,475 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- 15 - PZE-108096610 являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 157,375,673 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- PZA-003182005, який являє собою SNP, який являє собою A у положенні, що відповідає положенню 158,167,578 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4.
- 35. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-34, який являє собою спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, що має (підвищену) стійкість до патогену.
- 20 36. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-35, який являє собою спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, що має (підвищену) стійкість до грибкового патогену.
- 37. Спосіб за будь-яким з тверджень 35-36, при цьому, згаданий патоген являє собою *Exserohilum* sp.
- 25 38. Спосіб за будь-яким з тверджень 35-37, при цьому, згаданий патоген являє собою *Exserohilum turcicum*.
- 39. Спосіб за будь-яким з тверджень 35-37, при цьому, згаданий патоген являє собою *Exserohilum turcicum*, що викликає NCLB.
- 40. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-39, який являє собою спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, що має (підвищену) стійкість до Гельмінтоспоріозної плямистості листя кукурудзи (NCLB).
- 30 41. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-40, який являє собою спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, що містить (фрагмент а, переважно RLK1, що містить фрагмент а) алель HT2 або HT3.
- 35 42. Спосіб генерування рослини кукурудзи, переважно рослини кукурудзи, що має підвищену стійкість і/або толерантність до патогену, або його частини, переважно, при цьому згаданий патоген являє собою *Exserohilum turcicum*, що містить введення в геном рослини або частини рослини полінуклеїнової кислоти, як це визначено у будь-якому з тверджень 1-41.
- 40 43. Спосіб генерування рослини кукурудзи або частини рослини, що містить введення в геном рослини кукурудзи або частини рослини полінуклеїнової кислоти, що містить (фрагмент а, переважно RLK1, що містить фрагмент а) алель HT2 або HT3, який фланкований молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005 або його фрагмент, що містить ген RLK1 і щонайменше один молекулярний маркер (алель) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064 і необов'язково PZE-108095339, і/або Affx-91328160.
- 45 44. Спосіб генерування рослини кукурудзи або частини рослини, що містить введення в геном рослини кукурудзи або частини рослини полінуклеїнової кислоти, що містить (фрагмент а, переважно RLK1, що містить фрагмент а) алель HT2 або HT3, який фланкований молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005 або його фрагмент, що містить ген RLK1 і щонайменше два молекулярних маркера (алелю) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064 і необов'язково PZE-108095339, і/або Affx-91328160.
- 50 45. Спосіб генерування рослини кукурудзи або частини рослини, що містить введення в геном рослини кукурудзи або частини рослини полінуклеїнової кислоти, що містить (фрагмент а, переважно RLK1, що містить фрагмент а) алель HT2 або HT3, який фланкований молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005 або його фрагмент, що містить ген RLK1 і щонайменше три молекулярних маркера (алелю) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064 і необов'язково PZE-108095339, і/або Affx-91328160.
- 55 46. Спосіб генерування рослини кукурудзи або частини рослини, що містить введення в геном рослини кукурудзи або частини рослини полінуклеїнової кислоти, що містить (фрагмент а, переважно RLK1, що містить фрагмент а) алель HT2 або HT3, який фланкований молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005 або його фрагмент, що містить ген
- 60

RLK1 і щонайменше чотири молекулярних маркера (алелю) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064 і необов'язково PZE-108095339, і/або Affx-91328160.

47. Спосіб генерування рослини кукурудзи або частини рослини, що містить введення в геном рослини кукурудзи або частини рослини полінуклеїнової кислоти, що містить (фрагмент а, переважно RLK1, що містить фрагмент а) алель HT2 або HT3, який фланкований молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005 або його фрагмент, що містить ген RLK1 і щонайменше п'ять молекулярних маркерів (алелів) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064 і необов'язково PZE-108095339, і/або Affx-91328160.

48. Спосіб генерування рослини кукурудзи або частини рослини, що містить введення в геном рослини кукурудзи або частини рослини полінуклеїнової кислоти, що містить (фрагмент а, переважно RLK1, що містить фрагмент а) алель HT2 або HT3, який фланкований молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005 або його фрагмент, що містить ген RLK1 і молекулярний маркер (алель) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064 і необов'язково PZE-108095339, і/або Affx-91328160.

49. Спосіб за будь-яким із тверджень 42-48, при цьому, згадана полінуклеїнова кислота не містить щонайменше жодного (HT2 або HT3) молекулярного маркера (алелю) PZE-108092843, PZA-003182005, PZE-108094590, PZE-108096610, PZE-108096469, MA0043 та MA0025.

50. Спосіб за будь-яким із тверджень 42-49, при цьому згадана полінуклеїнова кислота не містить (HT2 або HT3) молекулярних маркерів (алелів) PZE-108092843 і/або PZA-003182005.

51. Спосіб за будь-яким із тверджень 42-49, при цьому згаданий полінуклеотид не містить (HT2 або HT3) молекулярних маркерів (алелів) PZE-108094590 і/або PZE-108096610.

52. Спосіб за будь-яким із тверджень 42-49, при цьому згаданий полінуклеотид не містить (HT2 або HT3) молекулярних маркерів (алелів) PZE-108094590 і/або PZA-108096469.

53. Спосіб за будь-яким із тверджень 42-49, при цьому згаданий полінуклеотид не містить (HT2 або HT3) молекулярних маркерів (алелів) MA0043 і/або MA0025.

54. Спосіб за будь-яким із тверджень 42-53, при цьому введення в геном містить трансгенез.

55. Спосіб за будь-яким із тверджень 42-53, при цьому введення в геном містить інтрогресію.

56. Спосіб за будь-яким із тверджень 42-55, що містить трансформацію рослини або частини рослини, переважно рослинної клітини, більш переважно протопласту, за допомогою полінуклеїнової кислоти, як визначено в будь-якому із тверджень 1-41, і необов'язково регенерацію рослини зі згаданої рослинної клітини, переважно протопласту.

57. Спосіб за будь-яким із тверджень 42-56, при цьому згадана полінуклеїнова кислота, яку вводять, має іншу послідовність, ніж відповідна полінуклеїнова кислота рослини.

58. Спосіб генерування рослини кукурудзи або частини рослини, переважно рослини кукурудзи або частини рослини, що має підвищену стійкість і/або толерантність до патогену, переважно, при цьому згаданим патогеном є *Exserohilum turcicum*, що містить (а) надання першої рослини кукурудзи, ідентифікованої згідно з будь-яким із тверджень 1-40, або згенерованої згідно з будь-яким із тверджень 41-45, (b) схрещування згаданої першої рослини кукурудзи з другою рослиною кукурудзи, (c) відбір рослин-нащадків, що містять згадану полінуклеїнову кислоту, будь-який щонайменше один молекулярний маркер (алель) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064, PZE-108095339 та Affx-91328160; та необов'язково (d) збирання згаданої частини рослини кукурудзи зі згаданих нащадків.

59. Спосіб за будь-яким із тверджень 42-58, при цьому згадана рослина або частина рослини має підвищену стійкість і/або толерантність до патогену.

60. Спосіб за твердженням 59, при цьому згаданий патоген являє собою гриб, який переважно викликає гельмінтоспориозну плямистість листя кукурудзи.

61. Спосіб за будь-яким із тверджень 59-60, при цьому згаданий патоген являє собою *Exserohilum* sp.

62. Спосіб за будь-яким із тверджень 59-61, при цьому згаданий патоген являє собою *Exserohilum turcicum*.

63. Спосіб за будь-яким із тверджень 59-62, при цьому згаданий патоген являє собою *Exserohilum turcicum*, що викликає NCLB.

64. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-63, при цьому згадана частина рослини являє собою клітину, тканину або орган.

65. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-64, при цьому згадана частина рослини являє собою протопласт.

66. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-64, при цьому згадана частина рослини являє собою насіння.

67. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-64, при цьому згадана полінуклеїнова кислота або молекулярний маркер (алель) є гомозиготним.

68. Спосіб за будь-яким із тверджень 1-66, при цьому згадана полінуклеїнова кислота або молекулярний маркер (алель) є гетерозиготним.

69. (Виділена) полінуклеїнова кислота, що містить фрагмент геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005, і
5 містить щонайменше один маркер (алель), обраний з MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064, PZE-108095339 і/або Affx-91328160, його комплемент або зворотний комплемент.

70. (Виділена) Полінуклеїнова кислота, що містить фрагмент геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 та PZA-003182005, та
10 містить маркер (алель) MA0045, його комплемент або зворотний комплімент.

71. (Виділена) Полінуклеїнова кислота, що містить фрагмент геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 та PZA-003182005, та містить маркер (алель) MA0062, його комплемент або зворотний комплімент.

72. (Виділена) Полінуклеїнова кислота, що містить фрагмент геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 та PZA-003182005, та
15 містить маркер (алель) MA0063, його комплемент або зворотний комплімент.

73. (Виділена) Полінуклеїнова кислота, що містить фрагмент геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 та PZA-003182005, та містить маркер (алель) MA0070, його комплемент або зворотний комплімент.

74. (Виділена) Полінуклеїнова кислота, що містить фрагмент геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 та PZA-003182005, та
20 містить маркер (алель) MA0071, його комплемент або зворотний комплімент.

75. (Виділена) Полінуклеїнова кислота, що містить фрагмент геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 та PZA-003182005, та
25 містить маркер (алель) MA0064, його комплемент або зворотний комплімент.

76. (Виділена) Полінуклеїнова кислота, що містить фрагмент геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 та PZA-003182005, та містить маркер (алель) PZE-108095339, його комплемент або зворотний комплімент.

77. (Виділена) Полінуклеїнова кислота, що містить фрагмент геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 та PZA-003182005, та
30 містить маркер (алель) Affx-91328160, його комплемент або зворотний комплімент.

78. (Виділена) полінуклеїнова кислота, що містить молекулярний маркер (алель), обраний із MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064, PZE-108095339 і/або Affx-91328160, його комплемент або зворотний комплімент.

79. (Виділена) полінуклеїнова кислота, що містить молекулярний маркер (алель) MA0045, його комплемент або зворотний комплемент.

80. (Виділена) полінуклеїнова кислота, що містить молекулярний маркер (алель) MA0062, його комплемент або зворотний комплемент.

81. (Виділена) полінуклеїнова кислота, що містить молекулярний маркер (алель) MA0063, його комплемент або зворотний комплемент.

82. (Виділена) полінуклеїнова кислота, що містить молекулярний маркер (алель) MA0070, його комплемент або зворотний комплемент.

83. (Виділена) полінуклеїнова кислота, що містить молекулярний маркер (алель) MA0071, його комплемент або зворотний комплемент.

84. (Виділена) полінуклеїнова кислота, що містить молекулярний маркер (алель) MA0064, його комплемент або зворотний комплемент.

85. (Виділена) полінуклеїнова кислота, що містить молекулярний маркер (алель) PZE-108095339, його комплемент або зворотний комплемент.

86. (Виділена) полінуклеїнова кислота, що містить молекулярний маркер (алель) Affx-91328160, його комплемент або зворотний комплемент.

87. (Виділена) полінуклеїнова кислота, здатна специфічно гібридизуватися з полінуклеїновою кислотою за будь-яким із тверджень 69-86.

88. (Виділений) полінуклеотид за будь-яким із тверджень 69-87, при цьому згаданий полінуклеотид має довжину від 15 до 500 нуклеотидів, переважно від 15 до 100 нуклеотидів, переважно від 15 до 50 нуклеотидів, більш переважно від 15 до 35 нуклеотидів.

89. (Виділений) полінуклеотид за будь-яким із тверджень 69-88, при цьому згаданий полінуклеотид являє собою праймер або зонд.

90. (Виділений) полінуклеотид за будь-яким із тверджень 69-89, при цьому згаданий полінуклеотид являє собою алель-специфічний праймер або зонд.

91. (Виділений) полінуклеотид за твердженням 90, при цьому згаданий полінуклеотид являє собою праймер KASP.

92. (Виділений) полінуклеотид за будь-яким із тверджень 78-91, що містить фрагмент геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005, і що містить щонайменше один маркер (алель), обраний із MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064, PZE-108095339 і/або Affx-91328160, його комплемент або зворотний комплемент.

93. Набір праймерів, здатних ампліфікувати полінуклеотид, що містить молекулярний маркер, обраний з MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064, PZE-108095339 або Affx-91328160.

94. Рослина кукурудзи, переважно рослина кукурудзи, що має (підвищену) стійкість і/або толерантність до патогену, переважно, при цьому згаданий патоген являє собою *Exserohilum turcicum*, одержуваний способом за будь-яким із тверджень 42-68, або його рослинна частина, або його нащадки.

95. Рослина кукурудзи, переважно рослина кукурудзи, що має підвищену стійкість і/або толерантність до патогену, переважно, при цьому згаданий патоген являє собою *Exserohilum turcicum*, що містить полінуклеїнову кислоту або щонайменше один молекулярний маркер (алель), як визначено у будь-якому із тверджень 1-41.

96. Рослина кукурудзи або частина рослини, що містить будь-який щонайменше один алель молекулярного маркера MA0045, MA0062, MA0070, MA0071, необов'язково MA0063 і MA0064, що відрізняється тим, що

- MA0045 являє собою SNP, який являє собою А у положенні, що відповідає положенню 156,789,751 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0062 являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,772,431 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0063 являє собою SNP, який являє собою Т у положенні, що відповідає положенню 156,543,061 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0070 являє собою SNP, який являє собою Т у положенні, що відповідає положенню 156,694,565 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0071 являє собою SNP, який являє собою С у положенні, що відповідає положенню 156,694,641 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0064 являє собою SNP, який являє собою С у положенні, що відповідає положенню 156,541,890 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4; та необов'язково

- MA0021, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,535,845 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4; і/або

- MA0035, який являє собою SNP, який являє собою А у положенні, що відповідає положенню 156,542,253 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4.

97. Рослина кукурудзи або частина рослини, що містить будь-які щонайменше два алелі молекулярного маркера MA0045, MA0062, MA0063 та MA0064, при цьому

- MA0045 являє собою SNP, який являє собою А у положенні, що відповідає положенню 156,789,751 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0062 являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,772,431 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0063 являє собою SNP, який являє собою Т у положенні, що відповідає положенню 156,543,061 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0070 являє собою SNP, який являє собою Т у положенні, що відповідає положенню 156,694,565 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0071 являє собою SNP, який являє собою С у положенні, що відповідає положенню 156,694,641 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0064 являє собою SNP, який являє собою С у положенні, що відповідає положенню 156,541,890 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4.

98. Рослина або частина рослини кукурудзи, що містить будь-які щонайменше три, переважно будь-які щонайменше чотири, переважно будь-які щонайменше п'ять, найбільш переважно всі алелі молекулярних маркерів MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 та MA0064, при цьому

- MA0045 являє собою SNP, який являє собою А у положенні, що відповідає положенню 156,789,751 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0062 являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,772,431 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0063 являє собою SNP, який являє собою Т у положенні, що відповідає положенню 156,543,061 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- MA0070 являє собою SNP, який являє собою Т у положенні, що відповідає положенню 156,694,565 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- 5 - MA0071 являє собою SNP, який являє собою С у положенні, що відповідає положенню 156,694,641 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- MA0064 являє собою SNP, який являє собою С у положенні, що відповідає положенню 156,541,890 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4.
- 99. Рослина кукурудзи або частина рослини, що містить алелі молекулярних маркерів
- 10 MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 та MA0064, при цьому
 - MA0045 являє собою SNP, який являє собою А у положенні, що відповідає положенню 156,789,751 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 - MA0062 являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,772,431 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 - 15 - MA0063 являє собою SNP, який являє собою Т у положенні, що відповідає положенню 156,543,061 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 - MA0070 являє собою SNP, який являє собою Т у положенні, що відповідає положенню 156,694,565 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 - MA0071 являє собою SNP, який являє собою С у положенні, що відповідає положенню
 - 20 156,694,641 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 - MA0064 являє собою SNP, який являє собою С у положенні, що відповідає положенню 156,541,890 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4.
- 100. Рослина кукурудзи або частина рослини за будь-яким із тверджень 96-99, додатково містить алель молекулярного маркера PZE-108095339, при цьому PZE-108095339 являє собою
- 25 SNP, який являє собою G в положенні, що відповідає положенню 156,378,424 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4.
- 101. Рослина кукурудзи або частина рослини за будь-яким із тверджень 96-100, що додатково містить алель молекулярного маркера Affx-91328160, при цьому, Affx-91328160 являє собою SNP, який являє собою G в положенні, що відповідає положенню 156,372,823 п.о.
- 30 хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4.
- 102. Рослина кукурудзи або частина рослини за будь-яким із тверджень 96-101, при цьому згадана рослина або частина рослини не містить (HT2 або HT3) алель молекулярного маркера PZE-108092843 і/або PZA-003182005, при цьому
 - PZE-108092843, який являє собою SNP, який являє собою С у положенні, що відповідає
 - 35 положенню 154,456,106 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 - PZA-003182005, який являє собою SNP, який являє собою А у положенні, що відповідає положенню 158,167,578 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4.
- 103. Рослина кукурудзи або частина рослини за будь-яким із тверджень 96-102, при цьому згадана рослина або частина рослини не містить (HT2 або HT3) алель молекулярного маркера
- 40 PZE-108094590 і/або PZA-108096610, при цьому
 - PZE-108094590, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 155,860,812 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 - PZE-108096610 являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 157,375,673 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4.
- 45 104. Рослина кукурудзи або частина рослини за будь-яким із тверджень 96-103, при цьому згадана рослина або частина рослини не містить (HT2 або HT3) алель молекулярного маркера PZE-108094590 і/або PZA-108096469, при цьому
 - PZE-108094590, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 155,860,812 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 - 50 - PZE-108096469 являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 157,266,475 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- 105. Рослина кукурудзи або частина рослини за будь-яким із тверджень 96-104, при цьому згадана рослина або частина рослини не містить (HT2 або HT3) алель молекулярного маркера MA0043 і/або MA0025, при цьому
- 55 - MA0043, який являє собою SNP, який являє собою А у положенні, що відповідає положенню 155,999,733 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- MA0025 являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,967,599 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- 106. Рослина кукурудзи або частина рослини за будь-яким із тверджень 94-105, яка є
- 60 трансгенною, з редагованими генами або піддана мутагенезу.

107. Спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, що містить:

- схрещування першої рослини кукурудзи за будь-яким із тверджень 94-106 з другою рослиною кукурудзи

5 - ідентифікація потомства рослини кукурудзи або частини рослини за допомогою способу за будь-яким із тверджень 1-41.

108. Спосіб боротьби із зараженістю патогеном рослини кукурудзи (популяції), що містить
а) Надання (а) рослини (рослин) кукурудзи за будь-яким із тверджень 94-106 або вирощування з насіння (а) рослини (рослин) кукурудзи за будь-яким із тверджень 94-106,

б) Культивування рослини (рослин) за пунктом а) за умов зараження патогеном.

109. Спосіб за твердженням 108, при цьому зараженість патогеном знижується.

110. Спосіб за твердженням 108 або 109, при цьому симптоми патогену зменшуються.

111. Спосіб за будь-яким із тверджень 108-110, при цьому згадані умови зараженості патогеном містять присутність патогену.

112. Спосіб за будь-яким із тверджень 108-111, при цьому згаданий патоген є грибом.

15 113. Спосіб за будь-яким з тверджень 108-112, при цьому згаданий патоген являє собою *Exserohilum* sp.

114. Спосіб за будь-яким з тверджень 108-113, при цьому згаданий патоген являє собою *Exserohilum turcicum*.

20 115. Спосіб за будь-яким з тверджень 108-114, при цьому згаданий патоген являє собою *Exserohilum turcicum*, що викликає NCLB.

116. Використання поліуклеїнової кислоти за будь-яким із тверджень 1-41 або 69-87 для генерування рослини кукурудзи або частини рослини.

25 117. Використання поліуклеїнової кислоти за твердженням 116 для генерування рослини кукурудзи, що має (підвищену) стійкість і/або толерантність до патогену, або для надання або підвищення стійкості і/або толерантності до патогену рослини кукурудзи або її частини.

118. Використання поліуклеїнової кислоти за будь-яким з тверджень 1-41 або 69-92 або пари праймерів за твердженням 93 для ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини.

119. Використання за твердженням 118 для ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, що має (підвищену) стійкість і/або толерантність до патогену.

30 120. Використання рослини кукурудзи за будь-яким із тверджень 94-106 для боротьби із зараженістю патогенами рослини кукурудзи (популяції).

121. Використання рослини кукурудзи за будь-яким із тверджень 94-106 для збільшення врожайності (потенціалу) рослини, переважно в умовах зараженості патогеном.

35 122. Використання за твердженням 121, при цьому врожайність являє собою біомасу або врожайність насіння.

123. Використання за твердженням 122, при цьому згадана біомаса являє собою біомасу цілої рослини або біомасу частини рослини.

124. Використання за твердженням 123, при цьому згадана частина рослини являє собою тканину, орган, плід або насіння.

40 125. Використання за будь-яким із тверджень 116-124, при цьому згадана рослина кукурудзи або частина рослини має (підвищену) стійкість до NCLB.

126. Використання за будь-яким із тверджень 116-125, при цьому згадана рослина кукурудзи або частина рослини має (підвищену) стійкість до *Exserohilum* sp.

45 127. Використання за будь-яким із тверджень 116-126, при цьому згадана рослина кукурудзи або частина рослини має (підвищену) стійкість до *Exserohilum turcicum*.

128. Використання за будь-яким із тверджень 116-127, при цьому згадана рослина кукурудзи або частина рослини має (підвищену) стійкість до *Exserohilum turcicum*, що викликає NCLB.

50 129. (Виділений) поліуклеотид за будь-яким із тверджень 69-92, що містить, що складається по суті або складається з послідовності будь-якого з SEQ ID NO: 4-51 або їхніх фрагментів, переважно фрагментів, що містять щонайменше 15 найбільш 3' суміжних їхніх нуклеотидів, їхній комплемент чи зворотний комплімент.

130. (Виділений) поліуклеотид за будь-яким із тверджень 69-92, що містить, що складається по суті або складається з послідовності SEQ ID NO: 4-22 або їхніх фрагментів, переважно фрагментів, що містять щонайменше 15 найбільш 3' суміжних їхніх нуклеотидів, їхній комплемент чи зворотний комплімент.

55 131. (Виділений) поліуклеотид за будь-яким із тверджень 69-92, що містить, що складається по суті або складається з послідовності SEQ ID NO: 5 або 23, або їхніх фрагментів, переважно фрагментів, що містять щонайменше 15 найбільш 3' суміжних їхніх нуклеотидів, їхній комплемент чи зворотний комплімент.

- R у положенні 21 SEQ ID NO: 53, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотиду;

- Y у положенні 21 SEQ ID NO: 54, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотиду;

5 - Y у положенні 21 SEQ ID NO: 55, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотиду;

- K у положенні 21 SEQ ID NO: 56, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотиду;

10 - M у положенні 21 SEQ ID NO: 57, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотиду;

- K у положенні 31 SEQ ID NO: 58, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотиду; або

- Y у положенні 31 SEQ ID NO: 59, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотиду.

15 156. (Виділений) полінуклеотид, що містить, що складається по суті, що складається або складається з послідовності будь-якого SEQ ID NO: 52-59, або його (унікального) фрагмента, переважно щонайменше з 15, більш переважно щонайменше з 18 суміжних нуклеотидів, їхнього комплементу або зворотного комплементу.

157. Виділений полінуклеотид за твердженням 156, що містить щонайменше

20 - R у положенні 21 SEQ ID NO: 52, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотиду;

- R у положенні 21 SEQ ID NO: 53, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотиду;

25 - Y у положенні 21 SEQ ID NO: 54, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотиду;

- Y у положенні 21 SEQ ID NO: 55, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотиду;

- K у положенні 21 SEQ ID NO: 56, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотиду;

30 - M у положенні 21 SEQ ID NO: 57, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотиду;

- K у положенні 31 SEQ ID NO: 58, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотиду; або

35 - Y у положенні 31 SEQ ID NO: 59, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотиду.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

Фігура 1: Фізична карта положень маркерів з посиланням на положення маркерів AGPv04.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

40 Перш ніж описувати цю систему і спосіб цього винаходу, слід розуміти, що цей винахід не обмежується конкретними описаними системами і способами або комбінаціями, оскільки такі системи, способи і комбінації можуть, звичайно, варіюватися. Також слід розуміти, що термінологія, яка використовується в цьому документі, не є обмежувальною, оскільки обсяг цього винаходу буде обмежений тільки доданою формулою винаходу.

45 Використовувані в цьому документі форми однини включають як однину, так і множину, якщо з контексту явно не випливає інше.

50 Терміни "що містить", "містить" і "що складається з", використовувані в цьому документі, є синонімами "що включає", "включає" або "що містить", "містить", і є всеосяжними або не обмежувальними і не виключають додаткових, не перерахованих членів, елементів або етапів способу. Слід розуміти, що терміни "що містить", "містить" і "складається з", використовувані в цьому документі, містять терміни "що складається з", "складається" і "складається з", а також терміни "що складається по суті з", "складається по суті" і "складається по суті з".

Перерахування числових діапазонів кінцевих точок включає всі числа і дробі, включені у відповідні діапазони, а також перераховані кінцеві точки.

55 Термін "примірно" або "приблизно", який використовується в цьому документі, якщо він стосується вимірюваного значення, такого як параметр, величина, тривалість за часом і т. ін., призначений для охоплення варіацій +/-20 % або менше, переважно +/-10 % або менше, більш переважно +/-5 % або менше і ще більш переважно +/-1 % або менше від зазначеного значення, оскільки такі варіації доречні для здійснення в розкритому винаході. Слід розуміти, що значення, якого стосується модифікатор "примірно" або "приблизно", саме по собі також конкретно і

60 переважно розкрито.

Беручи до уваги, що термін "щонайменше один", такий як, щонайменше один член групи членів, зрозумілий per se, за допомогою подальшого пояснення, термін охоплює, серед іншого, посилання на будь-який зі згаданих членів, або на будь-які, щонайменше на два зі згаданих члена, таких як, наприклад, будь-який ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 або ≥ 7 тощо зі згаданих членів, і аж до всіх згаданих членів.

Всі посилання, наведені в цьому описі, цим включені за допомогою посилання в повному обсязі. Зокрема, ідеї всіх посилань, на які конкретно посилаються в цьому документі, включені за допомогою посилання.

Якщо не визначено інше, всі терміни, які використовуються при розкритті цього винаходу, включно з технічними та науковими термінами, мають значення, яке зазвичай зрозуміло фахівцям середньої кваліфікації в цій галузі техніки, якої стосується цей винахід. Як додаткове роз'яснення, включені визначення термінів для кращого розуміння суті цього винаходу.

Авторитетні довідники, що викладають загальні принципи технології рекомбінантної ДНК, включають молекулярне клонування: [Лабораторний посібник, 2-е вид., т. 1-3, вид. Сэмбрук і співавт., Laboratory Press, Колд-Спрінг-Харбор, Нью-Йорк, 1989; Поточні протоколи в молекулярній біології, вид. Осубель і співавт., Green Publishing and Wiley-Interscience, Нью-Йорк, 1992 (з періодичними оновленнями) ("Осубель і співавт. 1992"); серія "Методи в ензимології" (Academic Press, Inc.); Інніс і співавт., Протоколи ПЛР: Посібник з методів і практичний посібник, Academic Press: Сан-Дієго, 1990; ПЛР 2: практичний підхід (під ред. М.Дж. Макферсона, Б.Д. Хеймса і Г. Р. Тейлора (1995); під ред. Харлоу і Лейна (1988) Антитіла, Лабораторний посібник; і Культура клітин тварин (Р. І. Фрешні, вид. (1987). Загальні принципи мікробіології викладені, наприклад, в роботі Девіс Б.Д. і співавт., Microbiology, 3-е видання, Harper & Row, publishers, Філадельфія, Пенсільванія (1980)].

У наступних уривках різні аспекти цього винаходу визначені більш докладно. Кожен аспект, визначений таким чином, може бути об'єднаний з будь-яким іншим аспектом або аспектами, якщо явно не зазначено зворотне. Зокрема, будь-яка ознака, зазначена як краща, або що має перевагу, може бути об'єднана з будь-якою іншою ознакою або ознаками, зазначеними як кращі або що мають перевагу.

Посилання у всьому цьому описі на "один варіант здійснення цього винаходу" або "варіант здійснення цього винаходу" означає, що конкретна ознака, структура або характеристика, описані в зв'язку з цим варіантом здійснення цього винаходу, включена щонайменше в один варіант здійснення цього винаходу. Отже, фрази "в одному варіанті здійснення цього винаходу" або "у варіанті здійснення цього винаходу" в різних місцях всього цього опису необов'язково всі стосуються одного і того ж варіанту здійснення цього винаходу, але можуть. Крім того, конкретні ознаки, структури або характеристики можуть бути об'єднані будь-яким придатним чином, як це було б очевидно фахівцям в цій галузі техніки з цього винаходу, щонайменше в одному або декількох варіантах здійснення цього винаходу. Крім того, в той час як деякі варіанти здійснення цього винаходу, описані в цьому документі, включають деякі, але не інші ознаки, включені в інші варіанти здійснення цього винаходу, мається на увазі, що комбінації ознак різних варіантів здійснення цього винаходу входять в обсяг цього винаходу і утворюють різні варіанти його здійснення, як це було б зрозуміло фахівцям в цій галузі техніки. Наприклад, в доданій формулі винаходу будь-який із заявлених варіантів здійснення цього винаходу може бути використаний в будь-якої комбінації.

У наступному докладному описі цього винаходу наводиться посилання на супровідні креслення, які є частиною цього документа, і на яких показані як ілюстрації тільки конкретні варіанти здійснення, в яких цей винахід може бути реалізований. Слід розуміти, що можуть бути використані й інші варіанти здійснення цього винаходу, і можуть бути внесені структурні або логічні зміни, не виходячи за рамки цього винаходу. Отже, наступний докладний опис не слід сприймати в обмежувальному сенсі, і обсяг цього винаходу визначається доданою формулою винаходу.

Кращі твердження (ознаки) і варіанти здійснення цього винаходу викладені в цьому документі нижче. Кожне твердження і варіанти здійснення цього винаходу, визначені таким чином, можуть бути об'єднані з будь-яким іншим твердженням і/або варіантами здійснення, якщо явно не зазначено зворотне. Зокрема, будь-яка ознака, зазначена як краща або що має перевагу, може бути об'єднана з будь-якою іншою ознакою або ознаками, або твердженнями, зазначеними як кращі або що мають перевагу.

В одному аспекті, цей винахід стосується способу ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, що містить скринінг на присутність або виявлення, або ідентифікацію полінуклеїнової кислоти, що містить будь-який щонайменше один, щонайменше два, щонайменше три, або всі молекулярні маркери, або (НТ2/НТ3) алелі молекулярних маркерів,

обраних з MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 та MA0064, необов'язково додатковий молекулярний маркер (алель) PZE-108095339 і/або Affx-91328160. Конкретні відповідні комбінації маркерних алелів описані в цьому документі в іншому місці.

В одному аспекті, цей винахід стосується способу ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, що містить скринінг на присутність або виявлення, або ідентифікацію будь-якого щонайменше одного, щонайменше двох, щонайменше трьох, або всіх молекулярних маркерів, або (HT2/HT3) алелів молекулярних маркерів, обраних з MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 та MA0064, необов'язково додаткового молекулярного маркера (алеля) PZE-108095339 і/або Affx-91328160. Конкретні відповідні комбінації маркерних алелів описані в цьому документі в іншому місці.

Комбінація будь-якого щонайменше одного вищезгаданого маркера (маркерів) (алеля (алелів)) може бути позначена як маркерний гаплотип за цим винаходом.

Способи можуть містити скринінг зразка, отриманого з рослини кукурудзи або частини рослини, зокрема зразка, що містить геномну ДНК рослини кукурудзи або частини рослини. Відповідно, спосіб може містити етап отримання зразка (що містить геномну ДНК) з рослини кукурудзи або частини рослини, або надання зразка (що містить геномну ДНК), отриманого з рослини кукурудзи або частини рослини. Способи скринінгу або ідентифікації маркерів добре відомі в цій галузі техніки, як також описано в цьому документі в іншому місці.

Молекулярний маркер (маркери) (алель (алелі)) присутній у локусах HT2 та HT3 і розташований на хромосомі 8 *Zea mays*. Локус містить геномний інтервал, що варіюється від молекулярного маркера (алелю) PZE-108092843 до PZA-003182005. У той час, як локус може містити більший фрагмент геному, маркери PZE-108092843-PZA-003182005 визначають відповідний менший фрагмент, відповідальний за стійкість до *Exserohilum turcicum*. Відповідно, полінуклеїнова кислота, що описана в цьому документі згідно з цим винаходом, у певних варіантах здійснення відповідає (тобто, має послідовність) інтервалу хромосоми 8 *Zea mays*, фланкованому (і що включає або альтернативно виключає) молекулярним маркером (алелем) PZE-108092843 та PZA-003182005. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота, що описана в цьому документі згідно з цим винаходом, відповідає (тобто, має послідовність) інтервалу хромосоми 8 *Zea mays*, фланкованому (і що включає або альтернативно виключає) молекулярним маркером (алелем) PZE-108094590 та PZE-108096610. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота, що описана в цьому документі згідно з цим винаходом, відповідає (тобто, має послідовність) інтервалу хромосоми 8 *Zea mays*, фланкованому (і що включає або альтернативно виключає) молекулярним маркером (алелем) PZE-108094590 та PZE-108096469. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота, що описана в цьому документі згідно з цим винаходом, відповідає (тобто, має послідовність) інтервалу хромосоми 8 *Zea mays*, фланкованому (і що включає або альтернативно виключає) молекулярним маркером (алелем) MA0043 та MA0025. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота, що описана в цьому документі згідно з цим винаходом, відповідає (тобто, має послідовність) інтервалу хромосоми 8 *Zea mays*, фланкованому (і що включає або альтернативно виключає) молекулярним маркером (алелем) PZE-108092843, PZE-108094590 або MA0043 і молекулярним маркером (алелем) PZA-003182005, PZE-108096610, PZE-108096469 або MA0025. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота, що описана в цьому документі згідно з цим винаходом, відповідає (тобто, має послідовність) інтервалу хромосоми 8 *Zea mays*, фланкованому (і що включає або альтернативно виключає) молекулярним маркером (алелем) PZE-108092843 та PZE-108096610. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота, що описана в цьому документі згідно з цим винаходом, відповідає (тобто, має послідовність) інтервалу хромосоми 8 *Zea mays*, фланкованому (і що включає або альтернативно виключає) молекулярним маркером (алелем) PZE-108092843 та PZE-108096469. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота, що описана в цьому документі згідно з цим винаходом, відповідає (тобто, має послідовність) інтервалу хромосоми 8 *Zea mays*, фланкованому (і що включає або альтернативно виключає) молекулярним маркером (алелем) PZE-108094590 та PZA-003182005. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота, що описана в цьому документі згідно з цим винаходом, відповідає (тобто, має послідовність) інтервалу хромосоми 8 *Zea mays*, фланкованому (і що включає або альтернативно виключає) молекулярним маркером (алелем) PZE-108094590 та MA0025. У певних варіантах здійснення цього винаходу,

полінуклеїнова кислота, що описана в цьому документі згідно з цим винаходом, відповідає (тобто, має послідовність) інтервалу хромосоми 8 *Zea mays*, фланкованому (і що включає або альтернативно виключає) молекулярним маркером (алелем) MA0043 та PZA-003182005. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота, що описана в цьому документі згідно з цим винаходом, відповідає (тобто, має послідовність) інтервалу хромосоми 8 *Zea mays*, фланкованому (і що включає або альтернативно виключає) молекулярним маркером (алелем) PZE-108092843 та PZE-108096610. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота, що описана в цьому документі згідно з цим винаходом, відповідає (тобто, має послідовність) інтервалу хромосоми 8 *Zea mays*, фланкованому (і що включає або альтернативно виключає) молекулярним маркером (алелем) MA0043 та PZE-108096469. Відповідні полінуклеїнові кислоти згідно з цим винаходом (або рослини кукурудзи, або частини рослин згідно з цим винаходом) можуть бути ідентифіковані, наприклад, за присутності щонайменше одного (HT2 або HT3) маркера (алелю) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 та MA0064, та необов'язково молекулярного маркера (алелю) PZE-108095339 і/або Affx-91328160, та відсутності щонайменше одного (HT2 або HT3) молекулярного маркера (алелю) PZE-108092843, PZA-003182005, PZE-108094590, PZE-108096610, PZE-108096469, MA0043 і MA0025.

Молекулярний маркер (маркери) (алель (алелі)) цього винаходу може бути переважно використаний для ідентифікації рослин кукурудзи або частин рослин, зокрема, рослин кукурудзи або частин рослин, що мають стійкість або толерантність, або мають підвищену стійкість або толерантність до патогенів, зокрема до грибкових патогенів, таких як *Exserohilum turcicum*.

Молекулярний маркер (маркери) (алель (алелі)) цього винаходу може бути переважно використаний для ідентифікації рослин кукурудзи або частин рослин, що містять локус HT2, а також локус HT3, і, зокрема, алель HT2/HT3 RLK1. Алель HT2 та HT3 RLK1, наприклад, описаний у [WO2019/038326], який включений в цей документ за допомогою посилання повністю.

Кожен з цих діагностичних маркерів може бути використаний для відстеження малої донорної інтрогресії HT2 або HT3 у процесах селекції, оскільки кожен маркер є діагностичним та тісно зчеплений з геном-збудником, що надає стійкості HT2/HT3. Молекулярний маркер (маркери) (алель (алелі)) цього винаходу тісно зчеплений з геном RLK1 локусу HT2 і локусу HT3 і, отже, може бути переважно використаний для ідентифікації рослин кукурудзи або частин рослин, що містять мінімальний фрагмент алелю HT2/HT3 RLK1, при цьому рослина кукурудзи або частина рослини не містить потенційно шкідливих фланкуючих послідовностей, які негативно впливають на агрономічно значущі характеристики, такі як, наприклад, потенціал врожайності. Отже, молекулярний маркер (маркери) (алель (алелі)) цього винаходу підходять для селекції з використанням маркерів, зокрема, для того, щоб уникнути або звести до мінімуму зчеплений вантаж. Маркери забезпечують ефективнішу інтрогресію, оскільки можна легко виявити дуже сприятливу рекомбінацію. Дійсно, для активного відбору проти зчепленого вантажу, придатні маркери мають знаходитися в безпосередній близькості від ознаки, що цікавить, щоб можна було адекватно відстежувати рекомбінацію між ознакою, що цікавить (наприклад, стійкість до патогену), і її фланкуючими областями.

З [WO2015/032494] (включеного в цей документ за допомогою посилання повністю), в якому досліджувалися і використовувалися лінії інтрогресії з Htn1 з *Peritilla* (з яких геном-збудником також є RLK1), відомо, що цей локус стійкості тісно зчеплений з геномними областями, що несуть зчеплений вантаж, що призводить до негативного впливу щонайменше на одну агрономічну ознаку. Перше дослідження фланкуючої області HT2 (або HT3) показало, що цей або подібний зчеплений вантаж присутній не тільки у донора *Peritilla* для інтрогресії Htn1, але і в інших донорів для цього локусу стійкості до *Helminthosporium*, як-от A619. Крім іншого, зчеплений вантаж, як частина інтрогресії HT2 (або HT3), може вплинути на різницю в часі цвітіння, що є важливою агрономічною характеристикою. Це може безпосередньо і суттєво вплинути на потенціал врожайності рослини *Zea mays*. Затримка цвітіння зазвичай призводить до зниження врожайності. Крім того, зчеплений вантаж, що негативно впливає на потенціал врожайності, зокрема, на потенціал виходу силосу, може бути виявлений дистально і/або проксимально від локусу стійкості до *Helminthosporium* на парі основ 8.06 в *Zea mays*. Фланкуючі області, які тісно зчеплені з цим локусом стійкості, можуть бути носіями відомого зчепленого вантажу. Молекулярний маркер (маркери) (алель (алелі)) цього винаходу фланкує мінімальну область локусу HT2 або HT3, що містить ген RLK1, і може бути відповідним чином використаний для цілей відбору, а також для визначення мінімального локусу HT2 і/або HT3 для генерування рослин кукурудзи або частин рослини, в якій запобігає або зводиться до мінімуму зчеплений вантаж. Як приклад, видалення зчепленого вантажу може бути здійснено шляхом генетичної

рекомбінації під час процесу схрещування між двома рослинами кукурудзи, при цьому одна батьківська рослина кукурудзи несе локус стійкості HT2 або локус стійкості HT3. На додаток до використання традиційних методів селекції для отримання генетичної рекомбінації, результатом якої є заміна щонайменше одного з донорних інтервалів на ідентифікований вище зчеплений

вантаж з геномними послідовностями рекурентного батька, які переважно не містять небажаних генів, сучасна біотехнологія пропонує фахівцю в цій галузі техніки безліч інструментів, що дозволяють проводити точну генну інженерію. Прикладами відомих інструментів є мегануклеази [Сільва і співавт., 2011], хоумінг-ендонуклеази [Шевальєр, 2002], цинк-пальцеві нуклеази, нуклеази TALE [WO 2010/079430; WO 2011/072246] або системи CRISPR [Гай і співавт., 2013].

На додаток до вищезгаданої переваги тісного зчеплення з RLK1, процес скринінгу молекулярного маркера (маркерів) (алелю (алелів)) цього винаходу на підвищену стійкість до Гельмінтоспориозної плямистості листя кукурудзи (NCLB) тепер спрощений, і генетичний матеріал може бути підданий скринінгу HT2 або HT3 та інтрогресований з малим донорним сегментом у матеріал за допомогою відбору за допомогою маркеру (MAS). Молекулярний маркер (маркери) (алель (алелі)) цього винаходу забезпечує надійну процедуру відбору завдяки їхній відповідній унікальності та здатності розрізняти алелі стійкості та нестійкості.

Розташування молекулярного маркера (маркерів) (алелю (алелів)), описаного в цьому документі, представлено в Таблиці нижче з посиланням на хромосому 8 AGPv04 B73 еталонного геному *Zea mays*. (https://www.maizegdb.org/genome/genome_assembly/Zm-B73-REFERENCE-GRAMENE-4.0). AGPv04 використовується в цьому документі взаємозамінно з AGPv4, який також називають "Кукурудза B73 RefGen_v4". Всі маркери являють собою SNP. Також вказується нуклеотид, присутній в алелі HT2 і HT3 (тобто, алелі, що надає стійкість), а також можливий нуклеотид альтернативного алелю, відмінного від HT2/HT3 (тобто алелю, що не надає стійкість). Слід розуміти, що описані в цьому документі способи ідентифікації рослини кукурудзи, що має (підвищену) стійкість або толерантність до патогену, такого як *Helminthosporium turcicum*, включають ідентифікацію алелів молекулярних маркерів HT2 або HT3.

Таблиця: огляд маркерів HT2/HT3 на фрагменті інтрогресії. Стовець "Праймер HT2/HT3" показує алель HT2/HT3 (тобто, донорний алель), який викликається відповідним праймером KASP. "Альтернативний алель" забезпечує алелі (SNP) у джерелах, відмінних від HT2/HT3. Стовець "Альтернативний праймер" показує альтернативний алель (тобто, акцепторний алель або відмінний від HT2/HT3), який викликається відповідним праймером KASP. Слід зазначити, що викликаний алель може бути розташований на зворотному (тобто, протилежному/комплементарному ланцюгу) ланцюгу геномної ДНК, доступному в базі даних (тобто, AGPv04; https://www.maizegdb.org/genome/genome_assembly/Zm-B73-REFERENCE-GRAMENE-4.0). Наприклад, у певних варіантах здійснення цього винаходу, наприклад, для маркера Affx-91328160, "Альтернативний" праймер для виявлення альтернативного алелю (переважно алель-специфічний праймер, такий як праймер KASP) сконструйований так, щоб містити нуклеотид "Т", що відповідає положенню 156372823, і, отже, пов'язувати (тобто бути комплементарним) ланцюг відповідної геномної ДНК, як зазначено в еталонному геномі AGPv04, що містить нуклеотид "А". Аналогічним чином, праймер "HT2/HT3" для виявлення донорного алелю (переважно алель-специфічний праймер, такий як праймер KASP) сконструйований так, щоб містити нуклеотид "С", що відповідає положенню 156372823, і, отже, зв'язувати (т. бути комплементарним) ланцюг відповідної геномної ДНК, як зазначено в еталонному геномі AGPv04, що містить нуклеотид "G". З іншого боку, наприклад, для маркера PZE-108095339, "Альтернативний" праймер для виявлення альтернативного алелю (переважно алель-специфічний праймер, такий як праймер KASP) сконструйований так, щоб містити нуклеотид "А", відповідний положенню 156378424, і, отже, пов'язувати (тобто бути комплементарним) комплемент ланцюга відповідної геномної ДНК (тобто протилежного ланцюга), як зазначено в еталонному геномі AGPv04, що містить нуклеотид "Т" (у протилежному ланцюгу). Аналогічним чином, праймер "HT2/HT3" для виявлення донорного алелю (переважно алель-специфічний праймер, такий як праймер KASP) сконструйований так, щоб містити нуклеотид "G", що відповідає положенню 156378424, і, отже, зв'язувати (т. бути комплементарним) комплемент ланцюга відповідної геномної ДНК, як зазначено в еталонному геномі AGPv04, що містить нуклеотид "С" (у протилежному ланцюгу).

Назва маркера	Положення AGPv04	HT2/HT3- алель	HT2/HT3- праймер	Альтернативний алель	Альтернативний праймер
PZE-108092843	154456106	C	C	A	A
PZE-108094590	155860812	G	G	A	A
MA0043	155999733	A	T	G	C
Affx-91328160	156372823	G	G	A	A
PZE-108095325	156374083	G	G	A	A
PZE-108095339	156378424	G	C	A	T
MA0021	156535845	G	G	C	C
MA0064	156541890	C	C	T	T
MA0035	156542253	A	T	G	C
MA0063	156543061	T	A	C	G
MA0070	156694565	T	T	G	G
MA0071	156694641	C	G	T	A
MA0062	156772431	G	G	T	T
MA0045	156789751	A	A	C	C
MA0025	156967599	G	G	A	A
PZE-108096469	157266475	G	C	A	T
PZE-108096610	157375673	G	C	A	
PZA-003182005	158167578	A	A	G	

Слід розуміти, що зазначені положення нуклеотидів є положеннями нуклеотидів зазначених положень хромосоми 8 AGPv04 B73, і що положення маркерів у рослинах кукурудзи за цим винаходом відповідають зазначеним положенням маркерів, але є або містять не обов'язково ідентичні положення в іншому геномі (наприклад, в іншій раси або лінії). Фахівцю в цій галузі техніки буде зрозуміло, що відповідні положення нуклеотидів можуть бути визначені шляхом відповідного вирівнювання, як відомо у цій галузі техніки.

У певних варіантах здійснення цей винахід стосується способу ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, як-от рослина кукурудзи або частина рослини, що має (підвищену) стійкість до патогену, як описано в цьому документі в іншому місці, що містить скринінг на присутність або ідентифікацію, або виявлення щонайменше одного молекулярного маркера (алелю), як описано в цьому документі в іншому місці, при цьому рослина або частина рослини ідентифікована (як така, що має підвищену стійкість до патогену), якщо ідентифікований або виявлений щонайменше один з наступних маркерних алелів:

- MA0045, який являє собою SNP, який являє собою A у положенні, що відповідає положенню 156,789,751 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- MA0062, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,772,431 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- MA0063, який являє собою SNP, який являє собою T у положенні, що відповідає положенню 156,543,061 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- MA0070, який являє собою SNP, який являє собою T у положенні, що відповідає положенню 156,694,565 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- MA0071, який являє собою SNP, який являє собою C у положенні, що відповідає положенню 156,694,641 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- MA0064, який являє собою SNP, який являє собою C у положенні, що відповідає положенню 156,541,890 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4; та необов'язково
- Affx-91328160, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,372,823 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- PZE-108095339, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,378,424 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

У певних варіантах здійснення цього винаходу рослина кукурудзи не має будь-якого щонайменше одного молекулярного маркера (алелю):

- PZE-108092843, який являє собою SNP, який являє собою C у положенні, що відповідає положенню 154,456,106 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- PZE-108094590, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 155,860,812 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- MA0043, який являє собою SNP, який являє собою A у положенні, що відповідає положенню 155,999,733 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0025, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,967,599 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- PZE-108096469, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 157,266,475 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

5 - PZE-108096610, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 157,375,673 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4; або

- PZA-003182005, який являє собою SNP, який являє собою A у положенні, що відповідає положенню 158,167,578 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4.

10 Використовуваний у цьому документі термін "кукурудза" стосується рослини виду *Zea mays*, переважно *Zea mays ssp mays*.

Термін "рослина" включає цілі рослини, включно з їхніми нащадками або потомством. Використовуваний в цьому документі термін "рослина", якщо явно не зазначено інше, означає рослину на будь-якій стадії розвитку. Термін "частина рослини" включає будь-яку частину або похідне рослини, включно з конкретними рослинними тканинами, або структури рослини, 15 рослинні клітини, протопласт рослини, культуру рослинних клітин або тканин, з яких можуть бути регенеровані рослини, калюси рослини, маткові кореневища рослини і рослинні клітини, які є інтактними в рослинах або частинах рослин, такі як насіння, ядра, качани, квітки, сім'ядолі, листя, стебла, бруньки, коріння, кореневі кінчики, стерня і т. ін. Частини рослини можуть включати оброблені частини рослини або похідні, включно з квіткою, маслами, екстрактами і т. 20 ін. "Частини рослини" являють собою, наприклад, вегетативні органи/структури пагона, наприклад, листя, стебла і бульби; коріння, квітки і квіткові органи/структури, наприклад, приквітки, чашолистки, пелюстки, тичинки, плодолистки, пильовики і сім'ябруньки; насіння, включно з зародками, ендоспермом і насінневої оболонкою; плід і зрілу зав'язь; рослинну тканину, наприклад, судинну тканину, покривну тканину і т. ін.; і клітини, наприклад, захисні клітини, яйцеклітини, пилки, трихоми і т. ін.; і їхнє потомство. Частини рослин можуть бути 25 прикріплені до цілої інтактної рослини або відокремлені від неї. Такі частини рослини включають, але цим не обмежуються, органи, тканини і клітини рослини і, переважно насіння. "Рослинна клітина" являє собою структурну і фізіологічну одиницю рослини, що містить протопласт і клітинну стінку. Рослинна клітина може бути у формі виділеної поодинокі клітини або культивованої клітини, або у вигляді частини більш високоорганізованої одиниці, як-от, 30 наприклад, рослинна тканина, орган рослини або ціла рослина. "Культура рослинних клітин" означає культури рослинних одиниць, таких як, наприклад, протопласти, клітини в культурі клітин, клітини в рослинних тканинах, пилки, пилкові трубки, сім'ябруньки, зародкові мішки, зиготи і зародки на різних стадіях розвитку. "Рослинний матеріал" стосується листя, стебел, 35 коріння, квіток або частин квіток, плодів, пилку, яйцеклітин, зигот, насіння, відводків, культур клітин або тканин, або будь-якої іншої частини або продукту рослини. Сюди також входять калюси або калюсна тканина, а також екстракти (такі як екстракти з стрижневих коренів) або зразки. "Орган рослини" являє собою окрему і візуально структуровану і диференційовану частину рослини, таку як корінь, стебло, лист, бутон або зародок. "Рослинна тканина", що 40 використовується в цьому документі, означає групу рослинних клітин, організованих в структурну і функціональну одиницю. Включена будь-яка тканина рослини в *planta* або в культурі. Цей термін включає, але цим не обмежується, цілі рослини, органи рослин, насіння рослин, культуру тканин і будь-які групи рослинних клітин, організованих в структурні і/або функціональні одиниці. Застосування цього терміна в поєднанні або за відсутності будь-якого 45 конкретного типу рослинної тканини, як зазначено вище, або іншим чином, охопленого цим визначенням, не передбачає виключення будь-якого іншого типу рослинної тканини.

У певних варіантах здійснення цього винаходу частина або похідна рослини є або містить (функціональний) матеріал для розмноження, такий як зародкова плазма, насіння або зародок 50 рослини, або інший матеріал, з якого рослина може бути регенерована. У певних варіантах здійснення цього винаходу частина або похідна рослини не є (функціональним) матеріалом для розмноження, таким як зародкова плазма, насіння або зародок рослини, або інший матеріал, з якого рослина може бути регенерована. У певних варіантах здійснення цього винаходу, частина або похідне рослини не містить (функціональних) чоловічих і жіночих репродуктивних органів. У певних варіантах здійснення цього винаходу, частина чи похідне рослини є або містить 55 матеріал для розмноження, але матеріал для розмноження, який не використовується або не може використовуватися (більше) для продукування або генерування нових рослин, такий як матеріал для розмноження, який був хімічно, механічно або іншим чином наведений в нефункціональний стан, наприклад, шляхом термічної обробки, кислотної обробки, ущільнення, подрібнення, дроблення і т. ін.

Використовуваний в цьому документі термін "популяція рослини" може використовуватися взаємозамінно з "популяцією рослин". Популяція рослин переважно містить безліч окремих рослин, наприклад, переважно щонайменше 10, наприклад, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 або 90, більш переважно щонайменше 100, наприклад, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 або 900, ще

5 більш переважно щонайменше 1000, наприклад, щонайменше 10000 або щонайменше 100000.

Використовуваний у цьому документі термін "HT2" стосується "стійкості до *Helminthosporium turcicum* 2", яка є локусом на хромосомі 8 *Zea mays*, відповідальним за стійкість до *Helminthosporium turcicum*. Ген-збудник, відповідальний за надання стійкості до *Helminthosporium turcicum*, який розташований у локусі HT2, є RLK1 (рецепторна тирозинкіназа 1), або WAK-RLK1 (пов'язана зі стінкою кіназу RLK1). Використовуваний у цьому документі термін "HT3" стосується "стійкості до *Helminthosporium turcicum* 3", яка є локусом на хромосомі 8 *Zea mays*, відповідальним за стійкість до *Helminthosporium turcicum*. Ген-збудник, відповідальний за надання стійкості до *Helminthosporium turcicum*, який розташований у локусі HT3, є RLK1 (рецепторна тирозинкіназа 1), або WAK-RLK1 (пов'язана зі стінкою кіназу RLK1).

10 Аелель RLK1, що надає стійкість до *Helminthosporium turcicum*, може містити послідовність гена, представлену в SEQ ID NO: 1, або може містити послідовність, що кодує послідовність, яка представлена в SEQ ID NO: 2, або може кодувати білок, що містить послідовність, представлену в SEQ ID NO: 3. Кодуюча послідовність RLK1 ідентична в алелях HT2 і HT3. Однак алелі HT2 і HT3 походять від різних генотипів/донорних ліній і розрізняються в декількох

20 місцях за межами кодуючої послідовності RLK1. У певних варіантах здійснення цього винаходу, ген, білок або кодуюча послідовність RLK1 має послідовність, яка відповідає послідовності гена, білка або кодуючої послідовності RLK1 алелі HT2 або HT3.

Термін "локус" (у множині - локуси) означає конкретне місце або місця, або сайт на хромосомі, де, наприклад, виявлений QTL/гаплотип, ген або генетичний маркер.

25 Використовуваний в цьому документі термін "локус кількісної ознаки" або "QTL" має своє звичайне значення, відоме в цій галузі техніки. За допомогою додаткових роз'яснень, і без обмежень, QTL може належати до області ДНК, яка асоційована з диференціальною експресією кількісної фенотипічної ознаки, щонайменше в одному генетичному тлі, наприклад, щонайменше в одній популяції, що розмножується. Область QTL охоплює або тісно зчеплена з

30 геном або генами, які негативно впливають на розглянуту ознаку.

Використовуваний у цьому документі термін "алель" або "алелі" відноситься щонайменше до однієї альтернативної форми, тобто до іншої нуклеотидної послідовності, локусу.

"Аелель локусу" може містити безліч генів або інших генетичних факторів у межах суміжної геномної області або групи зчеплення, такої як гаплотип. Аелель локусу може означати гаплотип

35 в межах зазначеного вікна, при цьому, зазначене вікно являє собою суміжну геномну область, яка може бути визначена і відстежена за допомогою набору щонайменше одного поліморфного маркера. Гаплотип може бути визначений за унікальним відбитком алелів у кожному маркері в межах зазначеного вікна. Локус може кодувати щонайменше один алель, який негативно впливає на експресію безперервно розподіленого (кількісного) фенотипу. У певних варіантах

40 здійснення цього винаходу, локус, алель, полінуклеїнова кислота або молекулярний маркер (алель), як описано в цьому документі, може бути гомозиготним. У певних варіантах здійснення локус, алель, полінуклеїнова кислота або молекулярний маркер (алель), як описано в цьому документі, може бути гетерозиготним.

Використовуваний в цьому документі термін "мутантні алелі" або "мутація" алелів включає

45 алелі, що мають щонайменше одну мутацію, як-от інсерція, делеція, стоп-кодон, зміна основи (наприклад, транзиція або трансверсія) або зміна кордону сплайсингу, яка можуть призводити або не призводити до появи змінених генних продуктів. Модифікації алелів можуть виникати в кодуючих або некодуючих областях (наприклад, в промоторних областях, екзонах, інтронах або кордонах сплайсингу).

"Маркер" являє собою (засіб знаходження положення) генетичну або фізичну карту, або зчеплення між маркерами та локусами ознак (локусами, що негативно впливають на ознаки). Положення, яке виявляє маркер, може бути відоме за допомогою виявлення поліморфних алелів та їхнього генетичного картування, або шляхом гібридизації, зіставлення послідовностей або ампліфікації послідовності, яка була фізично картована. Маркер може являти собою ДНК-маркер (виявляє поліморфізми ДНК), білок (виявляє варіації в поліпептиді, що кодується) або

55 просто успадкований фенотип (наприклад, "восковий" фенотип). ДНК-маркер може бути отриманий з геномної нуклеотидної послідовності або з нуклеотидних послідовностей, що експресуються (наприклад, із сплайсованої РНК або кДНК). Залежно від технології ДНК-маркера, маркер може складатися з комплементарних праймерів, фланкуючих локус, і/або

60 комплементарних зондів, які гібридизуються з поліморфними алелями в локусі. Термін

"маркерний локус" означає локус (ген, послідовність або нуклеотид), який виявляється маркером. "Маркер" або "молекулярний маркер", або "маркерний локус", може також використовуватися для позначення послідовності нуклеїнової кислоти або амінокислоти, яка є досить унікальною, щоб охарактеризувати конкретний локус на геномі. Будь-яка поліморфна ознака, що виявляється, може бути використана як маркер за умови, що вона успадковується диференційовано і виявляє нерівноважне зчеплення з фенотиповою ознакою, що цікавить.

Маркери, які виявляють генетичні поліморфізми між членами популяції, добре відомі в цій галузі техніки. Маркери можуть бути визначені за типом поліморфізму, який вони виявляють, а також за технологією маркування, що використовується для виявлення поліморфізму. Типи маркерів включають, але цим не обмежуються, виявлення поліморфізмів довжин рестрикційних фрагментів (RFLP), виявлення ізоферментних маркерів, випадково ампліфікованої поліморфної ДНК (RAPD), поліморфізмів довжин ампліфікованих фрагментів (AFLP), виявлення простих повторюваних послідовностей (SSR), виявлення ампліфікованих варіабельних послідовностей генома рослин, виявлення самопідтримуваної реплікації послідовностей або виявлення одонуклеотидних поліморфізмів (SNP). SNP можуть бути виявлені, наприклад, за допомогою секвенування ДНК, методів специфічної ампліфікації послідовностей на основі ПЛР, виявлення полінуклеотидних поліморфізмів за допомогою алель-специфічної гібридизації (ASH), динамічної алель-специфічної гібридизації (DASH), молекулярних маяків, гібридизації на мікрочіпах, кількісних аналізів олігонуклеотидної лігази, флєп-ендонуклеаз, 5'-ендонуклеаз, подовження праймера, одноланцюгового конформаційного поліморфізму (SSCP) або гелю-електрофорезу з градієнтом температури (TGGE). Перевага секвенування ДНК, такого як технологія піросеквенування, полягає в тому, що воно дозволяє виявити ряд зчеплених алелів SNP, які складають гаплотип. Гаплотипи, здебільшого, є більш інформативними (виявляють більш високий рівень поліморфізму), ніж SNP.

"Маркерний алель", альтернативно "алель маркерного локусу", може належити до однієї з безлічі поліморфних нуклеотидних послідовностей, виявлених в маркерному локусі в популяції. Стосовно маркеру SNP, алель належить до специфічної нуклеотидної основи, присутньої в цьому локусі SNP у цієї окремої рослини.

"Тонке картування" стосується способів, за допомогою яких положення геномної області (наприклад, QTL) може бути визначено більш точно (конкретизовано), і за допомогою якого зменшується розмір фрагмента інтрогресії, що містить QTL. Наприклад, можуть бути отримані майже ізогенні лінії (NIL) для QTL або гаплотипу (QTL/гаплотип-NIL), які містять різні, фрагменти фрагмента інтрогресії, які перекриваються, в межах однорідного в іншому генетичного фону рекурентного батька. Такі лінії потім можуть бути використані для картування того, на якому фрагменті розташований QTL/гаплотип, і для ідентифікації лінії, що має більш короткий фрагмент інтрогресії, що містить QTL/гаплотип.

"Маркерна селекція" (MAS) являє собою процес, за допомогою якого окремі рослини відбираються на основі маркерних генотипів. "Маркерна контрелекція" являє собою процес, за допомогою якого маркерні генотипи використовуються для ідентифікації рослин, які не будуть відібрані, що дозволяє виключити їх з програми селекції або посадки. Маркерна селекція використовує присутність молекулярних маркерів, які генетично зчеплені з конкретним локусом або з конкретною областю хромосоми (наприклад, фрагмент інтрогресії, трансген, поліморфізм, мутація тощо) для відбору рослин, у яких присутній конкретний локус або область (фрагмент інтрогресії, трансген, поліморфізм, мутація тощо). Наприклад, молекулярний маркер, генетично зчеплений з областю геному (наприклад, гаплотипом) або геном (наприклад, алель RFLK1, що надає стійкість до патогену), як визначено в цьому документі, може бути використаний для виявлення і/або відбору рослин, що містять HT2/HT3 на хромосомі 8. Чим ближче генетичне зчеплення молекулярного маркеру з локусом (наприклад, приблизно 7 сМ, 6 сМ, 5 сМ, 4 сМ, 3 сМ, 2 сМ, 1 сМ, 0,5 сМ або менше), тим менш імовірно, що маркер відокремлений від локусу за допомогою рекомбінації в мейозі. Аналогічним чином, чим ближче два маркери зчеплені один з одним (наприклад, в межах 7 або 5 сМ, 4 сМ, 3 сМ, 2 сМ, 1 сМ або менше), тим менш імовірно, що два маркери будуть відокремлені один від одного (і тим більше імовірно, що вони будуть косягредувати як єдине ціле). Маркер "в межах 7 сМ або в межах 5 сМ, 3 сМ, 2 сМ або 1 сМ" іншого маркера стосується маркеру, який генетично картується в області, в межах 7 сМ або 5 сМ, 3 сМ, 2 сМ або 1 сМ області, що фланкує маркер (тобто, по обидва бока від маркера). Аналогічним чином, маркер в межах 10 Мб, 5 Мб, 3 Мб, 2,5 Мб, 2 Мб, 1 Мб, 0,5 Мб, 0,4 Мб, 0,3 Мб, 0,2 Мб, 0,1 Мб, 50 кб, 20 кб, 10 кб, 5 кб, 2 кб, 1 кб або менше іншого маркера, стосується маркеру, який фізично розташований в межах 10 Мб, 5 Мб, 3 Мб, 2,5 Мб, 2 Мб, 1 Мб, 0,5 Мб, 0,4 Мб, 0,3 Мб, 0,2 Мб, 0,1 Мб, 50 кб, 20 кб, 10 кб, 5 кб, 2 кб, 1 кб або менше, області геномної ДНК, що фланкує маркер (тобто, по обидва бока від маркера). "LOD-бал" (кількісний показник

зчеплення генів) (логарифм (основа 10) відносини шансів) стосується статистичного випробування, що часто використовується для аналізу зчеплень в популяціях тварин і рослин. LOD-бал порівнює імовірність отримання даних випробування, якщо два локуси (локуси молекулярного маркера і/або локус фенотипової ознаки) дійсно зчеплені, з імовірністю спостереження тих самих даних чисто випадково. Позитивні LOD-бали свідчать про наявність зчеплення, а LOD-бал, що перевищує 3,0, вважається доказом зчеплення. LOD-бал +3 вказує на ймовірність 1000 до 1, що спостережуване зчеплення виникло не випадково.

"Маркерний гаплотип" стосується комбінації (маркерних) алелей в (маркерному) локусі.

"Маркерний локус" являє собою конкретне місце розташування хромосоми в геномі виду, де може бути виявлений конкретний маркер. Маркерний локус може бути використаний для відстеження присутності другого зчепленого локусу, наприклад, локусу, який негативно впливає на експресію фенотипової ознаки. Наприклад, маркерний локус може використовуватися для відстеження сегрегації алелей в генетично або фізично зчепленому локусі.

"Маркерний зонд" являє собою послідовність нуклеїнової кислоти або молекулу, яка може бути використана для ідентифікації присутності маркерного локусу, наприклад, зонд нуклеїнової кислоти, який є комплементарним послідовності маркерного локусу, за допомогою гібридизації нуклеїнової кислоти. Маркерні зонди, що містять щонайменше 30 суміжних нуклеотидів маркерного локусу ("всі або частина" послідовності маркерного локусу), можуть бути використані для гібридизації нуклеїнової кислоти. В альтернативному варіанті здійснення цього винаходу, в деяких аспектах, маркерний зонд стосується зонду будь-якого типу, який здатний розрізнати (тобто, генотип) конкретний алель, який присутній в маркерному локусі.

Термін "молекулярний маркер" може використовуватися для позначення генетичного маркера або його кодованого продукту (наприклад, білка), використовуваного як вихідна точка під час ідентифікації зчепленого локусу. Маркер може бути отриманий з геномних нуклеотидних послідовностей або з нуклеотидних послідовностей, що експресуються, (наприклад, з сплайсованої РНК, кДНК і так далі) або з кодованого поліпептиду. Цей термін також стосується послідовностей нуклеїнової кислоти, комплементарних або фланкуючих маркерні послідовності, таких як нуклеїнові кислоти, використовувані як зонди, або пар праймерів, здатних ампліфікувати маркерну послідовність. "Зонд молекулярного маркеру" являє собою послідовність нуклеїнової кислоти або молекулу, яка може бути використана для ідентифікації присутності маркерного локусу, наприклад, зонд нуклеїнової кислоти, який є комплементарним послідовності маркерного локусу. В альтернативному варіанті здійснення цього винаходу, в деяких аспектах, маркерний зонд стосується зонду будь-якого типу, який здатний розрізнати (тобто, генотип) конкретний алель, який присутній в маркерному локусі. Нуклеїнові кислоти "є комплементарними", якщо вони специфічно гібридизуються в розчині, наприклад, відповідно до правил спарювання основ за Уотсоном-Кріком. Деякі з маркерів, описаних у цьому документі, також згадуються як гібридизаційні маркери, якщо вони розташовані в області інсерційно-делеційного поліморфізму, такої як неколінеарна область, що описана в цьому документі. Це пов'язано з тим, що область інсерції, за визначенням, є поліморфізмом проти рослини без інсерції. Отже, маркер має тільки вказувати, чи присутня або відсутня область інсерційно-делеційного поліморфізму. Будь-яка придатна технологія виявлення маркера може бути використана для ідентифікації такого гібридизаційного маркеру, наприклад, у прикладах, наведених у цьому документі, використовується технологія SNP.

"Генетичні маркери" являють собою нуклеїнові кислоти, які є поліморфними у популяції, і алелі яких можуть бути виявлені та розпізнані щонайменше одним аналітичним способом, наприклад, RFLP, AFLP, ізоферментом, SNP, SSR і т. ін. Терміни "молекулярний маркер" і "генетичний маркер" використовуються в цьому документі взаємозамінно. Цей термін також стосується послідовностей нуклеїнової кислоти, яка є комплементарною геномним послідовностям, таким як нуклеїнові кислоти, які використовуються як зонди. Маркери, що відповідають генетичним поліморфізмам між членами популяції, можуть бути виявлені за допомогою методів, що добре зарекомендували себе в цій галузі техніки. Вони включають, наприклад, методи специфічної ампліфікації послідовностей на основі ПЛР, виявлення поліморфізмів довгих рестрикційних фрагментів (RFLP), виявлення маркерів ізоферментів, виявлення полінуклеотидних поліморфізмів за допомогою алель-специфічної гібридизації (ASH), виявлення ампліфікованих варіабельних послідовностей генома рослини, виявлення самопідтримуваної реплікації послідовностей, виявлення простих повторюваних послідовностей (SSR), виявлення одонуклеотидних поліморфізмів (SNP) або виявлення поліморфізмів довжин ампліфікованих фрагментів (AFLP). Також відомі добре зарекомендувавши себе методи виявлення маркерних послідовностей (EST) і SSR-маркерів, що експресуються, отриманих з послідовностей EST і випадково ампліфікованої поліморфної ДНК (RAPD).

"Поліморфізм" являє собою варіацію в ДНК між щонайменше двома індивідуумами в популяції. Поліморфізм переважно має частоту щонайменше 1 % в популяції. Корисний поліморфізм може включати однонуклеотидний поліморфізм (SNP), просту повторювану послідовність (SSR) або інсерційно-делеційний поліморфізм, також званий в цьому документі

5 "інсерційно-делеційний поліморфізм". Термін "інсерційно-делеційний поліморфізм" стосується інсерції або делеції, при цьому, одна лінія може згадуватися як та, що має вставлений нуклеотид або фрагмент ДНК щодо другої лінії, або друга лінія може згадуватися як та, що має віддалений нуклеотид або фрагмент ДНК відносно першої лінії.

10 "Фізична відстань" між локусами (наприклад, між молекулярними маркерами і/або між фенотипічними маркерами) на тій самій хромосомі, являє собою фактичну фізичну відстань, виражену в основах або парах основ (п.о.), кілобазах або тисячах пар основ (кб), або мегабазах, або мільйонах пар основ (Мб).

15 "Генетична відстань" між локусами (наприклад, між молекулярними маркерами і/або між фенотипічними маркерами) на тій самій хромосомі вимірюється частотою кросинговера або частотою рекомбінацій (RF), і вказується в сантиморганах (сМ). Один сМ відповідає частоті рекомбінації 1 %. Якщо рекомбіанти не можна знайти, то RF дорівнює нулю, і локуси знаходяться або дуже близько один до одного фізично, або вони ідентичні. Чим далі один від одного знаходяться два локуси, тим вище RF.

20 "Фізична карта" генома представляє карту, що показує лінійний порядок ідентифікованих орієнтирів (включно з генами, маркерами тощо) на хромосомній ДНК. Однак, на відміну від генетичних карт, відстані між орієнтирами є абсолютними (наприклад, вимірюються в парах основ або виділених і суміжних генетичних фрагментах, що перекриваються) і не засновані на генетичній рекомбінації (яка може варіюватися в різних популяціях).

25 Алель "негативно" корелює з ознакою, якщо він зчеплений з нею, і якщо присутність алеля є показником того, що бажана ознака або форма ознаки не будуть зустрічатися у рослини, що містить цей алель. Алель "позитивно" корелює з ознакою, якщо він зчеплений з нею, і якщо присутність алеля є показником того, що бажана ознака або форма ознаки будуть зустрічатися у рослини, що містить цей алель.

30 Сантиморган ("сМ") являє собою одиницю виміру частоти рекомбінації. Один сМ дорівнює 1 % ймовірності того, що маркер в одному генетичному локусі буде відділений від маркера в другому локусі через кросинговер в одному поколінні.

Використовуваний в цьому документі термін "хромосомний інтервал", позначає безперервний лінійний інтервал геномної ДНК, який знаходиться в *planta* на одній хромосомі. Генетичні елементи або гени, які розташовані на одному хромосомному інтервалі, фізично зчеплені. Розмір хромосомного інтервалу особливо не обмежений. У деяких аспектах, генетичні елементи, які розташовані в межах одного хромосомного інтервалу, генетично зчеплені, зазвичай з відстанню генетичної рекомбінації, наприклад, меншим або рівним 20 сМ, або, в альтернативному варіанті, меншим або рівним 10 сМ. Тобто, два генетичних елемента в межах одного хромосомного інтервалу піддаються рекомбінації з частотою, меншою або рівною 20 %

40 або 10 %. Термін "тісно зчеплений" в цій заявці означає, що рекомбінація між двома зчепленими локусами відбувається з частотою, рівною або меншою примірно 10 % (тобто, відокремлені на генетичній карті не більше ніж на 10 сМ). Іншими словами, тісно зчеплені локуси спільно косягуються щонайменше в 90 % випадків. Маркерні локуси особливо корисні для об'єкта цього винаходу, якщо вони демонструють значну імовірність косягування (зчеплення) з бажаною ознакою (наприклад, зі стійкістю до сірої плямистості листя). Тісно зчеплені локуси, як-от маркерний локус і другий локус, можуть відображати частоту міжлокусної рекомбінації 10 % або менше, переважно примірно 9 % або менше, ще більш переважно примірно 8 % або менше, ще більш переважно примірно 7 % або менше, ще більш переважно примірно 6 % або менше, ще більш переважно примірно 5 % або менше, ще більш переважно примірно 4 % або менше, ще більш переважно примірно 3 % або менше, і ще більш переважно примірно 2 % або менше. В дуже кращих варіантах здійснення цього винаходу, відповідні локуси відображають частоту рекомбінації примірно 1 % або менше, наприклад, примірно 0,75 % або менше, більш переважно примірно 0,5 % або менше, або ще більш переважно примірно 0,25 % або менше.

55 Два локуси, які локалізовані в одній і тій же хромосомі, і на такій відстані, що рекомбінація між двома локусами відбувається з частотою менше 10 % (наприклад, примірно 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,75 %, 0,5 %, 0,25 % або менше), також називаються "проксимальними" один одному. У деяких випадках два різних маркера можуть мати однакові координати генетичної карти. У цьому випадку два маркери є настільки проксимальними один

одному, що рекомбінація відбувається між ними з такою низькою частотою, що її неможливо виявити.

"Зчеплення" стосується тенденції алелів сегрегувати разом частіше, ніж очікувалося, випадково, якщо їх передача була незалежною. Здебільшого, зчеплення стосується алелів на тій самій хромосомі. Генетична рекомбінація відбувається з передбачуваною випадковою частотою по всьому геному. Генетичні карти будуються шляхом вимірювання частоти рекомбінації між парами ознак або маркерів. Чим ближче ознаки або маркери розташовані один до одного на хромосомі, тим нижче частота рекомбінації, і тим вище ступінь зчеплення. Ознаки або маркери вважаються в цьому документі зчепленими, якщо вони зазвичай спільно косягуються. Імовірність рекомбінації 1/100 на покоління визначається як відстань на генетичній карті 1,0 сантиморган (1,0 cM). Термін "нерівноважне зчеплення" стосується невідповідної сегрегації генетичних локусів або ознак (або того й іншого). У будь-якому випадку, нерівноважне зчеплення передбачає, що відповідні локуси досить фізично проксимальні по довжині хромосоми, так що вони сегрегуються разом з більшою, ніж випадкова (тобто, невідповідною), частотою. Маркери, які показують нерівноважне зчеплення, вважаються зчепленими. Зчеплені локуси косягуються більш ніж в 50 % випадків, наприклад, примірно від 51 % до примірно 100 % випадків. Іншими словами, два маркери, які косягуються, мають частоту рекомбінації менше 50 % (і, за визначенням, відокремлені менш ніж на 50 cM в одній і тій же групі зчеплення). У контексті цього документа, зчеплення може бути між двома маркерами або, в альтернативному варіанті, між маркером і локусом, що впливає на фенотип. Маркерний локус може бути "асоційований" (зчеплений) з ознакою. Ступінь зчеплення маркерного локусу і локусу, що впливає на фенотипічну ознаку, вимірюється, наприклад, як статистична імовірність косягації цього молекулярного маркера з фенотипом (наприклад, статистика F або LOD-бал).

Генетичні елементи або гени, які розташовані на одному сегменті хромосоми, фізично зчеплені. У деяких варіантах здійснення цього винаходу, два локуси розташовані в безпосередній близькості, так що рекомбінація між парами гомологічних хромосом не відбувається між двома локусами під час мейозу з високою частотою, наприклад, таким чином, що зчеплені локуси косягуються щонайменше примірно в 90 % випадків, наприклад, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,75 % або більше випадків. Генетичні елементи, які розташовані в межах хромосомного сегмента, також "генетично зчеплені", зазвичай в межах відстані генетичної рекомбінації, меншої або рівної 50 cM, наприклад, примірно 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,75, 0,5, 0,25 cM або менше. Тобто, два генетичних елемента в межах одного хромосомного сегмента піддаються рекомбінації під час мейозу один з одним з частотою, меншою або рівною примірно 50 %, наприклад, примірно 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 39 %, 38 %, 37 %, 36 %, 35 %, 34 %, 33 %, 32 %, 31 %, 30 %, 29 %, 28 %, 27 %, 26 %, 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,75 %, 0,5 %, 0,25 % або менше. "Тісно зчеплені" маркери відображають частоту кросовера з цим маркером, що становить примірно 10 % або менше, наприклад, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,75 %, 0,5 %, 0,25 % або менше (цей маркерний локус знаходиться в межах примірно 10 cM від тісно зчепленого маркерного локусу, наприклад, в межах 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,75, 0,5, 0,25 cM або менше від тісно зчепленого маркерного локусу). Іншими словами, тісно зчеплені маркерні локуси косягуються щонайменше примірно в 90 % випадків, наприклад, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,75 % або більше випадків.

Термін "патоген", який використовується в цьому документі, зазвичай стосується будь-якого типу збудника інфекції, здатного викликати (інфекційне) захворювання, і включає, без обмеження, вірус, бактерію, найпростіше, прион, віроїд або гриб (включно з дріжджами). Крім того, паразити, такі як комахи або черв'яки, а також паразитичні рослини або водорості, здебільшого охоплюються терміном "патоген", що використовується в цьому документі.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, термін патоген, згаданий у цьому документі, є грибовим патогеном. У певних варіантах здійснення цього винаходу, грибовий патоген стосується підрозділу Ascomycota або Basidiomycota. Грибовий патоген може належати до сімейства Pleosporaceae, Pucciniaceae або Botryosphaeriaceae. Переважно, грибовий патоген належить до роду *Setosphaeria*, *Bipolaris*, *Puccinia* або *Diplodia*, більш переважно є видом *Helminthosporium turcicum*, *Setosphaeria rostrata*, *Setosphaeria glycinea*, *Setosphaeria holmii*, *Setosphaeria khartoumensis*, *Setosphaeria minor*, *Setosphaeria monoceras*, *Setosphaeria pedicellata*, *Setosphaeria prolata*, *Bipolaris australis*, *Bipolaris brizae*, *Bipolaris buchloes*, *Bipolaris*

cactivora, *Bipolaris clavata*, *Bipolaris coicis*, *Bipolaris colocasiae*, *Bipolaris crotonis*, *Bipolaris crustacean*, *Bipolaris cylindrical*, *Bipolaris euchlaenae*, *Bipolaris halepensis*, *Bipolaris heveae*, *Bipolaris incurvata*, *Bipolaris indica*, *Bipolaris iridis*, *Bipolaris leersiae*, *Bipolaris micropus*, *Bipolaris miyakei*, *Bipolaris multiformis*, *Bipolaris nicotiae*, *Bipolaris novae-zelandiae*, *Bipolaris ovariicola*,
 5 *Bipolaris panici-miliacei*, *Bipolaris papendorffii*, *Bipolaris sacchari*, *Bipolaris salkadehensis*, *Bipolaris sorghicola*, *Bipolaris subpapendorffii*, *Bipolaris tropicalis*, *Bipolaris urochloae*, *Bipolaris zeae*, *Puccinia asparagi*, *Puccinia graminis*, *Puccinia horiana*, *Puccinia mariae-wilsoniae*, *Puccinia poarum*, *Puccinia psidii*, *Puccinia recondite*, *Puccinia sessilis*, *Puccinia sorghi*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia triticens*,
 10 *Diplodia maydis*, *Diplodia seriata* або *Stenocarpella (Diplodia) macrospora*, більш переважно є *Helminthosporium turcicum*, *Puccinia sorghi*, *Diplodia macrospora* або *Bipolaris maydis*.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, грибовий патоген викликає грибкове захворювання рослин. Відповідно, у певних варіантах здійснення цього винаходу захворювання рослин, згадане в цьому документі, є грибковим захворюванням. У кращому варіанті здійснення цього винаходу, захворювання рослин обрано з групи, що складається з Гельмінтоспоріозної
 15 плямистості листя кукурудзи (що викликається *Helminthosporium turcicum*), Глазковій плямистості листя кукурудзи (що викликається *Bipolaris maydis*), Іржі з кукурудзи (що викликається *Puccinia sorghi* та Смугастої плямистості листя диплодії (що викликається *Diplodia macrospora*, також званої *Stenocarpella macrospora*). Найбільш переважно, захворюванням рослин є Гельмінтоспоріозна плямистість листя кукурудзи (NCLB).

У певних варіантах здійснення цього винаходу термін "патоген", використовуваний в цьому документі, відноситься до патогенного гриба. У певних варіантах здійснення цього винаходу, термін "патоген", використовуваний в цьому документі, відноситься до патогенного гриба роду *Exserohilum* (синонім *Helminthosporium*). У певних варіантах здійснення цього винаходу термін "патоген", використовуваний в цьому документі, відноситься до патогенного гриба виду
 20 *Exserohilum turcicum* (синонім *Helminthosporium turcicum*). У певних варіантах здійснення цього винаходу термін "патоген", використовуваний в цьому документі, відноситься до патогену, що викликає Гельмінтоспоріозну плямистість листя кукурудзи.

У контексті цього документа, *Exserohilum turcicum* може використовуватися взаємозамінно з *Helminthosporium turcicum*. *Exserohilum turcicum* являє собою анаморф *Setosphaeria turcica*.
 30 *Exserohilum turcicum/Setosphaeria turcica* відносяться до типу *Ascomycota*, підкласу *Pleosporales* і сімейства *Pleosporaceae*. *Exserohilum turcicum* викликає захворювання рослин Гельмінтоспоріозною плямистістю листя кукурудзи. Найбільш поширеним діагностичним симптомом Гельмінтоспоріозної плямистості листя кукурудзи є сигароподібні (еліптичні) некротичні сіро-зелені ураження на листі довжиною кілька сантиметрів.

В одному аспекті, цей винахід стосується способу генерування рослини кукурудзи або частини рослини, переважно рослини кукурудзи, що має (підвищену) стійкість і/або толерантність до патогену, переважно, при цьому зазначеним патогеном є *Exserohilum turcicum*, що містить введення в геном рослини або частини рослини полінуклеїнової кислоти за цим
 35 винаходом, як описано в цьому документі.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота має послідовність, що міститься в хромосомному інтервалі *Zea Mays* на хромосомі 8, і фланковану молекулярним маркером (алелем) PZE-108092843 і PZA-003182005, як-от полінуклеїнова кислота, що містить щонайменше один (HT2 або HT3) молекулярний маркер (алель) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064, PZE-108095339 та Affx-91328160, як також описано в цьому
 40 документі в іншому місці. Фахівець в цій галузі техніки зрозуміє, що полінуклеїнова кислота щонайменше містить ген *RLK1 HT2/HT3*, який необов'язково містить фланкуючі послідовності. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота не містить щонайменше один (HT2 або HT3) молекулярний маркер (алель) PZE-108092843, PZA-003182005, PZE-108094590, PZE-108096610, PZE-108096469, MA0043 та MA0025, як також описано у цьому
 45 документі в іншому місці.

У певних варіантах здійснення цього винаходу полінуклеїнову кислоту вводять шляхом інтрогресії.

У певних варіантах здійснення цей винахід стосується способу генерування рослини кукурудзи або частини рослини, переважно рослини кукурудзи або частини рослини, що має підвищену стійкість і/або толерантність до патогену, переважно, при цьому згаданим патогеном є *Exserohilum turcicum*, що містить (а) надання першої рослини кукурудзи, ідентифікованої згідно з способом ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, як описано в цьому документі в іншому місці, (б) схрещування згаданої першої рослини кукурудзи з другою рослиною кукурудзи, (с) відбір рослин-нащадків, що містять полінуклеїнову кислоту згідно з цим
 50 винаходом, як описано в цьому документі в іншому місці, щонайменше будь-який один

молекулярний маркер (алель) MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071, MA0064, PZE-108095339 та Affx-91328160 або комбінації, як описано у цьому документі в іншому місці; та необов'язково (d) збирання згаданої частини рослини кукурудзи із згаданого потомства.

Використовувані в цьому документі терміни "інтрогресія", "інтрогресований" і "інтрогресування" стосуються як природного, так і штучного процесу, за допомогою якого хромосомні фрагменти або гени одного виду або сорту переміщуються в геном іншого виду або сорту шляхом схрещування цих видів. Процес необов'язково може бути завершений зворотним схрещуванням з рекурентним батьком. Наприклад, інтрогресія бажаного алелю в зазначеному локусі може бути передана щонайменше одному потомству за допомогою статевого схрещування між двома батьками одного і того ж виду, де щонайменше один з батьків має бажаний алель в своєму геномі. В альтернативному варіанті здійснення цього винаходу, наприклад, трансмісія алеля може відбуватися шляхом рекомбінації між двома донорними геномами, наприклад, в злитому протопласті, де щонайменше один з донорних протопластів має бажаний алель в своєму геномі. Бажаний алель може бути виявлений, наприклад, за допомогою маркеру, який асоційований з фенотипом, гаплотипом, QTL, трансгеном або с чимось подібним. У будь-якому випадку, потомство, що містить бажаний алель, може бути неодноразово піддано зворотному схрещуванню з лінією, що має бажане генетичне тло, і відібрано для бажаного алелю, що призведе до закріплення алеля в обраному генетичному тлі. Процес "інтрогресування" часто називають "зворотним схрещуванням", якщо процес повторюється щонайменше два рази. "Фрагмент інтрогресії" або "сегмент інтрогресії", або "область інтрогресії" стосується хромосомного фрагменту (або частини, або області хромосоми), який був введений в іншу рослину того ж або спорідненого виду або штучним, або природним шляхом, наприклад, шляхом схрещування, або традиційними методами селекції, наприклад, зворотним схрещуванням, тобто, інтрогресований фрагмент є результатом методів селекції, що позначаються дієсловом "інтрогресувати" (наприклад, зворотне схрещування). При цьому розуміється, що термін "фрагмент інтрогресії" ніколи не включає цілу хромосому, а тільки частину хромосоми. Фрагмент інтрогресії може бути великим, наприклад, навіть три чверті або половина хромосоми, але, переважно він менше, наприклад, примірно 15 Мб або менше, наприклад, примірно 10 Мб або менше, примірно 9 Мб або менше, примірно 8 Мб або менше, примірно 7 Мб або менше, примірно 6 Мб або менше, примірно 5 Мб або менше, примірно 4 Мб або менше, примірно 3 Мб або менше, примірно 2,5 Мб або 2 Мб, або менше, примірно 1 Мб (дорівнює 1000000 пар основ) або менше, або примірно 0,5 Мб (дорівнює 500000 пар основ) або менше, наприклад, примірно 200000 п.о. (дорівнює 200 кілобаз основ) або менше, примірно 100000 п.о. (100 кб) або менше, примірно 50000 п.о. (50 кб) або менше, примірно 25000 п.о. (25 кб) або менше.

Вважається, що генетичний елемент, фрагмент інтрогресії, або ген, або алель, що надає ознаку (як-от підвищена стійкість або толерантність до патогену) "отримують з", або він може бути "отриманий з", або "отримуваний з", або він може бути "отриманий з", або "присутній у" або "виявлений в" рослині або частини рослини, як описано в цьому документі в іншому місці, якщо його можна перенести з рослини, в якій він присутній, в іншу рослину, в якій він не присутній (наприклад, лінія або сорт), використовуючи традиційні методи селекції, не призводячи до фенотипової зміни рослини-реципієнта, за винятком додавання ознаки, що надається генетичним елементом, локусом, фрагментом інтрогресії, геном або алелем. Терміни використовуються взаємозамінно, і генетичний елемент, локус, фрагмент інтрогресії, ген або алель, таким чином, можуть бути перенесені в будь-яке інше генетичне тло, в якому відсутня ознака. Можуть бути використані не тільки рослини, що містять генетичний елемент, локус, фрагмент інтрогресії, ген або алель, але також можуть бути використані і потомство/нащадки від таких рослин, які були відібрані для збереження генетичного елемента, локусу, фрагмента інтрогресії, гену або алелю, і які охоплюються цим документом. Чи містить рослина (або геномна ДНК, клітина або тканина рослини) той же генетичний елемент, локус, фрагмент інтрогресії, ген або алель, які можна отримати від такої рослини, може бути визначено фахівцем в цій галузі техніки з застосуванням щонайменше одного методу, відомого в цій галузі техніки, такого як фенотипічні кількісні аналізи, повногеномне секвенування, аналіз молекулярних маркерів, картування ознаки, "розпис" хромосоми, тести на алелізм і т. ін., або комбінації методів. Слід розуміти, що трансгенні рослини також можуть бути охоплені.

У певних варіантах здійснення цього винаходу полінуклеїнова кислота введена (і геномно інтегрована) рекомбінантно або трансгенно. Полінуклеїнова кислота може бути введена (і геномно інтегрована) в нативний локус, щоб замінити ендегенну полінуклеїнову кислоту (як-от полінуклеїнова кислота, що не надає стійкості до патогену), або може бути введена (і геномно інтегрована) в локус, відмінний від ендегенного локусу (наприклад, шляхом випадкової

інтеграції у геномі). У певних варіантах здійснення цього винаходу спосіб генерування рослини кукурудзи або частини рослини містить трансформацію рослини або частини рослини, переважно рослинної клітини, більш переважно протопласту, за допомогою полінуклеїнової кислоти, яка може бути надана на векторі, як описано в цьому документі в іншому місці. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота має послідовність, відмінну від ендегенної полінуклеїнової кислоти (як-от ендегенна полінуклеїнова кислота, що не надає стійкості до патогену).

Використовувані в цьому документі терміни "генна інженерія", "трансформація" і "генетична модифікація" використовуються в цьому документі як синоніми перенесення виділених і клонованих генів в ДНК, зазвичай хромосомну ДНК або геном, іншого організму.

"Трансгенні" або "генетично модифіковані організми" (ГМО), що використовуються в цьому документі, являють собою організми, генетичний матеріал яких був змінений із застосуванням методів, зазвичай відомих як "технологія рекомбінантної ДНК". Технологія рекомбінантної ДНК охоплює можливість об'єднання молекул ДНК з різних джерел в одну молекулу *ex vivo* (наприклад, в пробірці). Термін "трансгенний" у цьому документі означає генетично модифікований шляхом введення неендогенної послідовності нуклеїнової кислоти. Зазвичай видоспецифічну послідовність нуклеїнової кислоти вводять в клітину в формі, розташуванні або кількості в місці, де послідовність нуклеїнової кислоти не зустрічається в клітині природним шляхом. Ця термінологія зазвичай не охоплює організми, генетичний склад яких був змінений внаслідок звичайного кроссбридингу або "мутагенезної" селекції, оскільки ці способи передують відкриттю методів рекомбінантної ДНК. Термін "нетрансгенний", використовуваний в цьому документі, стосується рослин і харчових продуктів, отриманих від рослин, які не є "трансгенними" або "генетично модифікованими організмами", як визначено вище.

"Трансгенний" або "химерний ген" стосується генетичного локусу, що містить послідовність ДНК, як-от рекомбінантний ген, який був введений в геном рослини шляхом трансформації, як-от трансформація, опосередкована *Agrobacterium*. Рослина, що містить трансген, стабільно інтегрований в її геном, іменується як "трансгенна рослина".

"Редагування генів" або "редагування генома" стосується генної інженерії, при якій ДНК або РНК вставляються, видаляються, модифікуються або замінюються в геномі живого організму. Редагування генів може містити цілеспрямований або нецілеспрямований (випадковий) мутагенез. Цілеспрямований мутагенез може бути здійснений, наприклад, за допомогою дизайнерських нуклеаз, як-от, наприклад, мегануклеази, цинк-пальцеві нуклеази (ZFN), нуклеази на основі ефектора, подібного активатору транскрипції (TALEN), і система кластеризованих регулярних проміжних коротких паліндромних повторів (CRISPR/Cas9). Ці нуклеази створюють сайт-специфічні дволанцюгові розриви (DSB) у бажаних місцях генома. Індуковані дволанцюгові розриви репаруються шляхом негомологічного з'єднання кінців (NHEJ) або гомологічної рекомбінації (HR), що призводить до цілеспрямованих мутацій або модифікацій нуклеїнової кислоти. Застосування дизайнерських нуклеаз особливо придатне для генерації нокаутів або нокадаунів генів. У певних варіантах здійснення цього винаходу, розроблені дизайнерські нуклеази, які специфічно вводять щонайменше один молекулярний маркер (маркерний алель) за цим винаходом, як описано в цьому документі. Системи доставки та експресії систем дизайнерських нуклеаз добре відомі у цій галузі техніки.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, нуклеаза або цілеспрямована/сайт-специфічна/хомінг-нуклеаза являє собою, містить, складається по суті, або складається з (модифікованої) системи або комплексу CRISPR/Cas, (модифікованого) білка Cas, (модифікованого) цинкового пальця, (модифікованої) цинк-пальцевої нуклеази (ZFN), (модифікованого) ефектора, подібного фактору транскрипції (TALE), (модифікованої) ефекторній нуклеази, подібної фактору транскрипції (TALEN), або (модифікованої) мегануклеази. У певних варіантах здійснення цього винаходу, згадана (модифікована) нуклеаза або цілеспрямована/сайт-специфічна/хомінг-нуклеаза являє собою, містить, складається по суті з, або складається з (модифікованої) РНК-направляючої нуклеази. Слід розуміти, що в певних варіантах здійснення цього винаходу нуклеази можуть являти собою кодон, оптимізований для експресії в рослинах. Використовуваний в цьому документі термін "цілеспрямований" обраної послідовності нуклеїнової кислоти означає, що нуклеаза або нуклеазний комплекс діє специфічним для нуклеотидної послідовності чином. Наприклад, в контексті системи CRISPR/Cas спрямовуюча РНК здатна до гібридизації з обраною послідовністю нуклеїнової кислоти. Використовуваний в цьому документі термін "гібридизація" або "гібридування" стосується реакції, в якій щонайменше один полінуклеотид вступає в реакцію з утворенням комплексу, який стабілізується за допомогою водневого зв'язку між основами нуклеотидних залишків, тобто, процес, в якому одноланцюгова молекула нуклеїнової кислоти приєднується до

комплементарного ланцюга нуклеїнової кислоти, тобто, узгоджується з цим спарюванням основ. Стандартні процедури гібридизації описані, наприклад, в роботі Сембрук і співавт. [Молекулярне клонування. Лабораторний посібник, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3-е видання 2001 року]. Водневий зв'язок може здійснюватися шляхом спарювання основ за Уотсоном Криком, зв'язування за Хугстіном або будь-яким іншим специфічним для послідовності способом. Комплекс може містити два ланцюга, що утворюють дуплексну структуру, щонайменше три ланцюга, що утворюють багаторанцюговий комплекс, поодинокий самогібридизуючийся ланцюг або будь-яку їхню комбінацію. Реакція гібридизації може являти собою етап більш широкого процесу, такого як ініціація ПЛР або розщеплення полінуклеотиду ферментом. Послідовність, здатна до гібридизації з цією послідовністю, має назву "комплементу" цієї послідовності. Переважно це означає, що щонайменше 50 %, більш переважно щонайменше 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % або 85 %, більш переважно 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % основ ланцюга нуклеїнової кислоти утворюють пари основ з комплементарним ланцюгом нуклеїнової кислоти. Можливість такого зв'язування залежить від жорсткості умов гібридизації.

Редагування генів може включати транзйентну, індукційну або конститутивну експресію компонентів або систем редагування генів. Редагування генів може включати геномну інтеграцію або епісомальну присутність компонентів або систем редагування генів. Компоненти або системи редагування генів можуть бути запропоновані на векторах, як-от плазміди, які можуть бути доставлені відповідними засобами доставки, як відомо в цій галузі техніки. Кращими векторами є вектори експресії.

Редагування генів може містити пропозицію рекомбінантних матриць для здійснення репарації, що направляється гомологією (HDR). Наприклад, генетичний елемент може бути замінений шляхом редагування гена, при якому запропонована рекомбінантна матриця. ДНК може бути розрізана вище і нижче послідовності, яку необхідно замінити. Отже, послідовність, що підлягає заміні, вирізають з ДНК. За допомогою HDR вирізана послідовність потім замінюється матрицею. У певних варіантах здійснення цього винаходу, маркер (алель) цього винаходу, як описано в цьому документі, може бути запропонований на матриці/як матриця. При конструюванні системи таким чином, що дволанцюгові розриви вводяться вище і нижче відповідної області в геномі рослини, що не містить маркер (алель), цю область вирізають і вона може бути замінена матрицею, що містить маркер (алель) за цим винаходом. Отже, введення маркеру (алелю) за цим винаходом в рослину необов'язково має включати багаторазове зворотне схрещування, зокрема, в рослині зі специфічним генетичним тлом. Аналогічним чином, полінуклеїнова кислота за цим винаходом може бути запропонована на матриці/як матриця. Однак більш переважно полінуклеїнова кислота за цим винаходом може бути згенерована без використання рекомбінаційної матриці, але виключно завдяки дії ендонуклеази, що призводить до розриву дволанцюгової ДНК, який репарується NHEJ, що призводить до утворення інсерційно-делеційного поліморфізму.

У певних варіантах здійснення цього винаходу модифікація нуклеїнової кислоти здійснюється шляхом випадкового мутагенезу. Клітини або організми можуть піддаватися впливу мутагенів, таких як ультрафіолетове випромінювання або мутагенні хімічні речовини (такі, наприклад, як етилметансульфонат (EMS)), і потім відбираються мутанти з бажаними характеристиками. Мутанти можуть, наприклад, бути ідентифіковані за допомогою TILLING (таргетування індукованих локальних уражень в геномах). Спосіб поєднує мутагенез, як-от мутагенез із застосуванням хімічного мутагену, такого як етилметансульфонат (EMS), з чутливим методом скринінгу ДНК, який ідентифікує одноосновні мутації/точкові мутації в гені-мішені. Метод TILLING заснований на утворенні гетеродуплексів ДНК, які утворюються, якщо множинні алелі ампліфікуються за допомогою ПЛР, а потім нагріваються і повільно охолоджуються. При помилковому спарюванні двох ланцюгів ДНК утворюється "вічко", яке потім розщеплюється одноланцюговими нуклеазами. Потім продукти поділяють за розміром, наприклад, за допомогою BPERX. [Див. також роботу МакКаллум і співавт. "Цілеспрямований скринінг на індуковані мутації"; Nat Biotechnol. 2000, квітень; 18(4): 455-7 і МакКаллум і співавт. "Таргетування індукованих локальних уражень в геномах (TILLING) для функціональної геноміки рослин"; Plant Physiol. 2000, червень; 123(2):439-42].

Використовуваний в цьому документі термін "гомозигота" стосується окремої клітини або рослині, що має однакові алелі щонайменше в одному або у всіх локусах. Коли цей термін використовується стосовно певного локусу або гену, це означає щонайменше що локус або ген мають одні й ті ж алелі. Використовуваний в цьому документі термін "гомозиготний" означає генетичний стан, що існує, якщо ідентичні алелі знаходяться у відповідних локусах на гомологічних хромосомах. Використовуваний в цьому документі термін "гетерозигота"

стосується окремої клітини або рослині, що має різні алелі щонайменше в одному або у всіх локусах. Коли цей термін використовується стосовно певного локусу або гену, це означає, щонайменше що локус або ген мають різні алелі. Використовуваний в цьому документі термін "гетерозиготний" означає генетичний стан, що існує, якщо різні алелі знаходяться у відповідних локусах на гомологічних хромосомах. У певних варіантах здійснення цього винаходу гаплотип і/або щонайменше один маркер, як описано в цьому документі, є гомозиготним. У певних варіантах здійснення цього винаходу гаплотип і/або щонайменше один маркер, як описано в цьому документі, є гетерозиготним. У певних варіантах здійснення цього винаходу алель гаплотипу і/або щонайменше один алель маркера, як описано в цьому документі, є гомозиготним. У певних варіантах здійснення цього винаходу, алель гаплотипу і/або щонайменше один алель маркера, як описано в цьому документі, є гетерозиготним.

Використовуваний в цьому документі термін "ідентичність послідовності" стосується ступеня ідентичності між будь-якої такою послідовністю нуклеїнової кислоти і цілеспрямованою послідовністю нуклеїнової кислоти. Відсоток ідентичності послідовності обчислюють шляхом визначення кількості збіжних положень у вирівняних послідовностях нуклеїнової кислоти, ділення кількості збіжних положень на загальну кількість вирівняних нуклеотидів, і множення на 100. Збіжне положення стосується положення, в якому ідентичні нуклеотиди зустрічаються в одному і тому ж положенні в вирівняних послідовностях нуклеїнової кислоти. Відсоток ідентичності послідовності також може бути визначений для будь-якої амінокислотної послідовності. Для визначення відсотка ідентичності послідовності, цілеспрямовану послідовність нуклеїнової кислоти або амінокислоти порівнюють з ідентифікованою послідовністю нуклеїнової кислоти або амінокислоти із застосуванням програми BLAST 2 Sequences (Bl2seq) з автономної версії BLASTZ, що містить BLASTN і BLASTP. Цю автономну версію BLASTZ можна отримати з [веб-сайту Fish & Richardson [Всесвітня павутина за адресою fr.com/blast] або з веб-сайту Національного центру біотехнологічної інформації уряду США [Всесвітня павутина за адресою.ncbi.nlm.nih.gov]]. Інструкції, що пояснюють, як використовувати програму Bl2seq, можна знайти у файлі readme, що додається до BLASTZ. Bl2seq виконує порівняння між двома послідовностями із застосуванням алгоритму BLASTN або BLASTP.

BLASTN використовується для порівняння послідовностей нуклеїнових кислот, тоді як BLASTP використовується для порівняння амінокислотних послідовностей. Для порівняння двох послідовностей нуклеїнової кислоти, параметри встановлюються наступним чином: - і встановлюється в файл, що містить першу порівнювану послідовність нуклеїнової кислоти (наприклад, C:\seq л.txt); - j встановлюється у файл, що містить другу послідовність нуклеїнової кислоти, що підлягає порівнянню (наприклад, C:\seq2.txt); - p встановлюється на blastn; - o у файл з будь-яким бажаним ім'ям (наприклад, C:\output.txt); - q встановлюється на -1; - r встановлюється на 2; а для всіх інших параметрів залишаються їхні значення, встановлені за замовчуванням. Наступна команда буде генерувати вихідний файл, що містить порівняння двох послідовностей: C:\B12seq-i c:\seq1.txt-j c:\seq2.txt-p blastn-o c:\output.txt-q-1-r 2. Якщо послідовність-мішень має гомологію з будь-якою ділянкою ідентифікованої послідовності, то спеціальний вихідний файл буде представляти ті області гомології як вирівняні послідовності. Якщо послідовність-мішень не має загальної гомології з будь-якою частиною ідентифікованої послідовності, то в спеціальному вихідному файлі не будуть представлені вирівняні послідовності. Після вирівнювання визначають довжину шляхом підрахунку кількості послідовних нуклеотидів з послідовності-мішені, що представлена у вирівнюванні з послідовністю з ідентифікованої послідовності, починаючи з будь-якого збіжного положення і закінчуючи будь-яким іншим збіжним положенням. Збіжне положення являє собою будь-яке положення, в якому ідентичний нуклеотид представлений як в послідовності-мішені, так і в ідентифікованій послідовності. Гепи, представлені в послідовності-мішені, не враховуються, оскільки гепи не є нуклеотидами. Аналогічним чином, гепи, представлені в ідентифікованій послідовності, не враховуються, оскільки враховуються нуклеотиди послідовності-мішені, а не нуклеотиди з ідентифікованої послідовності. Відсоток ідентичності за конкретною довжиною визначають шляхом підрахунку кількості збіжних положень по цій довжині і ділення цієї кількості на довжину, а потім множення отриманого значення на 100. Наприклад, якщо (i) послідовність-мішень нуклеїнової кислоти з 500 основами порівнюють з розглянутою послідовністю нуклеїнової кислоти, (ii) програма Bl2seq представляє 200 основ з послідовності-мішені, що вирівняна з областю розглянутої послідовності, де перша і остання основа цієї області з 200 основ збігаються, і (iii) кількість збігів за цих 200 вирівняних основ дорівнює 180, то послідовність-мішень нуклеїнової кислоти з 500 основами має довжину 200, а ідентичність послідовності по цій довжині становить 90 % (тобто, $180/200 \times 100 = 90$). Слід розуміти, що різні області в межах однієї послідовності-мішені нуклеїнової кислоти, яка вирівнюється з ідентифікованою

послідовністю, кожна може мати свій власний відсоток ідентичності. Слід зазначити, що значення відсотка ідентичності округлюють до найближчої десятої частки. Наприклад, 78,11, 78,12, 78,13 і 78,14 округлюють до 78,1, а 78,15, 78,16, 78,17, 78,18 і 78,19 округлюють до 78,2. Також слід зазначити, що значення довжини завжди буде цілим числом.

Термін "послідовність", при використанні в цьому документі, стосується нуклеотидної послідовності (послідовностей), полінуклеотиду (полінуклеотидів), послідовності (послідовностей) нуклеїнової кислоти, нуклеїнової кислоти (кислот), молекули нуклеїнової кислоти, пептидів, поліпептидів і білків, залежно від контексту, в якому використовується термін "послідовність". Терміни "нуклеотидна послідовність (послідовності)", "полінуклеотид (полінуклеотиди)", "послідовність (послідовності) нуклеїнової кислоти", "нуклеїнова кислота (кислоти)", "молекула нуклеїнової кислоти", "полінуклеїнова кислота (кислоти)", використовуються в цьому документі взаємозамінно і стосуються нуклеотидів, або рибонуклеотидів, або дезоксирибонуклеотидів, або їхні комбінації в полімерній нерозгалуженій формі будь-якої довжини. Послідовності нуклеїнової кислоти включають ДНК, кДНК, геномну ДНК, РНК, синтетичні форми і змішані полімери, як смислові, так і антисмислові ланцюги, або вони можуть містити ненатуральні або дериватизовані нуклеотидні основи, що буде цілком зрозуміло фахівцям у цій галузі техніки.

"Виділена послідовність нуклеїнової кислоти" або "виділена ДНК" стосується послідовності нуклеїнової кислоти, яка більше не знаходиться в природному середовищі, з якого вона була, наприклад, послідовність нуклеїнової кислоти в бактеріальній клітині-хазяїні або в ядерному, або пластидному геномі рослини. При згадці в цьому документі "послідовності", мається на увазі, що мається на увазі молекула, що має таку послідовність, наприклад, молекула нуклеїнової кислоти. "Клітина-хазяїн", або "рекомбінантна клітина-хазяїн", або "трансформована клітина" є термінами, що стосуються нової окремої клітини (або організму), що виникає в результаті введення в зазначену клітину щонайменше однієї молекули нуклеїнової кислоти. Клітина-хазяїн, переважно являє собою рослинну клітину або бактеріальну клітину. Клітина-хазяїн може містити нуклеїнову кислоту у вигляді молекули, що позахромосомно (епісомально) реплікується, або вона містить нуклеїнову кислоту, що інтегрована в ядерний або пластидний геном клітини-хазяїна, або у вигляді введеної хромосоми, наприклад, мініхромосоми.

Коли наводиться посилання на послідовність нуклеїнової кислоти (наприклад, ДНК або геномну ДНК), яка має "суттєву ідентичність послідовності" еталонної послідовності, або яка має ідентичність послідовності, що становить щонайменше 80 % >, наприклад, щонайменше 85 %, 90 %, 95 %, 98 % > або 99 % > ідентичність послідовності нуклеїнової кислоти еталонної послідовності, в одному варіанті здійснення цього винаходу, згадана нуклеотидна послідовність вважається по суті ідентичною цій нуклеотидній послідовності, і може бути ідентифікована із застосуванням жорстких умов гібридизації. В іншому варіанті здійснення цього винаходу послідовність нуклеїнової кислоти містить щонайменше одну мутацію, в порівнянні з цією послідовністю нуклеотидів, але все ж вона може бути ідентифікована із застосуванням жорстких умов гібридизації. "Жорсткі умови гібридизації" можуть бути використані для ідентифікації нуклеотидних послідовностей, які по суті ідентичні цій нуклеотидній послідовності. Жорсткі умови залежать від послідовності і будуть відрізнятися в різних обставинах. Здебільшого, жорсткі умови вибирають примірно на 5 °C нижче, ніж термічна температура плавлення (T_m) для конкретних послідовностей за певною іонною силою і рН. T_m являє собою температуру (за певною іонною силою та рН), при якій 50 % послідовності-мішені гібридується з ідеально збігаючимся зондом. Здебільшого, обирають жорсткі умови, за яких концентрація солі становить примірно 0,02 моляра при рН 7, а температура становить щонайменше 60 °C. Зниження концентрації солі і/або підвищення температури підвищує жорсткість. Жорсткими умовами гібридизації РНК-ДНК (Нозерн-блоти із застосуванням зонда з, наприклад, 100 нуклеотидів) є, наприклад, умови, які включають щонайменше одну промивку в 0,2 X SSC (розчин цитрату та хлориду натрію) при температурі 63 °C протягом 20 хвилин, або еквівалентні умови. Жорсткими умовами гібридизації ДНК-ДНК (Саузерн-блоти із застосуванням зонда з, наприклад, 100 нуклеотидів) є, наприклад, умови, які включають щонайменше одну промивку (зазвичай 2) в 0,2 X SSC при температурі щонайменше 50 °C, зазвичай примірно 55 °C, протягом 20 хв або еквівалентні умови. Див. також Сембрук і співавт. (1989) і Сембрук і Расселл (2001).

При використанні в цьому документі, термін "поліпептид" або "білок" (обидва терміни використовуються в цьому документі взаємозамінно) означає пептид, білок або поліпептид, який охоплює амінокислотні ланцюги певної довжини, при цьому, амінокислотні залишки зчеплені ковалентними пептидними зв'язками. Однак пептидоміметікі таких білків/поліпептидів, при цьому, амінокислота (амінокислоти) і/або пептидний зв'язок (зв'язки) були замінені функціональними аналогами, також охоплюються цим винаходом, а також інші амінокислоти,

відмінні 20 амінокислот, кодованих генами, такі як селеноцистеїн. Пептиди, олігопептиди і білки можуть бути названі поліпептидами. Термін "поліпептид" також стосується, і не виключає, модифікацій поліпептиду, наприклад, глікозилювання, ацетилювання, фосфорилування тощо. Такі модифікації добре описані в основних документах і в більш докладних монографіях, а також в дослідницькій літературі.

Амінокислотні заміни охоплюють зміни амінокислот, при яких амінокислота замінюється іншим амінокислотним залишком, що зустрічається в природі. Такі заміни можуть бути класифіковані як "консервативні <1>", при яких амінокислотний залишок, що міститься в білку дикого типу, замінений іншою амінокислотою аналогічного характеру, що зустрічається в природі, наприклад Gly<->Ala, Val<->Ile<->Leu, Asp<->Glu, Lys<->Arg, Asn<->Gln або Phe<->Tyr<->Tyr. Заміни, що охоплюються цим винаходом, також можуть бути "неконсервативними", при яких амінокислотний залишок, який присутній в білку дикого типу, замінений амінокислотою з іншими властивостями, такої як амінокислота з іншої групи, що зустрічається в природі, (наприклад, заміна зарядженої або гідрофобної амінокислоти кислоти аланіном). Термін "подібні амінокислоти", в контексті цього документа, стосуються амінокислот, які мають подібні бічні ланцюги амінокислот, тобто, амінокислот, які мають полярні, неполярні або практично нейтральні бічні ланцюги. Термін "не подібні амінокислоти", в контексті цього документа, стосується амінокислот, які мають різні бічні ланцюги амінокислот, наприклад, амінокислота з полярним бічним ланцюгом, не схожа з амінокислотою з неполярним бічним ланцюгом. Полярні бічні ланцюги зазвичай мають тенденцію бути присутніми на поверхні білка, де вони можуть взаємодіяти з водним середовищем, що знаходиться в клітинах ("гідрофільні" амінокислоти). З іншого боку, "неполярні" амінокислоти, здебільшого, знаходяться в центрі білка, де вони можуть взаємодіяти з подібними неполярними сусідами ("гідрофобні амінокислоти"). Прикладами амінокислот, що мають полярні бічні ланцюги, є аргінін, аспарагін, аспартат, цистеїн, глутамін, глутамат, гістидин, лізин, серин і треонін (всі гідрофільні, за винятком цистеїну, який є гідрофобним). Прикладами амінокислот, які мають неполярні бічні ланцюги, є аланін, гліцин, ізолейцин, лейцин, метіонін, фенілаланін, пролін і триптофан (всі гідрофобні, за винятком гліцину, який є нейтральним).

Термін "ген", використовуваний в цьому документі, стосується полімерної форми нуклеотидів будь-якої довжини, або рибонуклеотидів, або дезоксирибонуклеотидів. Цей термін включає дво- і одноланцюгові ДНК і РНК. Він також включає відомі типи модифікацій, наприклад, метилювання, "кепи", заміни щонайменше одного з нуклеотидів, що зустрічаються в природі, аналогом. Переважно ген містить кодуєчу послідовність, що кодує певний в цьому документі поліпептид. "Кодуюча послідовність" являє собою нуклеотидну послідовність, яка транскрибується в мРНК і/або транслюється в поліпептид при розміщенні або під контролем відповідних регуляторних послідовностей. Межі кодуєчої послідовності визначаються початковим кодоном трансляції на 5'-кінці і стоп-кодоном трансляції на 3'-кінці. Кодуюча послідовність може включати, але цим не обмежується, мРНК, кДНК, послідовності рекомбінантних нуклеїнових кислот або геномну ДНК, в той час як інтрони також можуть бути присутніми за певних обставин.

Використовуваний в цьому документі термін "ендогенний" стосується гену або алелю, який присутній в його природному розташуванні в геномі. Термін "ендогенний" може використовуватися взаємозамінно з терміном "нативний". Це, однак, не виключає присутності щонайменше однієї відмінності нуклеїнової кислоти від алелю дикого типу. У конкретних варіантах здійснення цього винаходу, відміна від алеля дикого типу може бути обмежена менше 9, переважно менше 6, більш конкретно, менше 3 відмінностями нуклеотидів, наприклад, відмінністю в 0 нуклеотидів. Більш конкретно, відмінність від послідовності дикого типу може полягати тільки в одному нуклеотиді. Переважно ендогенний алель кодує модифікований білок, що має менше 9, переважно менше 6, більш конкретно, менше 3 і навіть, більш переважно тільки одну відмінність або відсутність відмінності амінокислоти від білка дикого типу.

Використовуваний в цьому документі термін "екзогенний полінуклеотид" стосується полінуклеотиду, такого як ген (або кДНК) або алель, який є або був рекомбінантно введений в клітину (або рослину). Екзогенний полінуклеотид може бути епісомально або геномно інтегрованим. Інтеграція може бути випадковою або сайт-спрямованою. Інтеграція може включати заміну відповідного ендогенного полінуклеотиду. Слід розуміти, що екзогенний полінуклеотид природним чином не присутній в клітині або рослині.

Використовуваний в цьому документі B73 еталонний геном AGPv4 стосується складання B73 RefGen_v4 (також відомої як AGPv4, B73 RefGen_v4), як зазначено в базі даних генетики і геноміки кукурудзи ([https://www.maizegdb.org/genome/genome_assembly/B73 %20RefGen_v2](https://www.maizegdb.org/genome/genome_assembly/B73%20RefGen_v2)).

Використовуваний в цьому документі B73 еталонний геном AGPv4 (або AGPv04) стосується складання B73 RefGen_v4 (також відомої як AGPv4, B73 RefGen_v4), як зазначено в базі даних генетики і геноміки кукурудзи (https://www.maizegdb.org/genome/genome_assembly/Zm-B73-REFERENCE-GRAMENE-4.0).

Способи скринінгу на присутність полінуклеїнової кислоти за цим винаходом або (молекулярного) маркеру (маркерів) (алелів), як описано в цьому документі, відомі в цій галузі техніки. Без обмежень, скринінг може охоплювати або містити секвенування, методи на основі гібридизації (такі як (динамічна) алель-специфічна гібридизація, молекулярні маяки, SNP на мікрочіпах), методи на основі ферментів (такі як ПЛР, KASP (конкурентна алель-специфічна ПЛР), RFLP, ALFP, RAPD, флєп-ендонуклеаза, подовження праймера, 5'-нуклеаза, кількісний аналіз олігонуклеотидної лігази), методи постампліфікації на основі фізичних властивостей ДНК (як-от одноланцюговий конформаційний поліморфізм, гель-електрофорез в температурному градієнті, денатуруюча високоефективна рідинна хроматографія, плавлення з високою роздільною здатністю всього амплікону білків, що зв'язують помилково спарені ДНК, SNPlex (платформа для генотипування SNP), сюрвеєрський кількісний аналіз нуклеази) тощо.

Використовувані в цьому документі терміни "підвищена толерантність до патогену" і "підвищена стійкість до патогену" стосуються будь-якого полегшення, зменшення вияву, поліпшення, або до будь-якої їхній комбінації будь-якого симптому (такого як пошкодження або втрата біомаси) при зараженні патогеном. Підвищена стійкість або толерантність до патогену, які згадані в цьому документі, можуть також стосуватися здатності, з якою рослина підтримує, наприклад, продукування своєю біомаси (як-от продукування придатної для збирання біомаси, як-от врожайність насіння) після або під час зараження патогеном. Стійка до патогену або толерантна рослина, рослинна клітина або частина рослини можуть належать в цьому документі до рослини, рослинній клітині або частини рослини, відповідно, що має підвищену стійкість/толерантність до патогену, в порівнянні з батьківською рослиною, з якої вони отримані (наприклад, що не містить гаплотип або щонайменше один молекулярний маркер (алель), або полінуклеїнової кислоти за цим винаходом, як описано в цьому документі). Стійкість може стосуватися в цьому документі здатності рослини обмежувати розмноження патогена. Толерантність може стосуватися в цьому документі здатності рослини знижувати вплив інфекції на її пристосованість незалежно від рівня розмноження патогена. Способи визначення стійкості/толерантності до патогену відомі фахівцям у цій галузі техніки, такі як візуальна оцінка інфікування патогеном або патоген-індукованого пошкодження, визначення біомаси (врожайності) тощо. Використовувані в цьому документі терміни "підвищена толерантність до патогену" і "підвищена стійкість до патогену" можуть використовуватися взаємозамінно з термінами "знижена чутливість" або "знижена сприйнятливість" до патогенів. Відповідно, рослина, частина рослини або популяція рослини за цим винаходом, яка є більш стійкою або більш толерантною до патогену, вважаються менш чутливими до такого патогену. Термін "менш чутливий" або "менш сприйнятливий", при використанні в цьому документі, може розглядатися як "більш толерантний" або "більш стійкий". Аналогічним чином, термін "більш толерантний" або "більш стійкий" може, навпаки, розглядатися як "менш чутливий" або "менш сприйнятливий". Термін "більш чутливий" або "більш сприйнятливий", коли використовується в цьому документі, може, навпаки, розглядатися як "менш толерантний" або "менш стійкий". Аналогічним чином, термін "менш толерантний" або "менш стійкий" може, навпаки, розглядатися як "більш чутливий" або "більш сприйнятливий".

За допомогою прикладу, і без обмеження, підвищення стійкості або толерантності до патогену може бути оцінено на основі кількох критеріїв, таких як (патогенні) симптоми, які, наприклад, можуть бути класифіковані згідно з наведеною нижче Таблицею.

Схема класифікації в балах для експериментів з фенотипування в польових випробуваннях в різних місцях з природною та штучною інокуляцією *H. turcicum* [від Deutsche Maiskomitee (DMK, Німецький комітет з кукурудзи); сорт AG 27.02.02; DMK J. Rath; RP Freiburg H.J. Imgraben)]

Класифікаційний бал	Фенотип
1	Рослина не виявляє симптомів захворювання, 0 %
2	Початок зараження, видно перші невеликі плями (менше 2 см). Уражено менше 5 % поверхні листа
3	Деякі плями розвинулися на стадії листа. Уражено 5-10 % поверхні листа.
4	Уражено 10-20 % поверхні листа. Виразно видно плями на кількох стадіях листа.
5	Уражено 20-40 % поверхні листа. Плями починають зливатися.
6	Уражено 40-60 % поверхні листа. Системне зараження, видиме на листі.
7	Уражено 60-80 % поверхні листа. Приблизно половина листа знищена або висохла через грибкове зараження.
8	Уражено 80-90 % поверхні листа. Більш половини листа знищена або висохла через грибкове зараження.
9	Уражено 90-100 % поверхні листа. Рослини майже повністю висохли.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, підвищена стійкість або толерантність до патогену тягне за собою нижчий класифікаційний бал у порівнянні з рослиною, позбавленою підвищеної стійкості або толерантності, такий як щонайменше один, щонайменше два, щонайменше три, щонайменше чотири, щонайменше п'ять класів класифікаційних очок або балів.

Як зазначено в цьому документі, поліуклеїнова кислота за цим винаходом, як описано в цьому документі, вважається фланкованою певними молекулярними маркерами або алелями молекулярних маркерів, якщо поліуклеїнова кислота міститься в поліуклеїновій кислоті, при цьому, відповідно, перший маркер (алель) розташований вище (тобто на 5') згаданої поліуклеїнової кислоти, а другий маркер (алель) розташований нижче (тобто на 3') згаданої поліуклеїнової кислоти. Такі перший і другий маркери (алелі) можуть межувати з поліуклеїновою кислотою. Нуклеїнова кислота може так само містити такий перший і другий маркер (алель), наприклад, відповідно, на 5' і 3'-кінці або поблизу них, наприклад, відповідно, в межах 50 кб від 5'- і 3'-кінця, переважно, в межах 10 кб від 5'- і 3'-кінця, наприклад, в межах 5 кб від 5'- і 3'-кінця, в межах 1 кб від 5'- і 3'-кінця або менше.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, введення (в геном), як зазначено в цьому документі, містить трансгенез.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, введення (в геном), як зазначено в цьому документі, містить трансформацію.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, введення (в геном), як зазначено в цьому документі, містить рекомбінацію, таку як гомологічна рекомбінація.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, введення (в геном), як зазначено в цьому документі, містить мутагенез.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, введення (в геном), як зазначено в цьому документі, містить інтрогресію. У певних варіантах здійснення введення в геном, як зазначено в цьому документі, містить інтрогресію.

У певних варіантах здійснення введення в геном, як зазначено в цьому документі, містить введення в геном в часті рослини. У певних варіантах здійснення цього винаходу, частина рослини являє собою орган рослини. У певних варіантах здійснення цього винаходу, частина рослини являє собою рослинну тканину. У певних варіантах здійснення цього винаходу, частина рослини являє собою рослинну клітину. У певних варіантах здійснення цього винаходу, частина рослини являє собою протопласт.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, введення в геном, як зазначено в цьому документі, містить введення в геном *in vitro*. У певних варіантах здійснення цього винаходу, введення в геном, як зазначено в цьому документі, містить введення в геном *in vivo*.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, спосіб генерування рослини кукурудзи або частини рослини, такої як рослина кукурудзи або частина рослини, що має (підвищену) стійкість і/або толерантність до патогену, містить трансформацію рослини або частини рослини, переважно рослинної клітини, або рослинної тканини, більш переважно протопласту, за допомогою поліуклеїнової кислоти, як описано в іншому місці цього документа, і, необов'язково, регенерацію зі згаданої рослинної клітини або переважно з протопласту.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, трансформована рослина або частина рослини не містить ендогенної полінуклеїнової кислоти за цим винаходом, як описано в цьому документі.

5 У певних варіантах здійснення цього винаходу трансформована рослина або частина рослини не містить ендогенно щонайменше один молекулярний маркер (алель) за цим винаходом, як описано в цьому документі.

10 У певних варіантах здійснення цього винаходу, способи отримання або генерування рослин, або частин рослин, як описано в цьому документі, за цим винаходом, включають або містять трансгенез і/або редагування генів, як-от включення CRISPR/Cas, TALEN, ZFN, мегануклеази; (індукований) мутагенез, який може або не може бути випадковим мутагенезом, таким як TILLING.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, способи отримання рослин або частин рослин, описані в цьому документі, за цим винаходом, не включають або не містять трансгенез, редагування генів і/або мутагенез.

15 У певних варіантах здійснення цього винаходу, способи отримання рослин або частин рослин, як описано в цьому документі, за цим винаходом, включають, містять або складаються з селекції і/або відбору.

20 У певних варіантах здійснення цього винаходу, способи отримання рослин або частин рослин, як описано в цьому документі, за цим винаходом, не включають, не містять або не складаються з селекції.

В одному аспекті, цей винахід стосується рослини кукурудзи або частини рослини, отриманої або отримуваної способами за цим винаходом, як описано в цьому документі, такими як способи ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, або способи генерування рослини кукурудзи або частини рослини. Цей винахід також стосується потомства таких рослин.

25 В одному аспекті, цей винахід стосується рослини кукурудзи або частини рослини, що містить полінуклеїнову кислоту за цим винаходом, як описано в цьому документі. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота є гомозиготною. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота є гетерозиготною.

30 В одному аспекті, цей винахід стосується рослини кукурудзи або частини рослини, що містить будь-який, щонайменше один молекулярний маркер (алель) за цим винаходом, як описано в цьому документі. У певних варіантах здійснення цього винаходу, молекулярний маркер (алель) є гомозиготним. У певних варіантах здійснення цього винаходу, молекулярний маркер (алель) є гетерозиготним.

35 У деяких варіантах здійснення цього винаходу рослина кукурудзи або її частина не зустрічається в природі. У певних варіантах здійснення цього винаходу, рослина кукурудзи або частина рослини не є рослиною кукурудзи або частиною рослини, розкритої в [WO 2019/038326].

40 У певних варіантах здійснення цього винаходу, рослина або частина рослини містить щонайменше один молекулярний маркер (алель) вище (тобто на 5') гена RLK1, і щонайменше один молекулярний маркер (алель) нижче (т.е., на 3') гена RLK1.

45 У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота не містить щонайменше один (що надає стійкість, або HT2, або HT3) молекулярний маркер (алель) PZE-108092843, PZA-003182005, PZE-108094590, PZE-108096610, PZE-108096469, MA0043 та MA0025, як описано у цьому документі в іншому місці. У певних варіантах здійснення цього винаходу, рослина або частина рослини містить щонайменше один з молекулярних маркерів (алелів) вище (тобто на 5') гена RLK1, і щонайменше один з молекулярних маркерів (алелів) нижче (т.е., на 3') гена RLK1.

50 У певних варіантах здійснення цього винаходу, рослина кукурудзи не є сортом кукурудзи. У певних варіантах здійснення цього винаходу рослину не отримують виключно за допомогою по суті біологічного процесу. У певних варіантах здійснення цього винаходу, рослину отримують способом, який містить щонайменше один етап, відмінний від схрещування, тобто, скринінг на присутність полінуклеотиду, як описано в цьому документі.

55 У певних варіантах здійснення цього винаходу, рослина кукурудзи або частина рослини є трансгенною, з редагованими генами або піддана мутагенезу. У певних варіантах здійснення цього винаходу, рослина кукурудзи або частина рослини є трансгенною, з редагованими генами або піддана мутагенезу для того, щоб містити щонайменше один молекулярний маркер (алель), або щонайменше одну полінуклеїнову кислоту за цим винаходом, як описано у цьому документі.

60 Як описано в цьому документі в іншому місці, у певних варіантах здійснення цього винаходу, така рослина кукурудзи або частина рослини не містить ендогенно зазначені полінуклеїнові кислоти.

В одному аспекті, цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить щонайменше один молекулярний маркер (алель) за цим винаходом, як описано в цьому документі.

В одному аспекті, цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить щонайменше один молекулярний маркер (алель) за цим винаходом, як описано в цьому документі, або його комплемент, або зворотний комплемент.

У певних варіантах здійснення цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридується з молекулярним маркером (алелем) MA0045, його комплементом або зворотним комплементом. У певних варіантах здійснення, винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридується з молекулярним маркером (алелем) MA0062, його комплементом або зворотним комплементом. У певних варіантах здійснення цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридується з молекулярним маркером (алелем) MA0063, його комплементом або зворотним комплементом. У певних варіантах здійснення цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридується з молекулярним маркером (алелем) MA0070, його комплементом або зворотним комплементом. У певних варіантах здійснення цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридується з молекулярним маркером (алелем) MA0071, його комплементом або зворотним комплементом. У певних варіантах здійснення цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридується з молекулярним маркером (алелем) MA0064, його комплементом або зворотним комплементом. У певних варіантах здійснення цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридується з молекулярним маркером (алелем) PZE-108095339, його комплементом або зворотним комплементом. У певних варіантах здійснення цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридується з молекулярним маркером (алелем) Affx-91328160, його комплементом або зворотним комплементом.

У певних варіантах здійснення полінуклеїнова кислота містить (або специфічно гібридується з полінуклеїною кислотою, що має), щонайменше одне положення, що відповідає положенням в еталонному геномі кукурудзи B73 (в хромосомі 8) AGPv04, як зазначено в Таблиці нижче.

Назва маркера	Положення AGPv04	Алель HT2/HT3	Альтернативний алель
Affx-91328160	156372823	G	A
PZE-108095339	156378424	G	A
MA0064	156541890	C	T
MA0063	156543061	T	C
MA0070	156694565	T	G
MA0071	156694641	C	T
MA0062	156772431	G	T
MA0045	156789751	A	C

Нуклеотиди (SNP) у положеннях, зазначених для алелю HT2/HT3, дозволяють проводити скринінг або ідентифікацію фенотипу стійкості за цим винаходом. Нуклеотиди (SNP) у положеннях, зазначених для альтернативного алелю, дозволяють проводити скринінг або ідентифікувати фенотип без стійкості. Слід розуміти, що для ідентифікації алелю без стійкості, зазначені нуклеотиди SNP можуть відрізнитися від зазначених у Таблиці (за умови, що вони відрізняються від нуклеотидів SNP, зазначених для алелю HT2/HT3).

У певних варіантах здійснення, цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридується з молекулярним маркером (алелем) MA0045 і щонайменше з 14 нуклеотидами вище і/або нижче (що відносяться до відповідних нуклеотидів хромосоми 8 геному кукурудзи B73 AGPv04), його комплементом або зворотним комплементом. У певних варіантах здійснення, цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридується з молекулярним маркером (алелем) MA0062 і щонайменше з 14 нуклеотидами вище і/або нижче (що відносяться до відповідних нуклеотидів хромосоми 8 геному кукурудзи B73 AGPv04), його комплементом або зворотним комплементом. У певних варіантах здійснення, цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридується з молекулярним маркером (алелем) MA0063 і щонайменше з 14 нуклеотидами вище і/або нижче (що відносяться до відповідних нуклеотидів хромосоми 8 геному кукурудзи B73 AGPv04), його комплементом або зворотним комплементом.

У певних варіантах здійснення, цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридизується з фрагментом геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005, і що містить молекулярний маркер (алель) MA0062 або комплемент, або зворотний комплемент фрагменту.

5 У певних варіантах здійснення, цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридизується з фрагментом геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005, і що містить молекулярний маркер (алель) MA0063 або комплемент, або зворотний комплемент фрагменту.

10 У певних варіантах здійснення, цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридизується з фрагментом геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005, і що містить молекулярний маркер (алель) MA0070 або комплемент, або зворотний комплемент фрагменту.

15 У певних варіантах здійснення, цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридизується з фрагментом геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005, і що містить молекулярний маркер (алель) MA0071 або комплемент, або зворотний комплемент фрагменту.

20 У певних варіантах здійснення, цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридизується з фрагментом геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005, і що містить молекулярний маркер (алель) MA0064 або комплемент, або зворотний комплемент фрагменту.

25 У певних варіантах здійснення, цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридизується з фрагментом геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005, і що містить молекулярний маркер (алель) Affx-91328160 або комплемент, або зворотний комплемент фрагменту. У певних варіантах здійснення, цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить або специфічно гібридизується з фрагментом геномного інтервалу хромосоми 8 *Zea mays* між молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005, і що містить молекулярний маркер (алель) PZE-108095339 або комплемент, або зворотний комплемент фрагменту.

30 Слід розуміти, що полінуклеїнові кислоти за цим винаходом містять або специфічно гібридизуються щонайменше з одним (НТ2/НТ3 або альтернативним) молекулярним маркером (алелем) і додатковими 5' і/або 3' суміжними нуклеотидами (природними), що фланкують відповідний маркер (алель) (або його комплемент, або зворотний комплемент). У цьому контексті, кількість фланкуючих нуклеотидів може, у певних варіантах здійснення цього винаходу, становити щонайменше 14 або 15 нуклеотидів (які можуть або не можуть бути повністю 5' або повністю 3' фланкуючими нуклеотидами, як-от, наприклад, 5 3' фланкуючих нуклеотидів плюс 10 5' фланкуючих нуклеотидів). У певних варіантах здійснення цього винаходу молекулярний маркер (алель) за цим винаходом (або його комплемент) є найбільш 5' нуклеотидом полінуклеїнової кислоти. У певних варіантах здійснення цього винаходу молекулярний маркер (алель) за цим винаходом (або його комплемент) є другим 5' нуклеотидом полінуклеїнової кислоти. У певних варіантах здійснення цього винаходу молекулярний маркер (алель) за цим винаходом (або його комплемент) є третім найбільш 5' нуклеотидом полінуклеїнової кислоти. У певних варіантах здійснення цього винаходу молекулярний маркер (алель) за цим винаходом (або його комплемент) є найбільш 3' нуклеотидом полінуклеїнової кислоти. У певних варіантах здійснення цього винаходу молекулярний маркер (алель) за цим винаходом (або його комплемент) є другим 3' нуклеотидом полінуклеїнової кислоти. У певних варіантах здійснення цього винаходу молекулярний маркер (алель) за цим винаходом (або його комплемент) є третім найбільш 3' нуклеотидом полінуклеїнової кислоти.

50 У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота містить щонайменше 15 нуклеотидів, наприклад, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або 25 нуклеотидів, наприклад, щонайменше 30, 35, 40, 45 або 50 нуклеотидів, наприклад, щонайменше 100, 200, 300 або 500 нуклеотидів.

55 У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота містить максимально 1500 нуклеотидів, наприклад, 1200, 1000, 800, 600, 400, 200 нуклеотидів, наприклад, максимально 100, 80, 60, 50, 40 або 30 нуклеотидів.

60 У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота містить щонайменше 15 нуклеотидів, наприклад, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або 25 нуклеотидів, наприклад, щонайменше 30, 35, 40, 45 або 50 нуклеотидів, наприклад, щонайменше 100, 200, 300 або 500 нуклеотидів, і полінуклеїнова кислота містить максимально 1500 нуклеотидів, наприклад, 1200,

1000, 800, 600, 400, 200 нуклеотидів, наприклад, максимально 100, 80, 60, 50, 40 або 30 нуклеотидів.

У певних варіантах здійснення цього винаходу (виділений) полінуклеотид має довжину в діапазоні від 15 до 500 нуклеотидів, переважно від 15 до 100 нуклеотидів, переважно від 15 до 50 нуклеотидів, більш переважно від 15 до 35 нуклеотидів.

У певних варіантах здійснення цього винаходу (виділений) полінуклеотид являє собою праймер або зонд.

У певних варіантах здійснення цього винаходу (виділений) полінуклеотид являє собою алель-специфічний праймер або зонд.

У певних варіантах здійснення цього винаходу (виділений) полінуклеотид являє собою праймер KASP (конкурентна алель-специфічна ПЛР). Праймери (KASP) добре відомі в цій галузі техніки і можуть бути сконструйовані фахівцем у цій галузі техніки згідно з відомими критеріями. За допомогою додаткових вказівок і без обмежень KASP виконують щонайменше з двома алель-специфічними праймерами (які можуть бути прямими праймерами) і, як правило, одним загальним праймером (який може бути зворотним праймером). Алель-специфічні праймери зазвичай мають подовжені хвостові послідовності (у яких для кожного алель-специфічного праймера надана інша хвостова послідовність). Хвостові послідовності дозволяють включати флуоресцентно мічену комплементарну послідовність, щоб тим самим флуоресцентно розрізняти різні алелі.

У певних варіантах здійснення цього винаходу довжина хвостової послідовності входить у загальну довжину праймера. У певних варіантах здійснення цього винаходу довжина хвостової послідовності не входить у загальну довжину праймера.

У певних варіантах здійснення цього винаходу полінуклеїнова кислота являє собою (ПЛР) праймер або (гібридаційний) зонд. У певних варіантах здійснення цього винаходу полінуклеїнова кислота являє собою алель-специфічний праймер або зонд. У певних варіантах здійснення цього винаходу полінуклеїнова кислота являє собою праймер KASP.

В одному аспекті, цей винахід стосується (виділеної) полінуклеїнової кислоти, що містить (молекулярний) маркер (алель) за цим винаходом, або комплемент, або зворотний комплемент (молекулярного) маркера (алелю) за цим винаходом. У певних варіантах здійснення, цей винахід стосується полінуклеїнової кислоти, що містить щонайменше 10 суміжних нуклеотидів, переважно щонайменше 15 суміжних нуклеотидів або щонайменше 20 суміжних нуклеотидів (молекулярного) маркера (алелю) за цим винаходом, або комплемент, або зворотний комплемент (молекулярного) маркера (алелю) за цим винаходом. У певних варіантах здійснення цього винаходу полінуклеїнова кислота здатна розпізнавати (молекулярний) маркер (алель) за цим винаходом і алель немолекулярного маркера, наприклад, специфічно гібридизуватися з (молекулярним) маркерним алелем за цим винаходом. У певних варіантах здійснення цього винаходу полінуклеїнова кислота або її комплемент або зворотний комплемент (по суті) не гібридизується з (геномної) ДНК, що походить з інбредної лінії кукурудзи B73, або не зв'язується з нею. У певних варіантах здійснення цього винаходу, послідовність полінуклеїнової кислоти або її комплемент або зворотний комплемент не зустрічається або не присутній в інбредної лінії кукурудзи B73.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота містить послідовність, представлену в будь-якому з SEQ ID NO: 4-51, її комплемент або зворотний комплемент. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота складається по суті з послідовності, представленій в будь-якому з SEQ ID NO: 4-51, її комплементу або зворотного комплементу. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота складається з послідовності, представленій в будь-якому з SEQ ID NO: 4-51, її комплементу або зворотного комплементу. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота містить фрагмент, що має щонайменше 15 найбільш 3' суміжних нуклеотидів послідовності, представленій в будь-якому з SEQ ID NO: 4-51, її комплемент або зворотний комплемент. У певних варіантах здійснення полінуклеїнова кислота складається по суті з фрагмента, що має щонайменше 15 найбільш 3' суміжних нуклеотидів послідовності, представленій в будь-якому з SEQ ID NO: 4-51, її комплементу або зворотного комплементу. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота містить фрагмент, що має щонайменше 15 найбільш 3' суміжних нуклеотидів послідовності, представленій в будь-якому з SEQ ID NO: 4-51, її комплемент або зворотний комплемент.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота містить послідовність, представлену в будь-якому SEQ ID NO: 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 40, 41, 43 або 44, її комплемент або зворотний комплемент. У певних варіантах здійснення цього винаходу, полінуклеїнова кислота складається по суті з послідовності, представленій в будь-

послідовності будь-якого з SEQ ID NO: з 52 по 59 або (унікальних) її фрагментів, переважно щонайменше з 15, більш переважно щонайменше з 18 суміжних нуклеотидів, їхнього комплементу або зворотного комплементу, або фрагмента.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, виділений полінуклеотид містить щонайменше

- R у положенні 21 SEQ ID NO: 52, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- R у положенні 21 SEQ ID NO: 53, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- Y у положенні 21 SEQ ID NO: 54, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- Y у положенні 21 SEQ ID NO: 55, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- K у положенні 21 SEQ ID NO: 56, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- M у положенні 21 SEQ ID NO: 57, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- K у положенні 31 SEQ ID NO: 58, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид; або

- Y у положенні 31 SEQ ID NO: 59, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, виділений полінуклеотид містить щонайменше

- G у положенні 21 SEQ ID NO: 52, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- G у положенні 21 SEQ ID NO: 53, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- C у положенні 21 SEQ ID NO: 54, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- C у положенні 21 SEQ ID NO: 55, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- G у положенні 21 SEQ ID NO: 56, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- A у положенні 21 SEQ ID NO: 57, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- G у положенні 31 SEQ ID NO: 58, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид; або

- C у положенні 31 SEQ ID NO: 59, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, виділений полінуклеотид містить щонайменше

- A у положенні 21 SEQ ID NO: 52, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- A у положенні 21 SEQ ID NO: 53, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- T у положенні 21 SEQ ID NO: 54, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- T у положенні 21 SEQ ID NO: 55, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- T у положенні 21 SEQ ID NO: 56, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- C у положенні 21 SEQ ID NO: 57, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид;

- T у положенні 31 SEQ ID NO: 58, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид; або

- T у положенні 31 SEQ ID NO: 59, переважно як найбільш 3' або 5', 2-й найбільш 3' або 5', або 3-й найбільш 3' або 5' нуклеотид.

Такі полінуклеотиди можуть бути використані для виявлення алелю HT2/HT3 або, як альтернативний варіант, алелю, відмінного від HT2/HT3, такого як алель B73.

В одному аспекті цей винахід стосується набору, що містить щонайменше один полінуклеотид, як описано в цьому документі, такий як щонайменше один праймер або зонд, як описано в цьому документі. Фахівець у цій галузі техніки зрозуміє, що полінуклеотиди можуть міститися, наприклад, в одній посудині, такий як один флакон, або в окремих посудинах, таких як окремі флакони.

Слід розуміти, що "специфічна гібридизація" означає, що полінуклеїнова кислота гібридується з (молекулярним) маркерним алелем (наприклад, у жорстких умовах гібридизації, як визначено в цьому документі в іншому місці), але (по суті) не гібридується з полінуклеїною кислотою, яка не містить маркерний алель, або (по суті) не здатна використовуватися як праймер ПЛР. Наприклад, у придатному зчитуванні, сигнал гібридизації з маркерним алелем або ПЛР-ампліфікацією маркерного алелю, щонайменше в 5 разів, переважно щонайменше в 10 разів сильніше або більше, ніж сигнал гібридизації з немаркерним алелем або з будь-якої іншої послідовністю.

У певних варіантах здійснення цього винаходу (виділена) полінуклеїнова кислота являє собою (виділену) полінуклеїнову кислоту, яка не розкрита у [WO 2019/038326].

В одному аспекті цей винахід стосується набору праймерів або зондів, як описано вище, таких як набір алель-специфічних праймерів або зондів. У певних варіантах здійснення цього винаходу, набір може додатково містити (загальний) прямий або зворотний праймер (залежно від того, чи є алель-специфічні праймери зворотними або прямими праймерами).

В одному аспекті, цей винахід стосується набору, що містить такі полінуклеїнові кислоти, як, наприклад, праймери (які містять прямі (такі як, щонайменше один алель-специфічний або, в альтернативному варіанті, загальний праймер) і/або зворотні праймери (такі як загальний або, в альтернативному варіанті, щонайменше один алель-специфічний праймер)), і/або зонди (наприклад, щонайменше один алель-специфічний зонд). Набір може додатково містити інструкції з використання.

Слід розуміти, що у варіантах здійснення цього винаходу, які стосуються набору прямих і зворотних праймерів, може знадобитися, щоб тільки один з обох праймерів (прямий або зворотний) був здатний розпізнавати (молекулярний) маркерний алель за цим винаходом та немаркерний алель і, отже, він може бути унікальним. Інший праймер може або не може бути здатний розпізнавати (молекулярний) маркерний алель за цим винаходом і немаркерний алель і, отже, він може бути унікальним.

В одному аспекті, цей винахід стосується вектору, що містить (виділену) полінуклеїнову кислоту за цим винаходом, як описано в цьому документі. У певних варіантах здійснення цього винаходу, вектор являє собою вектор експресії (рослини). У певних варіантах здійснення цього винаходу, вектор являє собою індукційний вектор експресії (рослини). У певних варіантах здійснення цього винаходу, експресія є тканинспецифічною або органоспецифічною. У певних варіантах здійснення цього винаходу експресія є специфічною в процесі розвитку. У певних варіантах здійснення цього винаходу експресія є тканеспецифічною або органоспецифічною і специфічною в процесі розвитку.

Використовуваний в цьому документі термін "вектор" має своє звичайне значення у цій галузі техніки і може, наприклад, являти собою плазмід, космід, бактеріофаг або вектор експресії, що трансформує вектор, човниковий вектор або клонуючий вектор; він може бути дво- або одноланцюговим, лінійним або кільцевим; або він може трансформувати прокаріотичного або еукаріотичного хазяїна, або шляхом інтеграції в його геном, або внехромосомно. Нуклеїнова кислота за цим винаходом, переважно функціонально зчеплена в векторі щонайменше з однієї регуляторної послідовністю, яка забезпечує транскрипцію і, необов'язково, експресію в прокаріотичній або еукаріотичній клітині-хазяїні. Регуляторна послідовність, переважно ДНК, може бути гомологічною або гетерологічною стосовно нуклеїнової кислоти за цим винаходом. Наприклад, нуклеїнова кислота знаходиться під контролем придатного промотора або термінатора. Придатними промоторами можуть бути промотори, які індуковані конститутивно (приклад: промотор 35S з "Вірусу мозаїки цвітної капусти" [Оделл і співавт., 1985]; особливо придатні ті промотори, які є тканинспецифічними [приклад: Пилцеспецифічні промотори, Чен і співавт. (2010), Чжао і співавт. (2006), або Твелл і співавт. (1991)], або є специфічними для розвитку (приклад: промотори, специфічні для цвітіння). Придатні промотори також можуть бути синтетичними або химерними промоторами, які не зустрічаються в природі, складаються з безлічі елементів і містять мінімальний промотор, а також - вище мінімального промотора - щонайменше один цис-регуляторний елемент, який служить місцем зв'язування для спеціальних факторів транскрипції. Химерні промотори можуть бути сконструйовані відповідно до бажаної специфіки, і вони можуть бути індуковані або репресовані різними факторами. Приклади таких промоторів можна знайти в роботі Гурра і Раштона (2005)

або Вентера (2007). Наприклад, придатним термінатором є термінатор нопалин-синтази [Депікер і співавт., 1982]. Вектор може бути введений шляхом кон'югації, мобілізації, біолістичної трансформації, трансформації, опосередкованої агробактеріями, трансфекції, трансдукції, вакуумної інфільтрації або електропорації. Вектор може являти собою плазмиду, космиду, бактеріофаг або вектор експресії, вектор трансформації, човниковий вектор або вектор клонування; він може бути дво- або одноланцюговим, лінійним або кільцевим. Вектор може трансформувати прокаріотичного або еукаріотичного хазяїна, або шляхом інтеграції в його геном, або позахромосомно.

Використовуваний в цьому документі термін "функціонально зчеплений" означає з'єднані в загальній молекулі нуклеїнової кислоти таким чином, що з'єднані елементи розташовані і орієнтовані відносно один одного таким чином, що може відбуватися транскрипція молекули нуклеїнової кислоти. ДНК, яка функціонально зчеплена з промотором, знаходиться під транскрипційним контролем цього промотора.

В одному аспекті, цей винахід стосується використання полінуклеїнової кислоти або вектора за цим винаходом, як описано в цьому документі, для генерування рослини кукурудзи або частини рослини, такої як, рослина кукурудзи або частина рослини, що має підвищену стійкість і/або толерантність до патогену.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, вектор являє собою вектор експресії. Нуклеїнова кислота переважно функціонально зчеплена в векторі щонайменше з однієї регуляторної послідовністю, яка забезпечує транскрипцію і, необов'язково, експресію в прокаріотичної або еукаріотичної клітині-хазяїні. Регуляторна послідовність може бути гомологічною або гетерологічною стосовно нуклеїнової кислоти. Наприклад, нуклеїнова кислота знаходиться під контролем придатного промотора або термінатора. Придатними промоторами можуть бути промотори, які конститутивно індуковані, наприклад, промотор 35S з "Вірусу мозаїки цвітної капусти" [Оделл і співавт., 1985. Ідентифікація послідовностей ДНК, необхідних для активності промотору 35S вірусу мозаїки цвітної капусти]. Тканинно-специфічні промотори, наприклад, пилціспецифічні промотори, як описано в роботі в Чен і співавт. [2010. *Molecular Biology Reports* 37 (2): 737-744), Чжао і співавт. (2006. *Planta* 224(2): 405-412), або Твелл і співавт. (1991. *Genes & Development* 5(3): 496-507)], особливо придатні, як і промотори, специфічні в процеси розвитку, наприклад, промотори, специфічні для цвітіння. Придатні промотори також можуть бути синтетичними або химерними промоторами, які не зустрічаються в природі, і які складаються з безлічі елементів. Такий синтетичний або химерний промотор може містити мінімальний промотор, а також щонайменше один цис-регуляторний елемент, який служить місцем зв'язування для спеціальних факторів транскрипції. Химерні промотори можуть бути сконструйовані відповідно до бажаної специфіки, і вони можуть бути індуковані або репресовані різними факторами. Приклади таких промоторів можна знайти в роботі [Гурра і Раштона (2005). Тенденції в біотехнології 23(6): 275-282] або Вентера [2007. Тенденції в рослинництві: 12(3):, 118-124]. Наприклад, придатним термінатором є термінатор нопалин-синтази [Депікер і співавт., 1982. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1(6): 561-573].

У певних варіантах здійснення цього винаходу, вектор являє собою вектор умовної експресії. У певних варіантах здійснення цього винаходу, вектор являє собою вектор конститутивної експресії. У певних варіантах здійснення цього винаходу, вектор являє собою вектор тканинно-специфічної експресії, такий як, вектор пилцеспецифічної експресії. У певних варіантах здійснення цього винаходу, вектор являє собою вектор індукцибельної експресії. Всі такі вектори добре відомі в цій галузі техніки.

Способи отримання описаних векторів є звичайними для фахівця в цій галузі техніки [Сембрук і співавт., 2001].

Також тут передбачена клітина-хазяїн, така як, рослинна клітина, яка містить нуклеїнову кислоту, як описано в цьому документі, переважно, нуклеїнову кислоту, що стимулює індукцію, або нуклеїнову кислоту, що кодує дволанцюгову РНК, як описано в цьому документі, або вектор, як описано в цьому документі. Клітина-хазяїн може містити нуклеїнову кислоту у вигляді молекули, що позахромосомно (епісомально) реплікується, або вона містить нуклеїнову кислоту, що інтегрована в ядерний або пластидний геном клітини-хазяїна, або у вигляді введеної хромосоми, наприклад, мініхромосоми.

Клітина-хазяїн може бути прокаріотичною (наприклад, бактеріальною) або еукаріотичною клітиною (наприклад, рослинною клітиною або дріжджовою клітиною). Наприклад, клітиною-хазяїном може бути агробактерія, така як *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes*. Переважно клітина-хазяїн являє собою рослинну клітину.

В одному аспекті цей винахід стосується використання полінуклеїнової кислоти або вектору за цим винаходом, як описано в цьому документі, для ідентифікації рослини кукурудзи або

частини рослини, такої як, рослина кукурудзи або частина рослини, що має підвищену стійкість і/або толерантність до патогену.

Описана в цьому документі нуклеїнова кислота або описаний в цьому документі вектор можуть бути введені в клітину-хазяїна за допомогою добре відомих способів, які можуть залежати від обраної клітини-хазяїна, включно з, наприклад, кон'югацією, мобілізацією, біолістичної трансформацією, трансформацією, що опосередкована агробактеріями, трансфекцією, трансдукцією, вакуумної інфільтрацією або електропорацією. Зокрема, способи введення нуклеїнової кислоти або вектора в клітину агробактерії добре відомі фахівцям в цій галузі техніки і можуть включати способи кон'югації або електропорації. Також відомі способи введення нуклеїнової кислоти або вектора в рослинну клітину [Сембрук і співавт., 2001], і вони можуть включати різні способи трансформації, такі як біологічна трансформація та трансформація, опосередкована агробактеріями.

У конкретних варіантах здійснення цей винахід стосується трансгенної рослинної клітини, яка містить нуклеїнову кислоту, як описано в цьому документі, зокрема, стимулюючи індукцію нуклеїнову кислоту або нуклеїнову кислоту, що кодує дволанцюгову РНК, як описано в цьому документі, як трансген або вектор, як описано в цьому документі. В інших варіантах здійснення, цей винахід стосується трансгенної рослини або її частини, яка містить трансгенну рослинну клітину.

Наприклад, така трансгенна рослинна клітина або трансгенна рослина являє собою рослинну клітину або рослину, яка, в переважно стабільно трансформується нуклеїновою кислотою, як описано в цьому документі, зокрема, стимулює індукцію нуклеїнової кислотою або нуклеїновою кислотою, що кодує дволанцюгову РНК, як описано в цьому документі, або вектором, як описано в цьому документі.

Переважно нуклеїнова кислота в трансгенної рослинної клітині функціонально зчеплена щонайменше з однією регуляторної послідовністю, яка забезпечує транскрипцію і, необов'язково, експресію в рослинній клітині. Регуляторна послідовність може бути гомологічною або гетерологічною стосовно нуклеїнової кислоти. Загальна структура, що складається з нуклеїнової кислоти за цим винаходом і регуляторної послідовності (послідовностей), може потім являти собою трансген.

В одному аспекті цей винахід стосується використання щонайменше одного (молекулярного) маркера (алелю), описаного в цьому документі, для ідентифікації рослини або частини рослини, що має підвищену стійкість і/або толерантність до патогену. В одному аспекті цей винахід стосується використання щонайменше одного (молекулярного) маркера (алелю), описаного в цьому документі, який здатний виявляти щонайменше один діагностичний маркерний алель для ідентифікації рослини або частини рослини, такої як, рослина або частина рослини, що має підвищену стійкість і/або толерантність до патогену. В одному аспекті, цей винахід стосується використання щонайменше одного (молекулярного) маркерного алелю, описаного в цьому документі, для ідентифікації рослини або частини рослини, що має підвищену стійкість і/або толерантність до патогену.

Маркерні алелі за цим винаходом, які описані в цьому документі, можуть являти собою діагностичні маркерні алелі, які можна використовувати для ідентифікації рослин або частин рослин, що мають підвищену стійкість і/або толерантність до патогену.

В одному аспекті цей винахід стосується рослини кукурудзи або частини рослини, такої як протопласт, що містить полінуклеїнову кислоту або вектор за цим винаходом, як описано в цьому винаході.

В одному аспекті цей винахід стосується способу боротьби із зараженням патогенами рослини (популяції) кукурудзи, що містить

а) Надання (а) рослини (рослин) кукурудзи за цим винаходом, як описано в цьому документі, або вирощування з насіння (а) рослини (рослин) кукурудзи за цим винаходом, як описано в цьому документі,

b) Культивування рослини (рослин) за пунктом а) за умов зараження патогеном.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, зараження патогеном зменшене. У певних варіантах здійснення цього винаходу, зараження патогеном сповільнюване. У певних варіантах здійснення цього винаходу, симптоми патогена зменшене. У деяких варіантах здійснення цього винаходу, зараження і симптоми зменшені або сповільнені. У певних варіантах здійснення цього винаходу, кількість поразок зменшене, наприклад, середня кількість поразок на рослину або середня кількість поразок в популяції рослин (наприклад, виражене в кількості рослин або на площу зростання, наприклад, на гектар). Зменшення кількості поразок може становити щонайменше 5 %, переважно щонайменше 10 %, більш переважно щонайменше 20 %.

Уповільнення зараження патогеном або симптомів може становити щонайменше один тиждень, переважно щонайменше два тижні, більш переважно щонайменше один місяць.

Рослини, частини рослин або популяції рослин, описані в цьому документі, що мають підвищену стійкість або толерантність до патогену, можуть бути використані для боротьби із зараженням або інфікуванням патогенами. Відповідно, в одному аспекті, цей винахід стосується використання таких рослин для боротьби із зараженням або інфікуванням патогенами. Переважно зараження або інфікування патогенами контролюють шляхом зменшення зараження або інфікування патогеном, або шляхом зменшення симптомів зараження або інфікування патогеном на рівні рослин, частини рослини або популяції рослин, як описано далі нижче.

У певних варіантах здійснення цього винаходу, підвищена стійкість або толерантність можуть виявлятися як зменшення інфекції або зараження (наприклад, кількості патогенів (наприклад, на площу рослин або на біомасу рослин), розмноження (швидкості) або поширення (ступеня)/розподілу патогенів, а також швидкості поширення патогенів, наприклад, в певний час протягом сезону (зростання)) на (суб)рівні рослин (такому як, наприклад, конкретні клітини, органи або тканини, наприклад, придатні для збирання частини рослини або, наприклад, листя, живці, плоди або насіння) або на рівні популяції, наприклад, зменшення щонайменше на 5 %, переважно щонайменше на 10 %, наприклад, щонайменше на 20 %, щонайменше на 30 %, щонайменше на 40 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 90 % або (приблизно) на 100 %. На рівні популяції підвищена стійкість або толерантність може виявлятися як зменшення інфекції або зараження, як описано вище, але також, наприклад, як зменшення кількості заражених рослин (або комбінація), наприклад, зменшення щонайменше на 5 %, переважно щонайменше на 10 %, наприклад, щонайменше на 20 %, щонайменше на 30 %, щонайменше на 40 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 90 % або (приблизно) на 100 %. Слід розуміти, що таке зменшення інфекції або зараження може бути відносно еталонної рослини (частини) або популяції (наприклад, відповідної рослини дикого типу не за цим винаходом).

У певних варіантах здійснення цього винаходу, підвищена стійкість або толерантність можуть виявлятися як зменшення втрати біомаси або врожаю в цілому, або конкретної (придатної для збирання) частини рослини (наприклад, кількості або ваги насіння, або плодів) через зараження патогеном, або як наслідок зараження патогеном. У певних варіантах здійснення цього винаходу, стійкі або толерантні рослини виявляють втрату виробництва біомаси (наприклад, виражену в г/день або кг/га, або кг/га/день, наприклад, виражену у вигляді сухої маси, наприклад, виражену у відсотках по вазі) при зараженні патогеном, яка щонайменше на 1 %, переважно щонайменше на 2 %, наприклад, щонайменше на 3 %, щонайменше на 4 %, щонайменше на 5 %, наприклад, щонайменше на 10 %, щонайменше на 15 % або щонайменше на 20 % вище, ніж у відповідних контрольних рослин, таких як, рослини, які менш стійкі або толерантні, або рослини не за цим винаходом, як описано в цьому документі. У певних варіантах здійснення цього винаходу, стійкі або толерантні рослини виявляють виробництво біомаси (наприклад, виражену в г/день або кг/га або кг/га/день, наприклад, виражену у вигляді сухої маси, наприклад, виражену у відсотках по вазі) при зараженні патогеном, яка щонайменше на 1 %, переважно щонайменше на 2 %, наприклад, щонайменше на 3 %, щонайменше на 4 %, щонайменше на 5 %, наприклад, щонайменше на 10 %, щонайменше на 15 % або щонайменше на 20 % вище, ніж у відповідних контрольних рослин, таких як рослини, які менш стійкі або толерантні, або рослини не за цим винаходом, як описано в цьому документі.

Використовуваний в цьому документі термін "потенціал врожайності" стосується максимального врожаю, отриманому при збиранні врожаю.

В одному аспекті цей винахід стосується використання рослини кукурудзи за цим винаходом, як описано в цьому документі, для боротьби із зараженням патогеном в рослини (популяції) кукурудзи.

В одному аспекті цей винахід стосується використання рослини кукурудзи за цим винаходом, як описано в цьому документі, для збільшення врожайності (потенціалу) рослини, переважно в умовах зараження патогеном. У певних варіантах здійснення цього винаходу врожай являє собою врожай біомаси або насіння. У певних варіантах здійснення цього винаходу згадана біомаса являє собою біомасу цілої рослини або біомасу частини рослини. У певних варіантах здійснення цього винаходу згадана частина рослини являє собою тканину, орган, плід або насіння.

У певних варіантах здійснення способів цього винаходу рослин (кукурудзи) (або частин рослин), поліуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або поліуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить

[illegible]

рослин (кукурудзи) (або частин рослин), поліуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або поліуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0071 та Affx-91328160. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), поліуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або поліуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0071 та MA0070.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

MA0064, та Affx-91328160. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) MA0071, PZE-108095339, та Affx-91328160. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0071 та MA0045. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0071 та MA0062. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0071 та MA0063. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0071 та MA0064. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0071 та PZE-108095339. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0071 та Affx-91328160.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклейнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі,

[illegible]

[illegible]

[illegible]

документі, рослина або частина рослини, або полінуклєйнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0045, MA0063, PZE-108095339 та Affx-91328160. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклєйнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклєйнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0062, MA0063, MA0064 та PZE-108095339. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклєйнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклєйнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0062, MA0063, MA0064 та Affx-91328160. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклєйнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклєйнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0062, MA0063, MA0064 та Affx-91328160. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклєйнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклєйнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0062, MA0063, MA0064 та Affx-91328160. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклєйнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклєйнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0063, MA0064, PZE-108095339 та Affx-91328160.

[illegible]

[illegible]

(скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0071, MA0062, MA0063, MA0064 та Affx-91328160. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0071, MA0062, MA0063, PZE-108095339 та Affx-91328160. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0071, MA0062, MA0064, PZE-108095339 та Affx-91328160. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0071, MA0063, MA0064, PZE-108095339 та Affx-91328160. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0062, MA0045, MA0063, MA0064, PZE-108095339 та Affx-91328160.

[illegible]

У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0071, MA0062, MA0045, MA0063, MA0064, PZE-108095339 та Affx-91328160.

У певних варіантах здійснення цього винаходу способи, описані в цьому документі, такі як способи ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, додатково містять скринінг на

присутність будь-якого щонайменше одного маркера (алелю), обраного з PZE-108092843, PZA-003182005, PZE-108094590, PZE-108096610, PZE-108096469, MA0043 та MA0025.

[illegible]

У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) MA0045 та MA0062 і не містить будь-який щонайменше один (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843, PZA-003182005, PZE-108094590, PZE-108096610, PZE-108096469, MA0043 та MA0025. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) MA0045 та MA0063 і не містить будь-який щонайменше один (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843, PZA-003182005, PZE-108094590, PZE-108096610, PZE-108096469, MA0043 та MA0025. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) MA0045 та MA0070 і не містить будь-який щонайменше один (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843, PZA-003182005, PZE-108094590, PZE-108096610, PZE-108096469, MA0043 та MA0025. У певних варіантах здійснення

[illegible]

способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) MA0071 та Affx-91328160 і не містить будь-який щонайменше один (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843, PZA-003182005, PZE-108094590, PZE-108096610, PZE-108096469, MA0043 та MA0025. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) MA0071 та MA0070 і не містить будь-який щонайменше один (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843, PZA-003182005, PZE-108094590, PZE-108096610, PZE-108096469, MA0043 та MA0025.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

HT3) маркер (алель) PZE-108092843, PZA-003182005, PZE-108094590, PZE-108096610, PZE-108096469, MA0043 та MA0025. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) MA0071, MA0070 та MA0064 і не містить будь-який щонайменше один (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843, PZA-003182005, PZE-108094590, PZE-108096610, PZE-108096469, MA0043 та MA0025.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0062, MA0064, PZE-108095339 і Affx-91328160, і не містить будь-який щонайменше один (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843, PZA-003182005, PZE-108094590, PZE-108096610, PZE-108096469, MA0043 і MA0025. У певних варіантах здійснення способів цього винаходу, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0063, MA0064, PZE-108095339 і Affx-91328160, і не містить будь-який щонайменше один (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843, PZA-003182005, PZE-108094590, PZE-108096610, PZE-108096469, MA0043 і MA0025.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

003182005. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) MA0062 і не містить (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) MA0063 і не містить (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) MA0064 і не містить (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) PZE-108095339 і не містить (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) Affx-91328160 і не містить (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) MA0070 і не містить (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) MA0071 і не містить (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), поліуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або поліуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) MA0045, MA0062, MA0063 та MA0064, і не містить (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), поліуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або поліуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) MA0045, MA0062, MA0063 та PZE-108095339, і не містить (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), поліуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або поліуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) MA0045, MA0062, MA0063 та Affx-91328160, і не містить (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), поліуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або поліуклеїнова кислота містить молекулярний маркер (алель) MA0045, MA0062, MA0064 та PZE-108095339, і не містить (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), поліуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або поліуклеїнова

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0045, MA0062, MA0063, MA0064 і PZE-108095339, і не містить щонайменше один (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0045, MA0062, MA0063, MA0064 і Affx-91328160, і не містить щонайменше один (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин

[illegible]

рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0071, MA0062, MA0064, PZE-108095339 і Affx-91328160, і не містить щонайменше один (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0071, MA0063, MA0064, PZE-108095339 і Affx-91328160, і не містить щонайменше один (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005. У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), полінуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або полінуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0062, MA0045, MA0063, MA0064, PZE-108095339 і Affx-91328160, і не містить щонайменше один (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005.

[illegible]

У певних варіантах здійснення способів за цим винаходом, рослин (кукурудзи) (або частин рослин), поліуклеїнових кислот або способів використання, як описано в цьому документі, рослина або частина рослини, або поліуклеїнова кислота, або спосіб (скринінг) містить (скринінг на) молекулярний маркер (алель) MA0070, MA0071, MA0062, MA0045, MA0063,

MA0064, PZE-108095339 і Affx-91328160, і не містить щонайменше один (HT2 або HT3) маркер (алель) PZE-108092843 і/або PZA-003182005.

Аспекти і варіанти здійснення цього винаходу додатково підтверджуються наступними необмежуваними прикладами. Наступні приклади, включно з проведеними експериментами і досягнутими результатами, наведені тільки в ілюстративних цілях і не призначені для обмеження цього винаходу.

ПРИКЛАДИ

ПРИКЛАД 1: Розробка діагностичних маркерів для алелю RLK1 HT2 для маркерної селекції та інтрогресії ознаки у селекції

Засноване картах клонування алелю RLK1 HT2 в інтервалі QTL між маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005 було додатково конкретизовано за допомогою рекомбінантних рослин між маркерами MA0035 і MA0045 (популяція RP6 x RP6HT3A) та PZE-108095325, та MA0045 (популяція RP5 x RP5HT2A). Рекомбінантні рослини з цими інтервалами показали стійкий фенотип до NCLB в польових умовах.

Маркерна селекція для малої донорної інтрогресії, що містить HT2 від донорів A619HT2 і A619HT3 1, може бути виконана з використанням комбінацій маркерів між Affx-91328160 і MA0045 (див. Таблицю 1), щоб усунути зчеплений вантаж, розташований поза відповідною донорною інтрогресією. Такий зчеплений вантаж вже описаний в [WO 2019038326 A1].

Рослини кукурудзи, що містять донорну інтрогресію з HT2, характеризуються як такі, що мають маркерний гаплотип, що містить MA0064, MA0063, MA0062 і MA0045, необов'язково що містить додатково Affx-91328160 і PZE-108095339 як зазначено в Таблиці 1, при цьому, донорна інтрогресія розташована між маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005 (довжина: ~3,72 Мб, розрахована на основі B73 AGPv4), переважно між маркерами PZE-108094590 та PZE-108096610 (довжина: ~1,52 Мб) або між маркерами PZE-108094590 та PZE-108096469 (довжина: ~1,41 Мб), більш переважно між маркерами MA0043 і MA0025 (довжина: ~0,97 Мб).

Положення гену HT2 згідно з анотацією до еталонного геному B73 AGPv4 становить від 156,763,311 до 156,774,071 п.о.

Таблиця 1

Список усіх маркерів та їх фізичне положення на B73 AGPv4:

Назва маркера	Хромосома	Положення AGPv04	Донорний алель (HT2)
PZE-108092843 ⁽¹⁾	8	154456106	C
PZE-108094590 ⁽¹⁾	8	155860812	G
MA0043	8	155999733	A
Affx-91328160 ⁽²⁾	8	156372823	G
PZE-108095325 ⁽¹⁾	8	156374083	G
PZE-108095339 ⁽¹⁾	8	156378424	G
MA0021	8	156535845	G
MA0064	8	156541890	C
MA0035	8	156542253	A
MA0063	8	156543061	T
MA0070	8	156694565	T
MA0071	8	156694641	C
MA0062	8	156772431	G
MA0045	8	156789751	A
MA0025	8	156967599	G
PZE-108096469 ⁽¹⁾	8	157266475	G
PZE-108096610 ⁽¹⁾	8	157375673	G
PZA-003182005 ⁽¹⁾	8	158167578	A

⁽¹⁾ Ганал і спіавт. (2011) "Масив SNP-генотипування великої кукурудзи (*Zea mays* L.): розробка та генотипування зародкової плазми та генетичне картування для порівняння з еталонним геномом B73", PLoS ONE, 6(12):e28334.

⁽²⁾ Унтерсир і спіавт. (2014) "Потужний інструмент для геномного аналізу кукурудзи: розробка та оцінка масиву SNP-генотипування високої щільності 600 K", BMC Genomics, 15(1):823.

Фігура 1 показує карту фізичних положень маркерів з посиланням на положення маркерів AGPv04.

Подальший розвиток маркерів в області (AGPv4 156372823 – 156789751 п.о. = Affx-91328160-MA0045) призвів до гаплотипу діагностичних маркерів для донорних ліній HT2 A619HT2 та A619HT3 маркерів Affx-91328160, PZE-108095339, MA0064, MA0063, MA0062 і MA0045 (див. Таблицю 2).

5

Таблиця 2

Список діагностичних маркерів, що впливають на гаплотип HT2

Маркер	Донорний алель (тобто, алель HT2/HT3)	Альтернативний алель (тобто, алель, відмінний від HT2/HT3)
Affx-91328160	G	A
PZE-108095339	G	A
MA0064	C	T
MA0063	T	C
MA0070	T	G
MA0071	C	T
MA0062	G	T
MA0045	A	C

Кожен з цих діагностичних маркерів може бути використаний для відстеження малої донорної інтрогресії щонайменше HT2 (і HT3) у процесах селекції. Оскільки кожен маркер є діагностичним та тісно зчеплений з геном-збудником, що надає стійкості HT2. Крім того, окремі маркери Таблиці 1 можуть бути використані в комбінації і/або в комбінації з іншими маркерами в області від PZE-108092843 до PZA-003182005, переважно від PZE-108094590 до PZE-108096610, або від PZE-108094590 до PZE-108096469, більш переважно від MA0043 до MA0025.

10

Праймери KASP були розроблені для виявлення відповідно алелю HT2 (і HT3) та альтернативного алелю, та представлені в Таблиці 3. Також представлено загальний праймер.

15

Таблиця 3

Перелік праймерів KASP для диференціального виявлення діагностичних маркерів, що впливають на гаплотип HT2 (HT3) і, як альтернативний варіант, на гаплотип, відмінний від HT2 (HT3)

Маркер	Праймер алелю HT2/HT3	Праймер альтернативного алелю	Загальний праймер
Affx-91328160	GAAGGTCGGAGTCAAC GGATTGGGAAGATTTCAT ATTTGTTTACATCACG (SEQ ID NO: 4)	GAAGGTGACCAAGTTC ATGCTAAGGGAAGATTTC ATATTTGTTTACATCACA (SEQ ID NO: 5)	CTCCACAGTTTTTACTC CCAAGTTTAGAA (SEQ ID NO: 6)
PZE-108095339	GAAGGTCGGAGTCAAC GGATTCTTGCGTGCT GCAGGACC (SEQ ID NO: 7)	GAAGGTGACCAAGTTC ATGCTTGGCGTGCTGC AGGACT (SEQ ID NO: 8)	GTTTCGGGTTTCAGAGT CAAACGGTT (SEQ ID NO: 9)
MA0064	GAAGGTCGGAGTCAAC GGATTATGAACCTTCTT TTGGTCGTTTTCGC (SEQ ID NO: 10)	GAAGGTGACCAAGTTC ATGCTGATGAACCTTCTT TTTGGTCGTTTTCGT (SEQ ID NO: 11)	GCTAGAACATGGCGTAT ACGGAACAA (SEQ ID NO: 12)
MA0063	GAAGGTCGGAGTCAAC GGATTGGTGAGCAGCC ATGGCGGA (SEQ ID NO: 13)	GAAGGTGACCAAGTTC ATGCTGTGAGCAGCCA TGGCGGG (SEQ ID NO: 14)	GTGAACCCAGCCAACC TCGTCTT (SEQ ID NO: 15)
MA0062	GAAGGTGACCAAGTTC ATGCTATCTAATCAAAC TGGTGTTATATCTTTTG G (SEQ ID NO: 16)	GAAGGTCGGAGTCAAC GGATTAAATCTAATCAA ACTGGTGTTATATCTTT TGT (SEQ ID NO: 17)	CACGTCAACCAGAAACA TAAAGCACAAAT (SEQ ID NO: 18)
MA0045	GAAGGTGACCAAGTTC ATGCTAACATCCCAAAG	GAAGGTCGGAGTCAAC GGATTACATCCCAAAGC	CCAAGAACTCTATTAGA TTGTTGAATAGCA (SEQ

Таблиця 3

Перелік праймерів KASP для диференціального виявлення діагностичних маркерів, що впливають на гаплотип HT2 (HT3) і, як альтернативний варіант, на гаплотип, відмінний від HT2 (HT3)

Маркер	Праймер алелю HT2/HT3	Праймер альтернативного алелю	Загальний праймер
	CACTGAACGGA (SEQ ID NO: 19)	ACTGAACGGC (SEQ ID NO: 20)	ID NO: 21)
MA0070	GAAGGTCGGAGTCAAC GGATTCAATTTTCTAAA AAGATTGGCAGCAATTA ATT (SEQ ID NO: 40)	GAAGGTGACCAAGTTC ATGCTCAATTTTCTAAA AAGATTGGCAGCAATTA ATG (SEQ ID NO: 41)	CRAACCAAAGTTACCGC TATAAGCC (SEQ ID NO: 42)
MA0071	GAAGGTGACCAAGTTC ATGCTGAGCTAGCTTGA GCTCGACCG (SEQ ID NO: 43)	GAAGGTCGGAGTCAAC GGATTGAGCTAGCTTGA GCTCGACCA (SEQ ID NO: 44)	GCTTATAGCGGTAACCTT TGTTYGC (SEQ ID NO: 45)

У Таблиці 3 нуклеотидні ділянки з підкресленими праймерами гібридизуються з геномної ДНК Zea Mays (або з прямим або комплементарним ланцюгом). Нуклеотидні ділянки, виділені жирним шрифтом, являють собою хвостові послідовності праймера KASP (що не зв'язуються з геномною ДНК Zea Mays). Нуклеотиди, які підкреслені та виділені жирним шрифтом, являють собою алель-специфічні нуклеотиди.

Праймери, які перераховані в Таблиці 3, являють собою праймери KASP. Однак у певних варіантах здійснення цього винаходу праймери не є праймерами KASP і можуть не мати хвостових послідовностей. Відповідно, у певних варіантах здійснення цього винаходу праймери для диференціального виявлення можуть бути такими, як представлено в Таблиці 4.

Таблиця 4

Перелік праймерів KASP для диференціального виявлення діагностичних маркерів, що впливають на гаплотип HT2 (HT3) і, як альтернативний варіант, на гаплотип, відмінний від HT2 (HT3)

Маркер	Праймер алелю HT2/HT3	Праймер альтернативного алелю	Загальний праймер
Affx-91328160	GGGAAGATTCATATTTG TTTACATCACG (SEQ ID NO: 22)	AAGGGAAGATTCATATT TGTTTACATCACA (SEQ ID NO: 23)	CTCCACAGTTTTTACTC CCAAGTTTAGAA (SEQ ID NO: 24)
PZE-108095339	CTTGGCGTGCTGCAGG ACC (SEQ ID NO: 25)	TGGCGTGCTGCAGGAC T (SEQ ID NO: 26)	GTTTCGGGTTTCAGAAG TCAAACGGTT (SEQ ID NO: 27)
MA0064	ATGAACCTTCTTTTGGT CGTTTTTCG (SEQ ID NO: 28)	GATGAACCTTCTTTTGG TCGTTTTCGT (SEQ ID NO: 29)	GCTAGAACATGGCGTAT ACGGAACAA (SEQ ID NO: 30)
MA0063	GGTGAGCAGCCATGGC GGA (SEQ ID NO: 31)	GTGAGCAGCCATGGCG GG (SEQ ID NO: 32)	GTGAACCCAGCCAACC TCGTCTT (SEQ ID NO: 33)
MA0062	ATCTAATCAAACCTGGT TTATATCTTTTGG (SEQ ID NO: 34)	AAATCTAATCAAACCTGG TGTTATATCTTTTGT (SEQ ID NO: 35)	CACGTCAACCAGAAACA TAAAGCACAAAT (SEQ ID NO: 36)
MA0045	AACATCCCAAAGCACTG AACGGA (SEQ ID NO: 37)	ACATCCCAAAGCACTGA ACGGC (SEQ ID NO: 38)	CCAAGAACTCTATTAGA TTGTTGAATAGCA (SEQ ID NO: 39)
MA0070	CAATTTTCTAAAAAGATT GGCAGCAATTAATT (SEQ ID NO: 46)	CAATTTTCTAAAAAGATT GGCAGCAATTAATG (SEQ ID NO: 47)	CRAACCAAAGTTACCGC TATAAGCC (SEQ ID NO: 48)
MA0071	GAGCTAGCTTGAGCTC GACCG (SEQ ID NO: 49)	GAGCTAGCTTGAGCTC GACCA (SEQ ID NO: 50)	GCTTATAGCGGTAACCTT TGTTYGC (SEQ ID NO: 51)

Таблиця 5

Перелік навколишніх послідовностей, придатних для диференціального виявлення діагностичних маркерів, що впливають на гаплотип HT2 (HT3) і, як альтернативний варіант, на гаплотип, відмінний від HT2 (HT3). Відповідні положення маркерів (SNP) виділені жирним шрифтом та підкреслені. Вироджені коди зазначені згідно з IUPAC (Міжнародний союз теоретичної та прикладної хімії) (R=A/G, Y=C/T, K=G/T, M=A/C)

Маркер	Область маркера
Affx-91328160	<u>TTCATATTTGTTTACATCACRATTCTAAACTTGGGAGTAAA</u> (SEQ ID NO: 52)
PZE-108095339	ACGTGGCGCCAGCCACGCACRGTCCTGCAGCACGCCAAGCA (SEQ ID NO: 53)
MA0064	<u>TTCTTTTTTGGTCGTTTTCGYTCCTTTGTTCCGTATACGCC</u> (SEQ ID NO: 54)
MA0063	CCAGCCAACCTCGTCTTCTCYCCGCCATGGCTGCTCACCTA (SEQ ID NO: 55)
MA0062	AACGGTGTTATATCTTTTGKAACAAATTTGTGCTTTATGT (SEQ ID NO: 56)
MA0045	CATCCCAAAGCACTGAACGGMTATGCCATTACTTTGACAAT (SEQ ID NO: 57)
MA0070	AATTTTCTAAAAAGATTGGCAGCAATTAATKGGGGCTTATAGCGGTAACTTTG GTTYGCAT (SEQ ID NO: 58)
MA0071	RGTTGAATATCGATCCAACTCGMCGYGGCWWGGTCGAGCTCAAGCTAGCTC CGCTCAGCTC (SEQ ID NO: 59)

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> КВС СААТ СЕ ЕНД КО. КГАА
ЮНІВЕРСІТІ ОФ ЦЮРИХ

<120> СПОСОБИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ І ВІДБІРУ РОСЛИН КУКУРУДЗИ, СТІЙКИХ ДО
ГЕЛЬМІНТОСПОРІЗНОЇ ПЛЯМИСТОСТІ ЛИСТЯ КУКУРУДЗИ

<130> KWS-017-PCT

<150> 20185759.6

<151> 2020-07-14

<160> 59

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24632

<212> ДНК

<213> Кукурудза Zea mays

<400> 1

atggctgctc acctaccacg cctccccgtc ctctctctcg tcctcctcgc tgcccatgtc
60
gtctccacct ccgcccattg cgagcctctt cttccgagcc cttacagcac ctccgcccatt
120
ggcgagcctc ctcttccgag cacttacaac gtctccattg gctcggaatc gttctggtgc
180
ggcggcgctc aaatccgcta cccgttctat cttgccaacg caaccgccga ctacagcggg
240
agctactact cctgcggcta caccgacttg agcgtttcct gcaaactcga ggctgagggg
300
ccgacgacga catggacccc taccatccgt ctggcgggcg acaactacac cgtcaagaac
360
atcttgtacg actatcatac catctcactg gcggacagcg atgtgctcgg aggcggcgag
420
tgccccgtcg tccaccacaa cgtcagcttc gacgagacgt ggctgcacaa cccagcggc
480
ttcgacaacc tcaccttctt cttcggatgc cactgggggc cacgcgatac actgcctgaa
540
tttgccggca acaacatcag ctgcgccggg ttcagtactc cagctatcag cggcggaggc
600
tccttcgtgt tcaagcctga agatcttgac gaacatgcgg agcaggagtt ggcttcacac

660
 720
 780
 840
 900
 960
 1020
 1080
 1140
 1200
 1260
 1320
 1380
 1440
 1500
 1560
 1620
 1680

tgcgacgagg ttttctccgt gccagtgaga agcgaggctc tgcagcaggc gatcgtcagc
 aacctcagcc tcggggacgg gtacggcgag ctgcttaggc aggggatcga gttggaatgg
 aaacggacat cggaggatca gtgtggccag tgcgaggaat cgggctccgg cggacgggtgc
 gcctacagcc agaagagaga attccttggc tgcttctgca gcggagggaa ggcgggcaac
 ccgttctgca aaccatcaag taaagtctg aaccgaccct cccttatattt tttttcattt
 tttgcaatca ccagagcacg catcggttgc gtcagtatct tgcaacctcg tagctagccc
 cgcagtgtcc cctgtgtgcg agtaccgcgc tgctccagct tgccctctgc taacgcctaa
 cgggtgaatgc ttcattgcttg acatgatcta gctagtctac actttgcttg gggtttgctt
 gggagctgga aattctggct cctgtttgca tcaactcgaca aggacgcttt cagacttgcg
 actctcgttc tgcttttgca ccaaattccgt gttttttcat ttcgtgatcg agattaatct
 agcgtagaga tgtcaatggg tatccgaaac tcgaaaccgc atggattttt actctattag
 gtacaagttt gaatcaattt tcatatcata gatttggtta taggcacaaa tctatatcca
 acaggttcat agatacgggt ttgttcttac agtaatcaaa tccgtaaacc catgagtttt
 ttagaccgga ccaaacctag cgtatattgt cattttattt tataaacgaa caacaaaatt
 attatctctc tatttacttc ctattttttt atcggttggt gaatgtataa gtagttgggtg
 agagtgttgc ttgcttgcta ttataatatt tagttattta ctagtgttat atatgtgggtg
 gatggataac ttattgaaaa ggtcacttga ttatacaact tattatttgt attcattctt
 tctactaata atttttatat caaatcatga actcgggtgtt tatcatataa attttggacc

1740
 1800 atgatcttat taatcatcac gatagttatt aattatgaga aaaacaaata tattggagat
 1860 aaaacccctcg gctaaccctg taaccgatg ggcacgggtt tgaacaaaat ttcaaattta
 1920 ttatgaatac aagtttttta acaaatatag atatgtttca tggatagagt ttgagatgac
 1980 aaaatccaac ggatttgtat ccgttgccat ctctatccgg cggcccttac cgtgctccac
 2040 gagcagaggt cgtatcgtcc ctcttccgt gtcgcctgct tcgcgttgcc gaacggagac
 2100 gtttggtagc gttggccggc tctagcagtc gggtaattt tttgttggt gttttcgatg
 2160 ttgttgatt tttgttccgt ataagccatg ttttggtaat ttatttagtc cagccgaatc
 2220 cgaagacgtg tttgctgggt tggagacttt ggagttgcta gtcatgatat gctttctact
 2280 cggtttgatt tcaaccctag taggctatat ttgatactct agtatttatt ccaatataaa
 2340 tggtttgaaa gggattaaga tataaattag ttttaattat atctttaatt tctcttaacc
 2400 catatgtatt gggctgaata ctaagtatca aaacaagccc ttatttaaga tgcattttct
 2460 ttacagttac acgtggccac tattgtgtgg ggtaggccga tcctacttgt cagtgtcat
 2520 tcgagagcaa agataccgaa ggagattaga gagactaaaa gctttttact atttaaaatt
 2580 agataataag acgatttaat cccgttccat atctttgctc taaacaaacc ctcaatgatc
 2640 atatatctcg gaagatccgg ccggctgttc tttatttatc aagtgatgac tgctgaccgc
 2700 ttatagaata tatattttta agcaaaattt cttctacatc agtaaaagga ctagacgaaa
 2760 caatgatgca tttctctaac aaaagaaagt agaattatca agcggagagc caagaccaa
 agccttacat ctatggcgt caaccaatga taccggaac caccagct ggtctatact

2820

gtctgtcacg acccagcgag taaccgtgtg gctacgctgt tagcttagga ttgaatgaaa

2880

tgctcggttc attaataaat cagctcacga gttaaatgat ttattatata acgaaactat

2940

atgcatatta tttaccaggg tgacgacagg gggcataggt gggcaatatc caccctaattg

3000

ctcctctaatt tctataggga ttgttaattt atttagctaa ttatcatgta aacgatataa

3060

aaaatgtttc taacagcccc acgggtccacc ctaatcttag accctagctt cgcctgttac

3120

gataaatatg ttatacatgt gtagtgtcta tgtcctatga attaaactaa tgattgatga

3180

actgtgctta tatattaaat tgggtctatgc gaatataact atgtgttaaa ctgatgaaca

3240

tgtgtgtgaa ttgtgaattg ataagtgatg agttgtgtct aatttagtgt tatattgatg

3300

tgttttgtga aactatgagt ataattaata ttttctataa ttaaatttgt ttaaaattaa

3360

ctagaaattg attattatat atatatttg ttttctgct ctaattcgca agctaaacaa

3420

gcaagctcaa gctcgtaaac gagccgaacc gagctgactc tgtggctcat taacttaaca

3480

acccgagccg gaccaacttg ttagcttaac gagccagctc gaatacggac gagttgagcc

3540

gagctggcat gatatccagc cctaattagg ctctgaccag tgcaacatat cctctcgc

3600

tttgtcacgt ccagacatgt caatgggccc cgattccgc aaggaattcc tctattaagg

3660

gatgatgatg agaaagtttc tccccacgg aaaaattctc tcctgacgca taaacgggga

3720

caacactcca catccccatt cctcgtgggg acctattaaa ctacatatg gtgatgtttt

3780

catgtaaaag ttaatgataa aaataaataa ttacgttgtc aagatatcac tttttgtaca

3840

aatgtgctca ttctgatgta gacatatttt ttcttacatc taacaatctg tatgagtgag

3900
 aatgttttgt attaataaca aagtaagtat gttctaatta taatttaagc ggggtccgggg
 3960
 atccccgatg gggatttata ccttgggaa acgaagatgg ggaagaaatg tcctacacaa
 4020
 gttttcatgg cgatcctcgc ggggaacttt ttcgtcgtgg ggatagggat ggggagctaa
 4080
 aacccgatga ggaattcctc gttgtcatcc ccagtcacgt caactctcga ctctactatt
 4140
 gtctctgctg catagtctgt ggtaaactat agcctcagcc tatagcacat cagcttttct
 4200
 atttcagaat taagtaattc atgcagtttt atttcaacgc tcgaaaatta cacaacataa
 4260
 tattttttat tgaattaaaa attataaagt gcatacaaat caataaaaaat atattataat
 4320
 taaaacatat ataaatctaa tcggagacct cgatcttate ctcgtcttcc accacctctt
 4380
 ttgttttgc ttctggttcc tcttcttcgt catcaaccag accacgtcct ttttgaaca
 4440
 tctttatggc cttggcatgg gtttatcttt cagctaggtc catatccctg gttgaatggc
 4500
 tctttagagt attccattgc tttaaaagct tgggtcttcac taatccaccc cacaagttct
 4560
 tcattttaaa tgcttcactt gttgactggt gcttgtggct tccttccctt tcccttcac
 4620
 cttcatcttt cgcccagccg cctttgccct atcacgccct actgatcggg gcacttcctt
 4680
 cttggtatct ttagtgccctc cagaactata ttactagag aactgagtc gggttatctt
 4740
 attcgtagtc ccattttatc ctagaacctt gtcattgctg cctccatgac cattgcctcg
 4800
 tctgcttcgc tctgatgcaa cttttcttct cgaaggtagt atccattaaa cttgctcacc
 4860
 tcccggttgt aggtgcccta atgattttta agttgcttgg cggtttgagg atatcaaggg
 4920
 tcggaggtgg agttatatgt tgccgctatt tgactccaaa aacatgatcc agacttattg

4980

ttgacagggg ttgaattatt agaatgcata ttccaagaat taacctataa tataagtaaa

5040

ctacaaatat aaatattaaa taaatgagaa atgattcact caccaacttt tcctcatagt

5100

cattcatcca ttctagcctc tttggacact tttctttcgg cccaggattt tcctcggtt

5160

ggttttcaaa tccaacatac tagacatgta tgtggaattg gaggaggtgc tcatacagag

5220

gtggagcata tgcaggaggg gcatacagag gtactgagaa agaagtttga cttccatccg

5280

cagcaggtgg aggggcatac agacgtaccg aggaaaaagc ttgaattctg gcttgggaag

5340

ttggaggttg accatatgaa ggcggcaagt atgaatacag atgataggaa aaggttatgg

5400

tggtggtgga cgcgcaactg aaaatagtgc atgggggact gaagctgaaa catcagagcg

5460

acaatgtagt ggagagactc atcaaacgga ggggtttgtg acccatcgga ctacaagaga

5520

tccatgaagg tgttcaaac tggggaccaa cccgatattg tgtgaacaga ggggagtttg

5580

gaagagagaa acgaaatgaa atggtgtgtg gaatgagctc aaccaagta gaggtactta

5640

caaagggatt ggggatgaaa tttgtgattt tttgcaattt tttatTTTTT ggattccaaa

5700

cgatcaaaaa caactagttg caatagctag ctgtggggga tagatatccc ccgggtccac

5760

taaggagta aaagacctca cgaaaggccc aagggcccaa taaatcgtaa ggtcattctt

5820

ccgtgggcct ggggagaaac aaccaacaaa acagagaaga cgtaagaccg gattggtgca

5880

aaccggacg gccacaacg tcgaacgagt aaatcgcaac agagaccga ctttcccgcg

5940

ctggagcccc catgcaacgg agccatgcga ggataagtcg gcgagggtta cgtagggata

6000

aactcaagag gttcactacc ttttagctac ttgttggttat catatccacg tgtactgccc

6060
 cacggtcgag tatataaggc ctagggggca ccccttcaga acgatcgacc ctatcttact
 6120
 tagccacca cagcaactct ctgtgtcttc aatccagaga gccctcttgt aaccacgctc
 6180
 acatactcac caggacgtag ggtgttacgc atctctaagc ggcccgaacc tgtaaattct
 6240
 gtccactgtc cctcgtgtga tcggcacgaa ctgttttgct acagtcgtcg acaccgtcct
 6300
 actcctagaa acaccttgag gggcaacccc ggggtgtgcgg ttggacccaa aacaccgaca
 6360
 gctggcgcgc caggtagggg gtgtgtcgac gatccaagct agctcaatgg ccatcacctt
 6420
 ctacagcaag atcaccatgc gtcttgatc cgtattctgc ttcgggacaa tctcatctgt
 6480
 agcggatgaa gaggggaattc tacaccgtat cgcagatccg ccggaaaaga agactcctcc
 6540
 aacgaactcc gaaaatgccg gagaggcaca acctccagct cttcggaaaa agatcgtctc
 6600
 cggaaaggcg ggggccgagg gtcgctgac ccggaagact ccgttgtcta cttcctcgac
 6660
 gaaagaatgg acacggatca cgaggaagaa ggagaccggg gaaaagcaag tcgttctttc
 6720
 cgttcctccg gtctcaaagg agaacggaaa gaaagtcgcc gcgacagcag caccattcta
 6780
 ccccgacgtc ctcttcgtcg ggagagtgga gtcgcccacc gtctctgacg acgaaccgac
 6840
 cgcgcccgga gaagagccgc ctcaacgaga atcccgccga cggagaaaacc ggcgcaggaa
 6900
 cgttcgacga catcacgcgg ccggagaacg ggatccggag cagcctgtct cgcgagacga
 6960
 ggtctcggag ataggagaaa ctccggaaga acgcgtcttc agagaacgaa ggaactcccg
 7020
 acgacgtgat cgccggcggg ctcaggaaca ggccgagcaa gatgcaaggc aacgccggga
 7080

7140 gaatccgctc ttccggcgca acctaaatcc cgacttcgcc cgagctatga acacgccaag
 7200 cgaagtcgga ggggtactag cttggatagc tgatggactt cctcgaactc ccgacgccga
 7260 gggataccga cgctgttca cccaggcagc caaccatctt ctacctctcg ctcacccgcc
 7320 gaacgatcta cgacacgcca tcaacagtcg ccgagacgcg cgaagctcca tcaatgcttc
 7380 gcgcgaacgg cggcatgaga acgagattcg ccgtcgggag gaatacgacc gggatcatgg
 7440 catcccgact cagagccagg ccaccaggac tgagtcggca acagcctcaa ctggcggaac
 7500 caccggggga cggccgagga accacaatca caactcccct ccccgggaca gacatcgctc
 7560 ccgacaacag gaggacacgt gcggagtgtc cgctcttact ccacgcctta gggccatcca
 7620 atggcctccc aattcaagg tatccaatgt cgacaaatat gagcctaagc aggatccagg
 7680 gggttggcta gccgtctaca ccaccgtgc tcgggctgtc ggagcatctg aggacgttat
 7740 gaccgcgtat ctgcccacg tccttgggca agatgcgcta cagtggctac gacatttacc
 7800 ccgacactgc atcgacgact ggggagactt cagtcgacgt ttcaccgcca acttcagtc
 7860 cctctccgac aagccagcgc aaccgtggga cctcaaatcc atcaagcgtc ggggggatga
 7920 gactctccgg tcgtacctca aaaggttcca gaccatgaga aatcgcatcc ccgaggtcac
 7980 ggaggcggcc gtgattgagg acttctacag aggatccaac gactcggctt ttgtccgagc
 8040 catactacag aaagcgccga ctacttccga ggagctgttc cgggaagccg acctctacat
 8100 caccgccgac gagcgagctc aggacctcat cggaggagcg aagcctgcac cggcagcacc
 8160 acgacgcgac gcgaaccaac caccgacaa acgctgggag aagaggcctc gcgaagaagt

8220 acacgccgcc ggaccacctg cctctcgcgc ccgaggagga cctcgtggag gcgagcgcac
 8280 gctggacgac atcctcgacg cccagtgtcc ataccacaag gacatgcgcc acactcttcg
 8340 caactgccgg gacttcaagc actccgttgg gcatggccga ccttccaac ctctacctcc
 8400 tcctccgccg aggggaggac cggatgaacc gcgacaacct catcagccgg aggagggagg
 8460 aggaggagct ttcccacgcg tcgacaggga ggtcaacgtc atcttcggcg gacatgggtc
 8520 gcaggagaac aaaagacaac aaaagctcaa cgaccgccag atactggtgg cgaccaccgg
 8580 tcctccgcc ccataccggt ggtcagaaca cccgatcacc ttcactcggg aagatcaatg
 8640 gctcaacttc gaccatccag gcaaataccc gtcctcgtc gatccggtga tccgagagag
 8700 ccgggtgaag aaggtgctag tggacggggg gagcagcatc aacatcacct tccccggac
 8760 gtcceaaggc ttgggggctc acctcaaaga gtcacacaag tcggacactc ctttctttgg
 8820 catcgtgccg acggaggagg aatacccgtt ggggcacatc tacatgccgg tcaccttcgg
 8880 aactccggag aactacagaa tcgagttcct gaggtttgaa gtggcgaact tcgactgcgg
 8940 atacaacgcc atcattggaa gaccgggatt ggccaaattc atggccattc cgactatac
 9000 gtacatgata ctgaagatgc caggaccgca aggatcata actgtgcgcg ccgacttcca
 9060 aggcgccgca gaatgtttcc gagtggccat ccaggcagcc ctcaccacca agccgccaac
 9120 ggtccccctt acactggcga attctaagcc tgaggaggac ctgccgtac cggcaaacga
 9180 agctcaggcc gcgacctcta tgcggccgac tgaagaaacc aagcgaatca acctgggggtt
 9240 cgctgatgag cgcaagacgg ccatcatcag ctccagcttg aacgacaaat aggaaggcgc

9300 gctcgtccag ttcttgcaag ataaccgaga tgtattcgca tggcaacctg cggatatgcc
 9360 gggagtccca agagaactgg ccgagcacaa gttgaagggt tatccccagg cgaggccgat
 9420 ccggcaaaag ctacgtcgtt tcacgcccga caagagagag gccatttgcg ccgagttagc
 9480 tcgcttggtt gcggctggat ttattagaga agtattacac cccgagtggg tagctaacc
 9540 tgttcttgta ctcaaaaaga ataaagtgga ttggcgcgtg tgcgtcgact atactgatct
 9600 caacaaacac tgtcgggaagg atcccttcgg gctcccagg atagatcagg tgggtgactc
 9660 taccgccgga tgttctgtgc tgtcattctg agattgctat tccggatatc atcagattag
 9720 tttggcaaaa gaagacgagg agaaaacggc gttcatcact ccgtttggtg ctttctgtta
 9780 cacctccatg tcgttcggcc tcaaaaacgc tggagcgact tatcagagag ccattcaaac
 9840 atgcttagcc aatcactggg gcaagcgtgt ggaggcttac gtagatgatg tggatgacaa
 9900 aacagagaat tcggaaaact tcacgaaga ttacagctg gttttcaaca gcctgagaag
 9960 atatagatgg aagctcaatc ctgaaaaatg tgttttcggg gtaccagcag gaaagttgct
 10020 cgggtttatc gtcagccact ggggaattga ggctaattca gataagattg aagctatcat
 10080 gaagatggaa gtcctcgggt cacaaaagaa gggtcagcga cttactggat gtatggcagc
 10140 tctgagcaga tttatatcca ggctgggaga aaaaggttta ccattttaca agctactcaa
 10200 gaaggtggat aagtttcaat ggacttcaga agcacaagaa gctctagacg cactgaagaa
 10260 attcttgaca acagcaccag tactgaaacc accccggcga gctacgccga ctcaaccggc
 10320 tgaagatttg ctgctgtata tctcttgac gactcatgtg gtaagcaccg cgttggtagt

10380 cgagcgagta gaagaaggac atgcctatcc agtacaacat cctgtttatt tcatcagtga
 10440 agttctaggc ccctcaaaga aaaagtatcc tcaggttcag aagctattat atgcagtact
 10500 tctaactgcc cgcaagctgc gtcactactt tgacgaccac aaagtcatag tagtcactgg
 10560 ttttccaata ggggacattc ttcacaacaa ggaagccatt ggccgaatag ccaagtgggc
 10620 ttgcgagctg ggatcccacg acatcgagtt ccgacctcgc actgccatca aaactcaagc
 10680 actggttgat ttcgtatcag agtggacaga acagcaagta ccagataatc cagaaactgc
 10740 agaagtatgg cgaatgtatt ttgacggctc gctgaagctg caggagcag gggcagggat
 10800 tctcttcact gcacctggag gcgaacacct caagtacgcc ctctagttgc tattcccggc
 10860 ctctaacaat gcagccgagt atgaagcttt gatacacgga ttgaacatcg ccatatcact
 10920 gggcgtcaag agattgatgg tatacggaga ttctctggta gtcatcagcc agataaacia
 10980 ggaatgagat tgttcaagtg attcaatggg aaaatactgc gctgccgtcc gaaagctgga
 11040 agataaattc gagggctctgg aatttcatca tatagaaaga gatcgaaaca cagcagccga
 11100 cgtactgtcc aagctcggat ccggctgaac tcagggtcca accggagtct tcgtgcaaga
 11160 aattctgcag ccgagtatct caatggatca aacagaagag tgcaacgtca taaatcaacc
 11220 tgagtcagac tctgatgact ggagaaggct gattattaag tacataaaga atgacgaaga
 11280 accagacgac aagaactcgg cagagcgcac tgccaggcag tcggctcgct atacactcat
 11340 tggggaggag ttgtacagaa ggggcgcac aggcacctc atgaagtgcg ttctccgctc
 11400 cactgggaaa caacttctgg aggaggtcca cgcagggcaa tgtgggatac atgcagcatc

11460 cagaacacta gtcgggaagg ttttcaggtc aggattctat tggccgacgg cgaagaacga
 11520 tgcagccgag ttagttcaga gatgcgaagc ttgccaatac ttgtcaaagc aacagcacct
 11580 gccagcacag caactacata ccataccagt aacctggcct ttcgcatgct ggggactgga
 11640 tatgattgga cctttcaaga aagctcaagg gggatatact catgtattgg tggcgattga
 11700 caaattcact aaatggatag aattcaagcc cattgcttct ttaacctctg ctaaagccgt
 11760 ggaattcata caagacataa tattcagatt cgggataccc aacagtatca tcaactgactt
 11820 aggatccaac tttaccagtt cagaattctt cgacttctgc gagcaaaaaga gcattcagat
 11880 caagtatgca tctgtagcac atccaagagc caacgggcag gttgagcgag ccaacggaat
 11940 gatattggag gcactcagga aaagggtctt cgacaagaat gaaaaattcg caggaaagtg
 12000 gataagagaa ttaccttatg ttgtttggag cctaagaacc caacctagcc gagccctgca
 12060 tggaaacact cctttcttca tggtctatgg gtcggaggca gtgctacctg ctgatctcaa
 12120 gtttggggcg ccaaggttga tcttcgaaag catagcggaa gctgaggcca ccaggctgga
 12180 ggacgttgat gtacttgagg aagaacggct gaacgcggta atccaatcag cacggtacca
 12240 gcagactcta aggcgctatc acgacaaggc tatgcggcaa cggttctttt cagtaggaga
 12300 cctcgtcctc cgccgaattc taacgggaga gggacggcac aagttatcac ccttatggga
 12360 aggacccttc ataatagcag aagtcactcg gcccggatcg tatcgccctca ctcagatgga
 12420 tggcacagaa gttgggaact cctggaacat agagcacctc agaaaatttt atccctagct
 12480 gtatttcaaa actgctgggg cgacaatgta ttctgtaaag tggaaatatg tcgtcaataa

12540 agagagattt caaagatact cggctcgttt acaattgact tgcattctca cttaaactcg
 12600 ggtgaccact atgccctaca aacggagcaa tcggcttaag tcggcaacga cttaaaggcga
 12660 tgcaacatgc tcacgcttac ttaaccggg atgaccacta tgcctacaa acggagctat
 12720 cggcttaagt cggcaacgac ttaaggcggg gcaacatgct cacgcttact taacttaggg
 12780 tgaccactat gccctacaaa cggagcaatt ggcttaagtc ggcaacgact taaggcggtg
 12840 caacatgctc acgcttactt aacttagggg gaccactatg ccctacaaac agagcaatcg
 12900 gcttaagtcg gcaacgactt aaggcgggtg aacatgctca cgcttactta actcggggtg
 12960 accactatgc cctacaaacg gagcaatcgg cttaaagtcgg caacgactta aggcgggtgca
 13020 acatgctcac gcttacttaa cccgggatga ccactatgcc ctactaacgg agctatcggc
 13080 taaagtcagt ggtggcttaa gccggcgcaa catactcgcg cccatataat tcagggggacg
 13140 acttccatat cccgccaaca aatttcatga tcatcatgcg tcattaccac aaatttacga
 13200 accaataaat tctgatacga taagagagta attatgtcat tcgaatgata aactgatgta
 13260 ttttaacaaa tactgatca tgctaaccgc gcgctcagag cagcaaaaat gtttctctat
 13320 ttcgcaatgt ctttttcagg aacgaccgac gaagtaggac gattcgagga atcgggggca
 13380 gcattcacgt cagcctttat gtcttcagga acaaccacgc cgggtctcct cattaagatt
 13440 cgtccagcac gaatagcctt gtccatggct ttatcgcgct gggctttgag agtagtcgca
 13500 gtttcttcgg caacttttagc agccagccga gcagcctcta actcctgggc aatggatttc
 13560 ttggaagctc ggagttcttt gatggtggca tccttcgctg atatcacttg cctaaggcgg

13620 gtcacttcgt ccgcagattc ttgcagccta caacgctgat tgtccagttc ctccattgta
 13680 aagcgggtgac tcctctccaa gatggtcagc gagttgttag aatcacgata caatctgtct
 13740 agattgtcac gagaagcagc aaggatacgt ttttcttcct acaaacaaaa atcaactcct
 13800 tcagaaatca agcaagtaat aacagcacac ggttttgttaa gttacctttt cagagtcaag
 13860 ccgagcatga agagaagaac tcagggcatt ggcatcatcc aaagcagcgg agacctgatt
 13920 taattcagtt tgactctgag agtacttctc ctggaagtca gcgcaccggt gaaccatttc
 13980 agcctgctct cgggagtggt tttcctcaag aactgcaatc tgctgagtca ttctatcaa
 14040 gaggtaatca aacaaaatga ggtcagaagg taaaacagtc cacgaacaaa ggcgaagaag
 14100 aataagaaaa aagggcacta accagcgta gttgcctcca actcggatac acgacgatga
 14160 agcgacactg gattccaaca cgcaagagac gaagccactt ctggggcgga agcacctgc
 14220 gatctcagct ggctggccat cccatctacc aaagcctgat aagaagaaca gatgaacata
 14280 atgacaaaag ttcacgcaac ataaagaaca agctaaaata cagcacagta cctggaggtt
 14340 ggaaaagaac gaagggatcc ccaaatcagg agaatcagc tgataaccag gcgcaaggcc
 14400 accacccgaa gcagcttgca acgaaccagt aggaatcagt tcagtgcctt caacagagcc
 14460 aaacgcccga tcagcgggga cgctgccctc taaaatgcct ctctgggtcca aagtttgggc
 14520 taccaccatg cagccagagt gtggaggtga acccacgtga acgtccatag aagtgcagga
 14580 aggagaccct gctcgggcac cctcgggggc tgggtcatag ttggcactgc ccacttgagc
 14640 cggatcatcc ccggcagaac cctcgggggc tgggcagtgg cttacattct tcacccgagc

14700 taagtcatcc ccagcgacac cctcgggggc tgggcatgtg tcagcaccat tcttgagatc
 14760 caggctctcc gcagtaacca cctctaaggt tgacgggcct tcagccactt ccatggaacc
 14820 aggacaatcc aagtcagcat cccgaccctc gagatcgcg tctaaggctg acgaggcacg
 14880 ggatgacctc aaccagcat caggcacggc agcgcaagcc tccgttgcat catcatccac
 14940 tggctctgat aacaagtcct ctgggacat atcctcaaga gtttgatcaa agttggccag
 15000 ggacagctct tgcagaccaa tgagggcaga caaagcagga gaaggaactc cactacttcc
 15060 accgctggcg atgaactgcc gactgttttt ccgagttaa ggagcttcat tttcttctc
 15120 ctcatcttcc acagtgacaa cacaagcagc accccattg ggatcagcaa cagatggagc
 15180 acccacattg ggatcagcag cagtttgggt acaccattg gggtcagcgt cagtaaggcc
 15240 agttgcaggc acttcttcaa cagcaggaac taaggtagc gcgtctcat caaaactgga
 15300 tactcgccgg aggcgtcttc ttttcttctt ttgctcatca gcagaaggct caggctgact
 15360 ggttcggcta gggcgccctc ggcgagtatt gactggtttc tggacatcca aagttgtatc
 15420 aacctctgga aggggcacca ctgccaacgt accagcagga gcagcgtcgg aggaatctc
 15480 agctagcaga tcaagcatgg catttatgtc cgcactacta gggttcaggg gcacctcaa
 15540 atggacctgc cgttcgtcat caggaatctc cccaagcgaa gcaaccaagg taccgacttc
 15600 ttcagcagag gatcgactc taaggcccaa attgccatca gtcacaggcg gatttgacac
 15660 aaaaagggtg aaagctttgg gaggaggcag gttccaggcc gagtatgcca ctggagcacc
 15720 aacattcgaa accttcccc tgaggatcat ttcaagtcgg cctaccaagt ccacaggagg

15780 aattctccta ttgtaaccc gagttgagtc ggctaaccct cgatacagat atgctggata
 15840 ggccctgtct ttcagtggct gaatgttctt aaaaacaaag tcagtgacca cagcttcagc
 15900 agttagaccc ctctctttca gcagtccaac ttcagttagc aacacacctg cctcagccac
 15960 ttcctgatct gtgggagact cagtccagct cggagtgcga acgtctggct gtcttccga
 16020 ccgggggggg ggggaatttc cataattatc aactatgaac cactctagac gccatccctt
 16080 aatactgtcc ttgaggggaa tctcaagata ctcagttttc cgcccgcggc gcctctccaa
 16140 actggcacct ccgaccaact gatgctgtcc cccggccatc ccagggcgac aatgatacaa
 16200 atacttccat aagccaaaat gcggcagcac gccaaagaaag gcttcgcata agtggacgaa
 16260 aatggagatt tgcagaatgg aattaggatt caaatgggtc aagttaatgt ggtagaaatc
 16320 aaggaggtcg cggaaaaagg gagagatggg aaggccgagg ccgcggagaa gaaaaggagc
 16380 gtaaactaca gactcgtggg tatcctctgt cgggacagta gtcccgtggc aaatccgcca
 16440 agaacagagt tctcgcggag gaagaacctc gatggatacg aggtggagaa gttcagcttc
 16500 ggaaatgatg gacatatggg tacctgcgaa gggcaactgg ctgttggggg cgattggagg
 16560 gatcaccgca gcagacgagc tcgcagtttt cctcttgggc gccatcttga tttcaccag
 16620 cgaacagaat agggggcgaa tggcagagag gattcagaag cgggaatgca agaactaggg
 16680 cacggaaagc aaaggcggct aaaagcgcag ctcttatggg atattctcga gccagatacc
 16740 gtttcaaaag tgcccagtca tcacccgacg gttatttccg aaaccccagc atgccacgtg
 16800 gtcactctggc agttatttcc aaaaagccga cgtgtcactt catcactcgg ttatcatcct

16860 caaaataact catgcggcgc gctatcactc ggcggttgact ctaaaacgct gatttcatat
 16920 tcagtcgctc ggcatcact ctaaaatgcc gacgtcacca tccagacact cgggtgttgac
 16980 tctaaaacgc tgatttttta ttcagttgct cggcattacc actaaaaagc cgacgccgac
 17040 ctccagtcac tcggcggtgc ctctaaaacg ctgatctcgt attcaatcgc tcggcattac
 17100 ttctaaaatg ccgacgttaa ctttcaatca ctccggcgtg actctaaaac gctgatttta
 17160 tattcagttg ctccgcatca ccaactaaaa gccgacaccg acctccagtc actccggcgtt
 17220 gcctctaaaa cgctgatctc gtattcaatc gctccggcatt acttctaaaa tgccgacgtt
 17280 aaccttcaat cactccgcat tgccctctaa acgctgatct cgcattcgat cgctccgcat
 17340 tacttctaaa atgccgacgt cgaccttcaa tcaactcggc ttgcctctaa agcgatgac
 17400 tcgtattcga ttgctcggta ttacttctaa aatgccgacg tcgaccttca atcgctcggc
 17460 gttgcttcta aaacgccgat accgactaca agattactcg gcagctactt ctggaagcgt
 17520 cagcgtgata cccaagttat tcatctactg tctcaaaaga atcagtttta taatcaagca
 17580 aagcgagaca tcaagaagga gccaacgtca ttctttcatt aagggaagac aataagttta
 17640 caaatcaact ctttgcgagt tgatgcttcc ctactattac tacattacat tactactact
 17700 actatactat actatactac tctacattac tactacatta ttctaactac actatactaa
 17760 tatctaaaga ccagcgacgc ttagccactg gccttgctgc tgctgccacc gccgccgcc
 17820 ctggtgctgc ccttgctgct gccgcctctg gtgctgcccg tgctgctgcc gcctctggtg
 17880 ctgcccttgc tcccgtcacc gctgccgctg ccccgccgc tgccgctgcc gtgaccatcg

17940 ccgtcgccac cgtcgtcgtc gtcgtcttcg tcgtcgtcgt catcctcgcc ctcgccgtcg
 18000 tccgagtcct cctcctccga ggagaactcc gactcatccg agccctcgag cccggagcgc
 18060 tcgacggccc ggatgtacgt ccagacttcc gcggaatcc cctgggagtc gtctgaatca
 18120 tcagacgacg ccgggggaga gacgggagcc agagaccct cggactcgga ggagaactcc
 18180 tcctctgagt attccgagtc gccgaagtcc tccgacggag gagtccgctc gcgcttgctg
 18240 ttgttactct tgcccatggc ggaagcagac aggagagaag agaaggatgc agtaaagaac
 18300 agcgaagaga tgtgaaaaaa ccagaggagc aacggcgta tttatagaag ggaaaggcaa
 18360 ccgctcacct ccaaccgtgg tcaactaaaca gtcgcaaagc attcaataag cacttccacc
 18420 cgtctgaaga cgcgtcagac ggctgacgcc gtttcatgca acactacacc cattgggact
 18480 ccagtcaaca gcgcaaagga tatgattaca ctgccgtcc catcacatta ctactcagaa
 18540 gcagccggct aaaacactca gcgtaccaag ccgtcccttg cccacacca ttggggggac
 18600 gccaggaat tatcagtata tttttcaaaa cggtcacatc cgtgcagggc acgcagtga
 18660 tacctcaaga caaaaatgag atatcagtaa ggatcagagg aaagccaaat atagccagca
 18720 atgtacaaga tatggccgac agaagcgacg tgaagactag acagagaacg tccgtcaaac
 18780 gtccaatcag tcgcagaagc aaataaattg cactacctag caagatatgg atggattgca
 18840 aactcggctg ctaaagacaa aatatacgct gacctctgca gcaaaatatt gatgacataa
 18900 tgctgacctc caaagcataa tgcaaatagc ttcatgccaa tttttacaaa cgaaagaaag
 18960 accttgaat ggattatcct caaaaatcca tttgaaggct gggggctaca cccattgggt

19020 gcacctccgg tgcaccccct ggattatcat tccaaaccga gatagtgccg acttctaagg
 19080 cacgggacaa gattaaaata ccaatcctcg accaagatgc aggagcacia atggagataa
 19140 tttctgggga agaccttcga gtagattatt ttctaaaaat ctactcaaag gtcgggggct
 19200 acacccattg ggtgcacctc cgggtgcaccc aatgaagttc agaatcctgc aaatcgaat
 19260 gtcgacctct aaggcacaag cacgaaacta agcttcggtc aaatgagcga tcggagcaag
 19320 agaagacagc aggaagtcac tttttggacc tgggatcttt gggttgatta cctctaaatt
 19380 aacccaaaga tcgggggctt gtggtggata gatatcccc gggtccacta agggagtaaa
 19440 agacctcacg aaaggcccaa gggcccaata aatggttaagg tcattcttcc gtgggcctgg
 19500 ggagaaacaa ccaacaaaac agagaagacg taagaccgga ttggtgcaaa cccggacgac
 19560 ccacaacgtc gaacgagtaa atcgcaacag agaccgact ttcccgct ggagcccca
 19620 tgcaacggag ccatgcaagg ataagtcggc gagggttacg tagggataaa ctcaagaggt
 19680 tcactacctt ttagctactt gttgttatca tatccacgtg tactgcccc cagtcgagta
 19740 tataaggcct agggggcacc cttcagaac gatcgaccct atcttactta gccccccaca
 19800 gcaactctct gtgtcttcaa tccagagagc cctcttgtaa ccacgtcac atactcacg
 19860 ggacgtaggg tgttacgcat ctctaagcgg cccgaacctg taaatcttgt ccaactgtcc
 19920 tcgtgtgatc ggcacgaacc gttttgctac agtcgtcgac actgtcctac tcctagaaac
 19980 accttgaggg gcaaccccg gtgtgcggtc ggacccaaaa caccgacact agcacacgtg
 20040 gaccaattga aagccccac cttgctctcg ttctgctc gttcacgcca gcgcgtcacc

20100 caccactgc gccctctcat cctccttgcc cgagaacgtg cttcagagca ggcgagagt
 20160 gggcgatatt gcccgaggga tgcattcttc cctcctctca ccccgggcca ggctacaaca
 20220 gccccctact gcccaaccac tcgccctcgt tggcaccaac catactacca caacactcca
 20280 atgcacaatt tttaatgtta gcctatatcc accttagcat cacatcatat ttcttctaca
 20340 aaattatatt tagaacgaaa cagcagcttt tgcttggaat tttttcgatg gagtagaaaa
 20400 aatataatcc aaacaaatta cgtaaaatac gtaaaataaa aatatagct cctaaaagtt
 20460 aaaattactc atcattatca cctcctcgt tttcttctc gtctagtttt aattgcgtga
 20520 tcaatttttt tagaaccaac ctagaccctc ctcataccag tggtaggattg tttcagtaac
 20580 ttggtgaact ggtcgtacaa ttttttgatt ggtttctcgt gtcactaacc ttgaataatt
 20640 gttcgttat ggttttcttc tggacaaggg actcattggt actattcct ggtgcctaac
 20700 cttgttttg tgctcttgcc caatcacgac caatagggtg tggtaggttg gcactatcgg
 20760 acgatgtaga gttataatca cctccacgt tgaggcaaga tcattttctc tcattgctag
 20820 agtttgaatc accatgtcac gtgcaccact tgaattgatg atgaagagca cgccattagt
 20880 ttcattgagc ctgttggtga agagtagcat aacattattt gatctgctcg gtaggttata
 20940 cgtggccgat atttggcacc aaaaggtcaa acatttttgt tgtttccctc aaatctttt
 21000 tggctcaaaa aaggtcaaac ctttttttg cttccatcc ctgtcccccac gaacagtcac
 21060 gagtaacttt ttctcccatc cccgttcgtg tgggggaatt tatcccatg ggaaatctat
 21120 ccctgttaga gaatgtaata tttttggggc aaggtcaaat tgataaacca atataaattg

21180 aacaaataag attttaaatt acaagagaaa tctacttttag agttgagctt gctattttat
 21240 aaaaggctat gtgttgaatt tttattataa ctttaacata tcaatggatt gatttttagat
 21300 taagagaagt tcgtgggggc ggatatgcga ggaacaggga tggggaatgg ttcaccattc
 21360 tcgtcccacg aacacgacaa ggactaaatt tttctcgttt caatctccgt ggggactaaa
 21420 ttacacctat ccccgctcac taataaaggg ataccccgcg gggaattagg gatcacgtcc
 21480 ccatttcaca ttttttagact tctcacattg agcaacaaca aaacatttta tgaattagta
 21540 gccattttac ttatctaaaa caattactat tgaatcttaa tcattttgtg caaaataaag
 21600 aatgaactaa attttgggtc ggggtgtgggt caccgtagg ttgaaataaa aactcgcacc
 21660 cacactcgtg aaactttggg tcagatgagg gttacaccg cggattaaaa tctctacca
 21720 taccacacc cgtcagatcg agtaccctaa gattttgggt ttgcgggtta aattgtcatc
 21780 cctagacacg agtgtgctgg aggatttgga agtttcgca tgcgtactta ccaagtgttt
 21840 ggttctatgg attaaagttt agcatgtgtc gcattagatg attgaatgcc tattatgagt
 21900 attaaatatt gtctgattat taatcaaatt acacaagtga aggctaaaca actagacaaa
 21960 tttattaagc ctaattaatc tatgattagc aaatgtttat agtagcagca tcttagtgaa
 22020 tcatgaacta attaggttta ataggttcgt cttaacgttt agttcttctc tatgtaatta
 22080 attttataag taaactatat ttaatatcc taattagtct ccggatataa catagactaa
 22140 aatttagtca gtgggtgctg tgctggctcc ttttcatttc atccgacata atgttttcct
 22200 cccaatttat tgtgttggtt tgtttggtgt ttaaaaatga cttgtcctct gcttgctgta

22260 tcaaggtcgt gatgtgtgct taacttattc ccttccttcc tagctgccct tagcatttat
 22320 ataggggtat ttggttacat ggactaaagt ttagtttagt ccatgtccaa ttataaaact
 22380 aattacataa ctgaatacta aaataccaaa atacgagaaa aattattaaa cctaattaat
 22440 ttattattag caatgtttat tgtaacatca cataagcaaa gcatagactg atttagttta
 22500 ataggttcgt cttatcattt agtcttgatc tgtataatta gggtagttt ggttcaactgc
 22560 ctaacttacc acactttgcc taacttttct gcctaagggt agttcttcaa tttgaacgac
 22620 taaccttagg caaagtatgg cgtagttagc cacgaaccaa acagtccctt agttttgtaa
 22680 ttaaactata ttactattt ttaactagta tccaaacatt aaatgtgaca tggattaaaa
 22740 tttagttagt gacttttaggc ttttagagtt gagttagttg tagcttggtt tagttatttg
 22800 tttgttctct tgcgtttatt taggacctct ctataatgtt ttatcacctt aatacaaatt
 22860 aaaatacgca gctcttgtgt attgcaggcg tgtgtgttcc tatattttta ggctcaatta
 22920 tgaaggaaat tattctcagc gagcatataa ccgttttgga ggtaaaatga actaaaagca
 22980 tataggcctg cctgtttgca taagtacacc ctccgtctaa aaaagaataa aaatctcatt
 23040 tcttgatgag tcaaaaaagt tcaaatttaa gaaaatatat gttacgacac gaatatttat
 23100 aatgtgtaat aagtaccgct agattaattt taaaataaaa ttttcataat aaacctattt
 23160 gaagatacaa gtattggtac tatttctaataaatctaatc aaactgggtg tatatctttt
 23220 ggaacaaatt tgtgctttat gtttctgggt gacgtgaatc agcttaatct tgacgaaatc
 taacattgtc ttttgttcgt tggcatacag gatcaacaaa aaggagagaa gcagcatcta

23280
 23340 ttgttggttaa gagcctatag tcaataccca tgttcatttc gtctaaaaga gcagaagaaa
 23400 agcatatgat gaattattgc catgtcatgt ttaaaataca gaattctcaa aaacaaaaac
 23460 aaaaaaaaaa acttggaatc cactaaccac tgatagcatt gtagaaaatt tcatcctccc
 23520 tttgggcaat aactgatga gtttacatgc tgactagtgg tgcatttggt ctttgccaat
 23580 tgagttttta gaatgctttg cagctgaatt cacttgatg gtttttttt gtgtgtgatg
 23640 cagggtgctgt tgccgttgca ttctgtgtc tagtcattct cacatgcttc ttggcttgta
 23700 gacattgttc gctgcccttc aaatcgaaga acaaaccagg gacaaggatt gagtccttcc
 23760 tacagaagaa cgagagtagt atacatccga aaagatacac ctacgaggac gtgaaaagaa
 23820 tgacaaaatc cttcgctgtg aagctaggcc aaggtgggtt tgggtgctgta tacaaaggca
 23880 gcctccacga tggccgacag gtagcagtca agatgctgaa ggacacccaa ggtgacggcg
 23940 aggaattcat gaacgagggtg gctagcatca gcaggacttc tcatgtcaac gtcgtgacac
 24000 ttctagggtt ttgcttgcaa gggtcgaaaa gagcactgat ctacgagtac atgccaatg
 24060 gttcgctcga aaggtatgcc ttcaccggtg acatgaacag tgagaatttg ctaacctggg
 24120 aaagactatt tgacatagcg attggcacgg ccagagggct cgaataccta caccggggat
 24180 gcaacactcg gatcgtgcat tttgacatca agccacacaa catcctgtta gaccaggatt
 24240 tctgccctaa gatctctgac tttggactgg ccaagctatg tctgaacaaa gagagcgcta
 24300 tctccattgc tggcgcaaga gggacgatag ggtatatcgc cccggaggtc tactcaaagc
 aatttgaac gatcagcagc aagtctgatg tctatagcta tgggatgatg gtccttgaga

24360
 24420 tggttggagc aaggacagg aatacaagcg cagatagtga ccatagcagc caatatttcc
 24480 ctcaagggtt ttatgaacat ttggacgact attgtgttgg tgcttccgag attaatgggtg
 24540 agaccacaga gctcgtgagg aagatgatag ttgtaggtct gtggtgcata caagtgattc
 24600 cgactgatcg accaacaatg acgagagtcg tcgagatggt ggaaggaagc acaagtaatc
 24632 tagagttgcc acccagagtt ctcttgagct ga

<210> 2
 <211> 2004
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> кДНК, отримана з гена Ht2 (SEQ ID NO: 1)

60 atggctgctc acctaccacg cctccccgtc ctctctctcg tctctctcgc tgcccatgct
 120 gtctccacct ccgcccattg cgagcctcct cttccgagcc cttacagcac ctccgcccatt
 180 ggcgagcctc ctcttccgag cacttacaac gtctccattg gctcggaatc gttctgggtg
 240 ggcgggctcg aaatccgcta cccgttctat cttgccaaac caaccgccga ctacagcggg
 300 agctactact cctgcggcta caccgacttg agcgtttcct gcaaaactga ggctcgagggg
 360 ccgacgacga catggacccc taccatccgt ctggcgggcg acaactacac cgtcaagaac
 420 atcttgtagc actatcatac catctcactg gcggacagcg atgtgctcgg aggcggcgag
 480 tgccccgtcg tccaccacaa cgtcagcttc gacgagacgt ggctgcacaa ccccagcgcc
 540 ttgacaacc tcaccttctt cttcggatgc cactggggggc cacgcgatac actgcctgaa

600 tttgccggca acaacatcag ctgcgccggg ttcagtactc cagctatcag cggtaggaggc
 660 tccttcgtgt tcaagcctga agatcttgac gaacatgcgg agcaggagtt ggcttcacac
 720 tgcgacgagg ttttctccgt gccagtgaga agcgaggctc tgcagcaggc gatcgtcagc
 780 aacctcagcc tcggggacgg gtacggcgag ctgcttaggc aggggatcga gttggaatgg
 840 aaacggacat cggaggatca gtgtggccag tgcgaggaat cgggctccgg cggacgggtgc
 900 gcctacagcc agaagagaga attccttggc tgcttctgca gcggagggaa ggccgggcaac
 960 ccgttctgca aaccatcaag atcaacaaaa aggagagaag cagcatctat tgttggtgct
 1020 gttgccgttg cattcctgtg tctagtcatt ctcacatgct tcttggcttg tagacattgt
 1080 tcgctgccct tcaaatcgaa gaacaaacca gggacaagga ttgagtcctt cctacagaag
 1140 aacgagagta gtatacatcc gaaaagatac acctacgcgg acgtgaaaag aatgacaaaa
 1200 tccttcgctg tgaagctagg ccaaggtggg tttggtgctg tatacaaagg cagcctccac
 1260 gatggccgac aggtagcagt caagatgctg aaggacaccc aaggtgacgg cgaggaattc
 1320 atgaacgagg tggctagcat cagcaggact tctcatgtca acgtcgtgac acttctaggg
 1380 ttttgcttgc aagggtcgaa aagagcactg atctacgagt acatgcccaa tggttcgctc
 1440 gaaaggtatg ccttcaccgg tgacatgaac agtgagaatt tgctaacctg ggaaagacta
 1500 tttgacatag cgattggcac ggccagaggg ctggaatacc tacaccgggg atgcaacact
 1560 cggatcgtgc attttgacat caagccacac aacatcctgt tagaccagga tttctgcctt
 1620 aagatctctg actttggact ggccaagcta tgtctgaaca aagagagcgc tatctccatt

1680 gctggcgcaa gagggacgat agggatatatc gccccggagg tctactcaaa gcaatttggg
 1740 acgatcagca gcaagtctga tgtctatagc tatgggatga tggtccttga gatggttggg
 1800 gcaagggaca ggaatacaag cgcagatagt gaccatagca gccaatatit ccctcagtgg
 1860 ctttatgaac atttggacga ctattgtgtt ggtgcttccg agattaatgg tgagaccaca
 1920 gagctcgtga ggaagatgat agttgtaggt ctgtggtgca tacaagtgat tccgactgat
 1980 cgaccaacaa tgacgagagt cgtcgagatg ttggaaggaa gcacaagtaa tctagagttg
 2004 ccacccagag ttctcttgag ctga

<210> 3
 <211> 667
 <212> ПРТ
 <213> Кукурудза Zea mays

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Glu Val Glu Gly Pro Thr Thr Thr Trp Thr Pro Thr Ile Arg Leu Gly

	100		105		110														
Gly	Asp	Asn	Tyr	Thr	Val	Lys	Asn	Ile	Leu	Tyr	Asp	Tyr	His	Thr	Ile				
	115						120					125							
Ser	Leu	Ala	Asp	Ser	Asp	Val	Leu	Gly	Gly	Gly	Glu	Cys	Pro	Val	Val				
	130						135				140								
His	His	Asn	Val	Ser	Phe	Asp	Glu	Thr	Trp	Leu	His	Asn	Pro	Ser	Ala				
145					150					155					160				
Phe	Asp	Asn	Leu	Thr	Phe	Phe	Phe	Gly	Cys	His	Trp	Gly	Pro	Arg	Asp				
				165					170					175					
Thr	Leu	Pro	Glu	Phe	Ala	Gly	Asn	Asn	Ile	Ser	Cys	Ala	Gly	Phe	Ser				
			180					185					190						
Thr	Pro	Ala	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Val	Phe	Lys	Pro	Glu	Asp				
	195						200					205							
Leu	Asp	Glu	His	Ala	Glu	Gln	Glu	Leu	Ala	Ser	His	Cys	Asp	Glu	Val				
	210					215					220								
Phe	Ser	Val	Pro	Val	Arg	Ser	Glu	Ala	Leu	Gln	Gln	Ala	Ile	Val	Ser				
225					230					235					240				
Asn	Leu	Ser	Leu	Gly	Asp	Gly	Tyr	Gly	Glu	Leu	Leu	Arg	Gln	Gly	Ile				
				245					250					255					
Glu	Leu	Glu	Trp	Lys	Arg	Thr	Ser	Glu	Asp	Gln	Cys	Gly	Gln	Cys	Glu				
			260					265					270						
Glu	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Arg	Cys	Ala	Tyr	Ser	Gln	Lys	Arg	Glu	Phe				
	275						280					285							
Leu	Gly	Cys	Phe	Cys	Ser	Gly	Gly	Lys	Ala	Gly	Asn	Pro	Phe	Cys	Lys				
	290					295					300								
Pro	Ser	Arg	Ser	Thr	Lys	Arg	Arg	Glu	Ala	Ala	Ser	Ile	Val	Gly	Ala				
305					310					315					320				

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Leu Cys Leu Asn Lys Glu Ser Ala Ile Ser Ile Ala Gly Ala Arg

530	535	540
Gly Thr Ile Gly Tyr Ile Ala Pro Glu Val Tyr Ser Lys Gln Phe Gly		
545	550	555 560
Thr Ile Ser Ser Lys Ser Asp Val Tyr Ser Tyr Gly Met Met Val Leu		
	565	570 575
Glu Met Val Gly Ala Arg Asp Arg Asn Thr Ser Ala Asp Ser Asp His		
	580	585 590
Ser Ser Gln Tyr Phe Pro Gln Trp Leu Tyr Glu His Leu Asp Asp Tyr		
	595	600 605
Cys Val Gly Ala Ser Glu Ile Asn Gly Glu Thr Thr Glu Leu Val Arg		
	610	615 620
Lys Met Ile Val Val Gly Leu Trp Cys Ile Gln Val Ile Pro Thr Asp		
	625	630 635 640
Arg Pro Thr Met Thr Arg Val Val Glu Met Leu Glu Gly Ser Thr Ser		
	645	650 655
Asn Leu Glu Leu Pro Pro Arg Val Leu Leu Ser		
	660	665

<210> 4
 <211> 49
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер аллеля HT2/HT3 маркера Affx-91328160

<400> 4
 gaaggtcgga gtcaacggat tgggaagatt catatttggt tacatcacg

49

<210> 5
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

51 <223> Праймер альтернативного алелю маркера Affx-91328160

<400> 5
gaaggtgacc aagttcatgc taagggaaga ttcataatttg ttacatcac a

<210> 6
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Загальний праймер маркера Affx-91328160

29 <400> 6
ctccacagtt ttactccca agtttagaa

<210> 7

<211> 40
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер алелю НТ2/НТ3 маркера PZE-108095339

40 <400> 7
gaaggtcgga gtcaacggat tctggcgtg ctgcaggacc

<210> 8
<211> 38
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер альтернативного алелю маркера PZE-108095339

38 <400> 8
gaaggtgacc aagttcatgc ttggcgtgct gcaggact

<210> 9
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Загальний праймер маркера PZE-108095339

27 <400> 9
gtttcgggtt tcagaagtca aacggtt

<210> 10
<211> 47
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер алелю НТ2/НТ3 маркера МА0064

47 <400> 10
gaaggtcgga gtcaacggat tatgaacttc tttttggtcg ttttcgc

<210> 11
<211> 48
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер альтернативного алелю маркера МА0064

48 <400> 11
gaaggtagacc aagttcatgc tgatgaactt ctttttggtc gttttcgt

<210> 12
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Загальний праймер маркера МА0064

26 <400> 12
gctagaacat ggctatacga gaacaa

<210> 13
<211> 40
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер алелю НТ2/НТ3 маркера МА0063

<400> 13
gaaggtcgga gtcaacggat tggtagagcag ccatggcgga

40

<210> 14
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Праймер альтернативного алелю маркера MA0063

39

<400> 14
 gaaggtgacc aagttcatgc tgtgagcagc catggcggg

<210> 15
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Загальний праймер маркера MA0063

23

<400> 15
 gtgaaccag ccaacctcgt ctt

<210> 16
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер алелю HT2/HT3 маркера MA0062

51

<400> 16
 gaaggtgacc aagttcatgc tatctaata aactgggtgtt atatcttttg g

<210> 17
 <211> 53
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер альтернативного алелю маркера MA0062

53

<400> 17
 gaaggtcgga gtcaacggat taaatctaata caaactgggtg ttatatcttt tgt

- 29
- <210> 18
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
- <220>
 <223> Загальний праймер маркера MA0062
- <400> 18
 cacgtcaacc agaaacataa agcacaat
- 44
- <210> 19
 <211> 44
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
- <220>
 <223> Праймер алелю HT2/HT3 маркера MA0045
- <400> 19
 gaaggtgacc aagttcatgc taacatccca aagcactgaa cgga
- 43
- <210> 20
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
- <220>
 <223> Праймер альтернативного алелю маркера MA0045
- <400> 20
 gaaggtcgga gtcaacggat tacatcccaa agcactgaac ggc
- 30
- <210> 21
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
- <220>
 <223> Загальний праймер маркера MA0045
- <400> 21
 csaagaactc tattagattg ttgaatagca

<210> 22
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Праймер алелю НТ2/НТ3 маркера Affx-91328160

 <400> 22
 gggaagattc atatttgttt acatcacg
 28

 <210> 23
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Праймер альтернативного алелю маркера Affx-91328160

 <400> 23
 aagggaagat tcatatttgt ttacatcaca
 30

 <210> 24
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Загальний праймер маркера Affx-91328160

 <400> 24
 ctccacagtt ttactccca agtttagaa
 29

 <210> 25
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Праймер алелю НТ2/НТ3 маркера PZE-108095339

 <400> 25
 cttggcgtgc tgcaggacc
 19

 <210> 26
 <211> 17

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Праймер альтернативного алелю маркера PZE-108095339

 <400> 26
 tggcgtgctg caggact
 17

 <210> 27
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Загальний праймер маркера PZE-108095339

 <400> 27
 gtttcgggtt tcagaagtca aacggtt
 27

 <210> 28
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Праймер алелю НТ2/НТ3 маркера МА0064

 <400> 28
 atgaacttct ttttggtcgt tttcgc
 26

 <210> 29
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Праймер альтернативного алелю маркера МА0064

 <400> 29
 gatgaacttc tttttggtcg ttttcgt
 27

 <210> 30
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Загальний праймер маркера MA0064

 <400> 30
 gctagaacat ggcgtatacg gaacaа
 26

<210> 31
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Праймер алелю НТ2/НТ3 маркера MA0063

 <400> 31
 ggtgagcagc catggcgga
 19

<210> 32
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Праймер альтернативного алелю маркера MA0063

 <400> 32
 gtgagcagcc atggcggg
 18

<210> 33
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Загальний праймер маркера MA0063

 <400> 33
 gtgaaccsag ccaacctcgt ctt
 23

<210> 34
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>

30 <223> Праймер алелю HT2/HT3 маркера MA0062

<400> 34
atctaataca actggtgtta tatcttttgg

<210> 35
<211> 32
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер альтернативного алелю маркера MA0062

32 <400> 35
aaatctaatac aaactggtgt tatatctttt gt

<210> 36
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Загальний праймер маркера MA0062

29 <400> 36
cacgtcaacc agaaacataa agcacaat

<210> 37
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер алелю HT2/HT3 маркера MA0045

23 <400> 37
aacatcccaa agcactgaac gga

<210> 38
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер альтернативного алелю маркера MA0045

22 <400> 38
acatcccaaa gcaactgaacg gc

<210> 39
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Загальний праймер маркера MA0045

30 <400> 39
ccaagaactc tattagattg ttgaatagca

<210> 40
<211> 53
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Маркер MA0070

53 <400> 40
gaaggtcgga gtcaacggat tcaattttct aaaaagattg gcagcaatta att

<210> 41
<211> 53
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Маркер MA0070

53 <400> 41
gaaggtgacc aagttcatgc tcaattttct aaaaagattg gcagcaatta atg

<210> 42
<211> 25
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Маркер MA0070

<220>

<221> інший_ознака
 <223> Вироджений код R=A/G

 <400> 42
 craaccaag ttaccgctat aagcc
 25

 <210> 43
 <211> 42
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Маркер МА0071

 <400> 43
 gaaggtgacc aagttcatgc tgagctagct tgagctcgac cg
 42

 <210> 44
 <211> 42
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Маркер МА0071

 <400> 44
 gaaggtcggg gtcaacggat tgagctagct tgagctcgac ca
 42

 <210> 45
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Маркер МА0071

 <220>
 <221> інший_ознака
 <223> Вироджений код Y=C/T

 <400> 45
 gcttatagcg gtaactttgg ttygc
 25

 <210> 46
 <211> 32

32

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Маркер MA0070

<400> 46
 caatttttcta aaaagattgg cagcaattaa tt

32

<210> 47
 <211> 32
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Маркер MA0070

<400> 47
 caatttttcta aaaagattgg cagcaattaa tg

25

<210> 48
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Маркер MA0070

<220>
 <221> інший_ознака
 <223> Вироджений код R=A/G

<400> 48
 cгаaccсаааg ttaccgctat aagcc

21

<210> 49
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Маркер MA0071

<400> 49
 gagctagctt gagctcgacc g

21

<210> 50
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Маркер MA0071

<400> 50
 gagctagctt gagctcgacc a

25

<210> 51
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Маркер MA0071

<220>
 <221> інший_ознака
 <223> Вироджений код Y=C/T

<400> 51
 gcttatagcg gtaactttgg ttygc

41

<210> 52
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Маркер Affx-91328160

<220>
 <221> інший_ознака
 <222> (21)..(21)
 <223> Вироджений код R=A/G

<400> 52
 ttcatatttg ttacatcac rattctaaac ttgggagtaa a

53

<210> 53
 <211> 41
 <212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Маркер PZE-108095339

<220>

<221> інший_ознака

<222> (21)..(21)

<223> Вироджений код R=A/G

<400> 53

acgtggcgcc agccacgcac rgtcctgcag cagcccaagc a

41

<210> 54

<211> 41

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Маркер MA0064

<220>

<221> інший_ознака

<222> (21)..(21)

<223> Вироджений код Y=C/T

<400> 54

ttcttttttg gtcgttttcg ytcctttggt ccgtatacgc c

41

<210> 55

<211> 41

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Маркер MA0063

<220>

<221> інший_ознака

<222> (21)..(21)

<223> Вироджений код Y=C/T

<400> 55

ccagccaacc tcgtcttctc yccgcatgg ctgctcacct a

41

<210> 56
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Маркер МА0062

<220>
 <221> інший_ознака
 <222> (21)..(21)
 <223> Вироджений код K=G/T

<400> 56
 aactggtggt atatcttttg kaacaaattt gtgctttatg t

41

<210> 57
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Маркер МА0045

<220>
 <221> інший_ознака
 <222> (21)..(21)
 <223> Вироджений код M=A/C

<400> 57
 catcccaaag cactgaacgg mtatgccatt actttgacaa t

41

<210> 58
 <211> 61
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Маркер МА0070

<220>
 <221> інший_ознака
 <222> (31)..(31)
 <223> Вироджений код K=G/T

<400> 58

60 aattttctaa aaagattggc agcaattaat kggggcttat agcggtaact ttggttygca

61 t

<210> 59
<211> 61
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Маркер MA0071

<220>
<221> інший_ознака
<222> (1)..(1)
<223> Вироджений код R=A/G

<220>
<221> інший_ознака
<222> (23)..(23)
<223> Вироджений код M=A/C

<220>
<221> інший_ознака
<222> (26)..(26)
<223> Вироджений код Y=C/T

<220>
<221> інший_ознака
<222> (30)..(30)
<223> Вироджений код W=A/T

<220>
<221> інший_ознака
<222> (31)..(31)
<223> Вироджений код Y=C/T

60 <400> 59
rgttgaatat cgatccaact cgmcyggcw yggtcgagct caagctagct ccgctcagct

61 c

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, що включає скринінг на присутність полінуклеотиду, що містить молекулярні маркери MA0045, MA0062, MA0063, MA0070, MA0071 і MA0064, в рослині кукурудзи або частині рослини, при цьому: MA0045 являє собою SNP, який являє собою A у положенні, що відповідає положенню 156,789,751 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

- MA0062 являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,772,431 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 MA0063 являє собою SNP, який являє собою T у положенні, що відповідає положенню 156,543,061 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- 5 MA0070 являє собою SNP, який являє собою T у положенні, що відповідає положенню 156,694,565 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 MA0071 являє собою SNP, який являє собою C у положенні, що відповідає положенню 156,694,641 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4; або
 MA0064 являє собою SNP, який являє собою C у положенні, що відповідає положенню 10 156,541,890 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4, і при цьому рослина кукурудзи або частина рослини має підвищену стійкість до *Helminthosporium turcicum*.
2. Спосіб за п. 1, за яким згаданий скринінг включає скринінг на присутність щонайменше одного з молекулярних маркерів: MA0045, MA0062, MA0063, MA0064, MA0070, MA0071, PZE-108095339 і Affx-91328160.
- 15 3. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, за яким згаданий полінуклеотид фланкований молекулярними маркерами: MA0045 і Affx-91328160, MA0045 і PZE-108095339, MA0045 і MA0064, MA0045 та MA0063, MA0045 та MA0070 або MA0045 та MA0071, і містить їх.
4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, за яким згаданий спосіб включає скринінг на присутність щонайменше одного алеля молекулярного маркера, вибраного з:
- 20 MA0045, який являє собою SNP, який являє собою A у положенні, що відповідає положенню 156,789,751 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 MA0062, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,772,431 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 MA0063, який являє собою SNP, який являє собою T у положенні, що відповідає положенню 25 156,543,061 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 MA0070, який являє собою SNP, який являє собою T у положенні, що відповідає положенню 156,694,565 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 MA0071, який являє собою SNP, який являє собою C у положенні, що відповідає положенню 156,694,641 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- 30 MA0064, який являє собою SNP, який являє собою C у положенні, що відповідає положенню 156,541,890 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4,
 PZE-108095339, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,378,424 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4; або
 Affx-91328160, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає 35 положенню 156,372,823 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4.
5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, за яким згаданий спосіб включає скринінг на присутність щонайменше одного алеля молекулярного маркера, вибраного з:
- PZE-108092843, який являє собою SNP, який являє собою C у положенні, що відповідає положенню 154,456,106 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
- 40 PZE-108094590, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 155,860,812 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 MA0043, який являє собою SNP, який являє собою A у положенні, що відповідає положенню 155,999,733 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 MA0025, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 45 156,967,599 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 PZE-108096469, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 157,266,475 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 PZE-108096610, який являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 157,375,673 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4; або
- 50 PZA-003182005, який являє собою SNP, який являє собою A у положенні, що відповідає положенню 158,167,578 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4.
6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, який являє собою спосіб ідентифікації рослини кукурудзи або частини рослини, що містить алель HT2 і/або алель HT3 або його фрагмент.
7. Рослина кукурудзи або частина рослини, що містить будь-який щонайменше один алель 55 молекулярного маркера MA0045, MA0062, MA0070, MA0071, де
 MA0045 являє собою SNP, який являє собою A у положенні, що відповідає положенню 156,789,751 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;
 MA0062 являє собою SNP, який являє собою G у положенні, що відповідає положенню 156,772,431 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

MA0070 являє собою SNP, який являє собою Т у положенні, що відповідає положенню 156,694,565 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

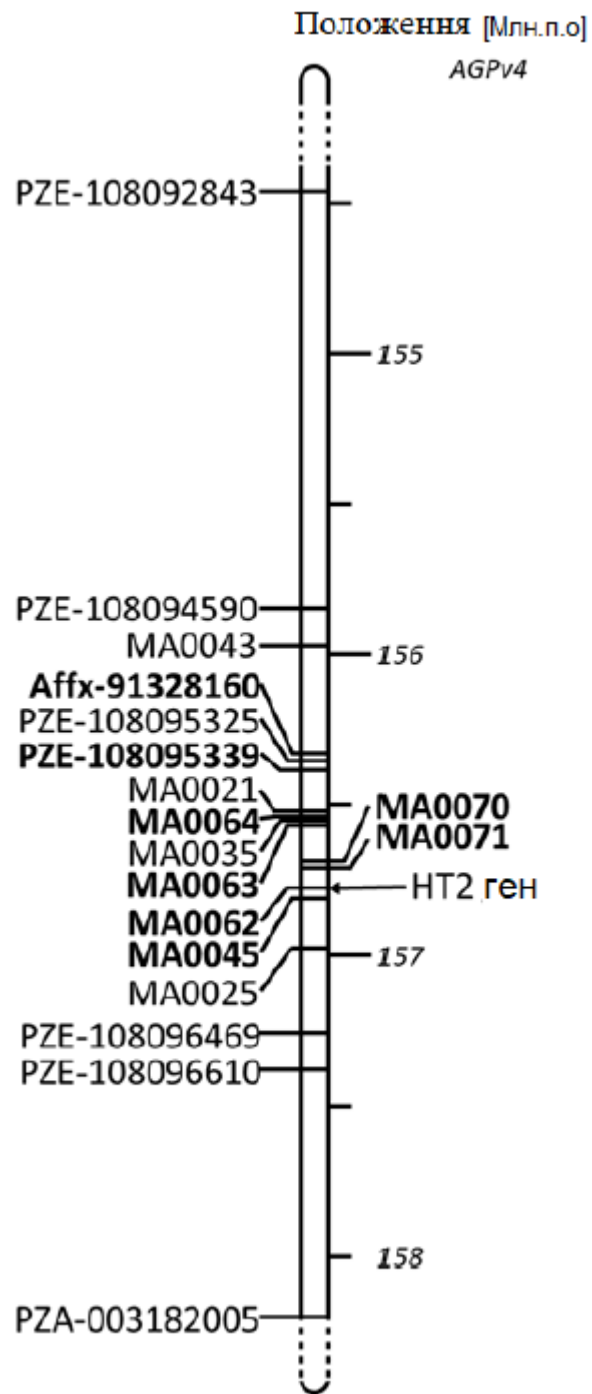
MA0071 являє собою SNP, який являє собою С у положенні, що відповідає положенню 156,694,641 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

5 і при цьому рослина кукурудзи або частина рослини має підвищену стійкість до *Helminthosporium turcicum*.

8. Спосіб генерування рослини кукурудзи або частини рослини кукурудзи, що включає введення в геном рослини кукурудзи або частини рослини поліуклеїнової кислоти, що містить алель *HT2* або *HT3*, який фланкований молекулярними маркерами PZE-108092843 і PZA-003182005, де

10 PZE-108092843 являє собою SNP, який являє собою С у положенні, що відповідає положенню 154,456,106 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4;

PZA-003182005 являє собою SNP, який являє собою А у положенні, що відповідає положенню 158,167,578 п.о. хромосоми 8 B73 еталонного геному AGPv4.



Фіг.