

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991923 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.01.22

(22) Дата подачи заявки
2018.02.28

(51) Int. Cl. C12N 15/82 (2006.01)
A01H 1/08 (2006.01)
C12N 9/18 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)

(54) ГАПЛОИДИЗАЦИЯ У СОРГО

(31) 17158439.4

(32) 2017.02.28

(33) EP

(86) PCT/EP2018/054901

(87) WO 2018/158301 2018.09.07

(71) Заявитель:
KBC ZAAT SE & Co. KGaA (DE)

(72) Изобретатель:
Клойбер-Майтц Моника, Викхорст
Зильке, Болдуан Христоф, Оузунова
Милена (DE)

(74) Представитель:
Зуйков С.А. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены растения сорго, способные индуцировать гаплоидию посредством модификаций в геноме, относящихся к пыльцеспецифичной экспрессированной патагин-фосфолипазе, продуцирующей гаплоидное потомство, и которые могут быть продуцированы для гибридного скрещивания за короткое время посредством удвоения хромосом у инбредных линий, то есть гомозиготных отцовской и материнской линий. Кроме того, предложены способы продуцирования индукторов гаплоидов трансгенных и нетрансгенных растений или повышения эффективности индукции растений.

A1

201991923

201991923

A1

Гаплоидизация у сорго

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области упрощения трудоемких программ по скрещиванию посредством молекулярно-биологических способов, маркерной технологии и генной инженерии. В частности, предложены растения сорго, способные индуцировать гаплоидию посредством модификаций в геноме в отношении, предпочтительно, пыльцеспецифичной экспрессированной пататин-фосфолипазы, посредством которой продуцируется гаплоидное потомство, и способные продуцировать инбредные линии для гибридного скрещивания за короткое время посредством удвоения хромосом. В частности, предложены растения сорго, которые имеют мутации в пататин-фосфолипазе, способы продуцирования и идентификации этих мутаций или мутировавшего растения и соответствующая молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует мутировавшую пататин-фосфолипазу, и векторы, и клетки-хозяева, в частности, клетки растения, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, и растения, сгенерированные из таких растительных клеток, способные продуцировать гаплоидию и свое потомство, кроссбредные продукты, инбредные линии и их соответствующие части растения и продукты.

Основываясь на знаниях о сорго, в настоящем изобретении предложены способы продуцирования и идентификации индукторов гаплоидов трансгенных и нетрансгенных растений и соответствующие растения, которые приобрели свойство индукции гаплоидии, или у которых была повышена эффективность индукции. Кроме того, настоящее изобретение также содержит семена или потомство, органы, части растения, ткани или клетки растения по настоящему изобретению и их использование.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Сорго представляет собой относительно новую сельскохозяйственную культуру в Германии, но благодаря его способности наращивать массу, засухоустойчивости и высокой эффективности использования воды и питательных веществ, оно находится в центре внимания науки и практики, направленных на поиск новых высокоурожайных сельскохозяйственных культур для производства субстрата, в частности, относящегося к производству биогаза, а также для использования в качестве корма, продуктов питания и для производства этанола.

Основными целями скрещивания сорго является адаптация к климату Центральной Европы, то есть, повышение холодоустойчивости, повышение урожайности, стабильности в сочетании с хорошим развитием молодых растений и развитием устойчивости к болезням и вредителям.

Сорго можно улучшить посредством скрещивания, как это возможно у самоопыляющейся сельскохозяйственной культуры. Улучшение популяции может быть достигнуто посредством разработанной селекционной схемы скрещивания посредством целенаправленного отбора лучших

растений для производства семян на следующий урожайный год. Кроме того, гибридное скрещивание создало новые варианты улучшения сортов. Однако процесс гибридного скрещивания основывается на нескольких поколениях непрерывной генерации гомозиготных отцовской и материнской линий, что, в свою очередь, делает процесс гибридного скрещивания затратным по времени и дорогостоящим, несмотря на хорошие результаты.

Следовательно, целью настоящего изобретения было предложение эффективной системы скрещивания сорго.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области упрощения трудоемких программ по скрещиванию, маркерной технологии и генной инженерии. В настоящем изобретении предложены растения сорго, способные индуцировать гаплоидию посредством модификаций в геноме в отношении пыльцеспецифичной экспрессированной пататин-фосфолипазы, посредством которой продуцируется гаплоидное потомство, и которые могут быть получены для гибридного скрещивания за короткое время посредством удвоения хромосом в инбредных линиях, то есть, в гомозиготных отцовской и материнской линиях. Кроме того, полученные результаты могут быть использованы для продуцирования индукторов гаплоидов трансгенных и нетрансгенных растений или для повышения эффективности индукции растений.

Следовательно, настоящее изобретение относится к вариантам осуществления, перечисленным в нижеследующих пунктах [1]-[29], и которые проиллюстрированы на примерах.

- [1] Растение сорго, способное индуцировать гаплоидию, характеризующееся тем, что растение имеет, по меньшей мере, одну модификацию, относящуюся к эндогенной пататин-фосфолипазе, которая является, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, экспрессированной пыльцеспецифичной.
- [2] Растение по пункту [1], характеризующееся тем, что пататин-фосфолипаза кодируется нуклеотидной последовательностью в соответствии с SEQ ID No.: 1 или 2, или нуклеотидной последовательностью, которая на, по меньшей мере, 80% идентична последовательности SEQ ID No.: 1 или 2, или кодируется нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID No.: 1 или 2 в жестких условиях, или которая содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID No.: 3, или гомологичную аминокислотную последовательность.
- [3] Растение по пункту [1] или [2], при этом, модификация пататин-фосфолипазы является причиной того, что оно подходит в качестве индуктора гаплоидов.

- [4] Растение по одному из пунктов [1]-[3], характеризующееся тем, что, по меньшей мере, одна модификация
- a) представляют собой, по меньшей мере, одну мутацию в эндогенном гене, кодирующем пататин-фосфолипазу, определенную в пункте [2], в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, замещение, приводящее к, по меньшей мере, одному обмену аминокислот или к генерации стоп-кодона;
 - b) представляют собой, по меньшей мере, одну вставку кассеты экспрессии, которая содержит промотор, функционально сцепленный с
 - (i) молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей dsРНК, при этом, dsРНК содержит, по меньшей мере, 19 нуклеотидов, которая комплементарна частичной последовательности нуклеотидной последовательности, определенной в пункте [2]; или
 - (ii) молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей пататин-фосфолипазу, определенную в пункте [2], или с функциональной частью пататин-фосфолипазы, при этом, закодированная пататин-фосфолипаза или ее функциональная часть имеет, по меньшей мере, одну мутацию, приводящую к, по меньшей мере, одному обмену аминокислот или к генерации стоп-кодона; или
 - c) вызывает нокаут пататин-фосфолипазы.
- [5] Растение по пункту [4], характеризующееся тем, что, по меньшей мере, одна мутация приводит к обмену аминокислот
- a) в диапазоне положений аминокислоты от 37 до 240 в соответствии с SEQ ID No.: 3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, этот диапазон соответствует функциональному домену пататин-фосфолипазы; и/или
 - b) в диапазоне положений аминокислоты от 241 до 385 в соответствии с SEQ ID No.: 3, или
 - c) к генерации стоп-кодона в диапазоне положений аминокислоты от 241 до 385 в соответствии с SEQ ID No.: 3.
- [6] Растение по пункту [4] или [5], характеризующееся тем, что, по меньшей мере, одна мутация для обмена аминокислот происходит в диапазоне положений аминокислоты 40-93, 135-204 и/или 270-320 в соответствии с SEQ ID No.: 3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в диапазоне положений аминокислоты 53-85, 150-192 и/или 285-311 в соответствии с SEQ ID No.: 3, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в диапазоне положений аминокислоты 55-75, 157-167 и/или 285-298 в соответствии с SEQ ID No.: 3, или генерирование стоп-кодона происходит в диапазоне положений аминокислоты 322-402 в соответствии с SEQ ID No.: 3, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в диапазоне положений аминокислоты

342-392 в соответствии с SEQ ID No.: 3, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в диапазоне положений аминокислоты 362-382 в соответствии с SEQ ID No.: 3.

- [7] Растение по одному из пунктов [4]-[6], характеризующееся тем, что, по меньшей мере, одна мутация приводит к обмену аминокислот в положении аминокислоты 59, 162 и/или 291 в соответствии с SEQ ID No.: 3 и/или к стоп-кодону в положении аминокислоты 372 в соответствии с SEQ ID No.: 3.
- [8] Растение по одному из пунктов [1]-[7], характеризующееся тем, что модифицированная пататин-фосфолипаза
- (i) содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID No.: 3 или гомологичную аминокислотную последовательность, в которой присутствует, по меньшей мере, один обмен аминокислот, при этом, аргинин (R) в положении 59, валин (V) в положении 162 и/или серин (S) в положении 291 в соответствии с SEQ ID No.: 3 заменяется другой аминокислотой, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, глутамином (Q) в положении 59, изолейцином (I) в положении 162 и/или лейцином (L) в положении 291;
 - (ii) кодируется нуклеотидной последовательностью, которая содержит кодирующую последовательность последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID No.: 1 (получаемой из соответствующей сДНК в соответствии с SEQ ID No.: 2) или последовательность ДНК, которая на, по меньшей мере, 80% идентична SEQ ID No.: 1, в которой присутствует, по меньшей мере, один обмен нуклеотидов, приводящий к обмену аминокислот, при этом, по меньшей мере, один нуклеотид обменивается в положениях нуклеотида 421-423, 815-817, 1420-1422 и/или 1663-1665 в соответствии с SEQ ID No.: 1 (что соответствует положениям нуклеотида 175-177, 484-486, 871-873 и/или 1114-1116 в соответствии с SEQ ID No.: 2);
 - (iii) содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID No.: 6, 9 или 12; или
 - (iv) кодируется нуклеотидной последовательностью, которая содержит кодирующую последовательность последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID No.: 4 (получаемой из соответствующей сДНК в соответствии с SEQ ID No.: 5), SEQ ID No.: 7 (получаемой из соответствующей сДНК в соответствии с SEQ ID No.: 8), SEQ ID No.: 10 (получаемой из соответствующей сДНК в соответствии с SEQ ID No.: 11), SEQ ID No.: 13 (получаемой из соответствующей сДНК в соответствии с SEQ ID No.: 14).
- [9] Растение по одному из пунктов [1]-[8], характеризующееся тем, что растение является гомозиготным или гетерозиготным для, по меньшей мере, одной мутации, в

предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, характеризующееся тем, что растение является гомозиготным для, по меньшей мере, одной мутации.

- [10] Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая одну из идентифицированных пататин-фосфолипаз, мутировавшую в пунктах [4]-[8].
- [11] Молекула нуклеиновой кислоты по пункту [10], характеризующееся тем, что ее присутствие в растении, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в отсутствии пататин-фосфолипазы дикого типа, приводит к тому, что растение способно индуцировать гаплоидию.
- [12] Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая в длину, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 21, 22, 23, 24 или 25, в более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 30, 35, 40, 45 или 50 и в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 100, 200, 300, 500 или 1000 нуклеотидов, которая специфически гибридизируется с нуклеотидной последовательностью, определенной в одном из пунктов [5]-[8], и содержит одну из мутаций или пару молекул нуклеиновой кислоты, подходящую для диапазона, содержащего, по меньшей мере, одну из мутаций, для амплификации в полимеразной цепной реакции (PCR), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в форме олигонуклеотида, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, имеющего в длину максимально 50 нуклеотидов, который, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, имеет одну из нуклеотидных последовательностей в соответствии с SEQ ID No.: 28-30, 32-34, 36-38 или 40-42.
- [13] Вектор, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, вектор растения, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [10]-[12] или кассету экспрессии, определенную в пункте [4].
- [14] Клетка-хозяин, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растительная клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [10]-[12], кассету экспрессии, определенную в пункте [4], вектор по пункту [13] или молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [10]-[12] в качестве трансгена, при необходимости, регулируемого гетерологичным промотором, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, пыльцеспецифичным промотором.
- [15] Способ получения растения, способного индуцировать гаплоидию или имеющего повышенную скорость индукции относительно дикого типа, содержащий следующие этапы:
 - (a) (i) мутагенез растительных клеток и затем регенерацию растений из растительных клеток, подвергнутых мутагенезу, или мутагенез растений;

- (ii) идентификацию растения из этапа (i), имеющего, по меньшей мере, одну мутацию в эндогенной последовательности ДНК, которая соответствует, и/или которая приводит к, по меньшей мере, одной из мутаций, идентифицированных в пунктах [4]-[8], где аспарагиновая кислота (D) в положении 75, глицин (G) в положении 79 и/или пролин (P) в положении 203 аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No.: 3, заменяется другой аминокислотой, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, аспарагином (N) в положении 75, аргинином (R) в положении 79 и/или лейцином (L) в положении 203, или соответствующими им аминокислотами, и способного индуцировать получение гаплоидного потомства с повышенной скоростью, по сравнению с растением, не подвергнутым мутагенезу; или
- (b) (i) введение молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, одну мутацию, соответствующую, по меньшей мере, одной из мутаций, идентифицированных в пунктах [4]-[8], и/или приводящую к такой ситуации, когда аспарагиновая кислота (D) в положении 75, глицин (G) в положении 79 и/или пролин (P) в положении 203 аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No.: 3 заменяется другой аминокислотой, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, аспарагином (N) в положении 75, аргинином (R) в положении 79 и/или лейцином (L) в положении 203, или соответствующими им аминокислотами, в растительных клетках, или введение кассеты экспрессии, определенной в пункте [4], в растительные клетки; и
- (ii) регенерацию растения, например, трансгенного растения, из растительных клеток из этапа (i).

[16] Способ по пункту [15], при этом, эндогенная последовательность ДНК или молекула нуклеиновой кислоты представляет собой кодирующую нуклеотидную последовательность, которая содержит аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID No.: 3 для сорго (*Sorghum bicolor*), SEQ ID No.: 18 для подсолнечника (*Helianthus annuus*), SEQ ID No.: 21 для ячменя (*Hordeum vulgare*) или в SEQ ID No.: 24 или 27 для *Beta vulgaris* (например, для сахарной свеклы).

[17] Способ по пункту [16], при этом, введение молекулы нуклеиновой кислоты может осуществляться, например, посредством трансформации *Agrobacterium*, гомологичной рекомбинации, например, посредством систем CRISPR/Cas или CRISPR/Cpf1 и матрицы для репарации, и он содержит мутагенез химических веществ и физический мутагенез, TILLING, целенаправленный мутагенез, например, с использованием цинк-пальцевых

нуклеаз, TALE-нуклеаз (TALE - *эффектор, подобный активаторам транскрипции*), мегануклеаз и систем CRISPR/Cas или CRISPR/Cpf1.

- [18] Растение, содержащее растительную клетку по пункту [14], и/или получаемое способом по одному из пунктов [15]-[17], в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, растение представляет собой сорго, подсолнечник, рожь, пшеницу, картофель, ячмень или сахарную свеклу.
- [19] Орган, часть растения, ткань или клетка растения по одному из пунктов [1]-[9] или [18], или семена, или потомство растения по одному из пунктов [1]-[9] или [18], при этом, семя или потомство имеют мутацию, определенную в пунктах [4]-[8], и/или молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пунктов [10]-[12], кассету экспрессии по пункту [4] или вектор по пункту [13].
- [20] Способ получения гаплоидного растения, содержащий следующие этапы:
- (a) скрещивание растения по одному из пунктов [1]-[9] или [18] с растением того же рода, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, того же вида,
 - (b) отбор опыленного гаплоидного семени или зародыша, и
 - (c) продуцирование гаплоидного растения из семени или зародыша из этапа (b).
- [21] Гаплоидное растение, гаплоидное опыленное семя или зародыш можно получить способом по пункту [20].
- [22] Орган, часть растения, ткань, клетка, семя или потомство растения по пункту [21].
- [23] Способ получения диплоидного растения, содержащий следующие этапы:
- (a) продуцирование гаплоидного растения способом по пункту [20];
 - (b) удвоение гаплоидного набора хромосом, по меньшей мере, в одной клетке гаплоидного растения, и
 - (c) регенерацию диплоидного растения из клетки из этапа (b).
- [24] Диплоидное растение можно получить способом по пункту [23].
- [25] Способ продуцирования гибридных растений, содержащий следующие этапы:
- (a) скрещивание растения по пункту [24] со вторым растением того же рода, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, того же вида,
 - (b) отбор гибридных растений с учетом желаемого признака.
- [26] Гибридное растение, которое можно получить способом по пункту [25].
- [27] Способ идентификации растения по одному из пунктов [1]-[9] или [18] посредством детекции мутации в гене пататин-фосфолипазы, например, мутации, определенной в

пунктах [4]-[9], или маркерного аллеля, который соединен с мутацией, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, с использованием нуклеиновой кислоты по пункту [12] в качестве молекулярного маркера.

- [28] Использование нуклеиновой кислоты по пункту [10] или [11], кассеты экспрессии, определенной в пункте [4], или вектора по пункту [13] в растении для придания свойства индуктора гаплоидов или для повышения скорости индукции для продуцирования растения или трансгенного растения, способного индуцировать гаплоидию.
- [29] Использование растения по одному из пунктов [1]-[9] или [18] для продуцирования гаплоидного опыленного семени или зародыша, или гаплоидного растения.
- [30] Использование нуклеиновой кислоты по пункту [12] в качестве молекулярного маркера для детекции мутации в гене пататин-фосфолипазы.

Во-первых, некоторые термины, используемые в настоящей заявке, более подробно поясняются следующим образом:

Выражение «придать свойство индуктора гаплоидов» или «придание свойства индуктора гаплоидов», или «способный индуцировать гаплоидию» означает экспрессию, сравнимую с экспрессией у растения, которая осуществляется с использованием нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или посредством модификации генома, в частности, посредством мутации пататин-фосфолипазы, изменяемой с тем, чтобы она была способна продуцировать опыленные семена или зародыши, имеющие простой (гаплоидный) набор хромосом, в результате скрещивания с растением того же рода, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, того же вида, которое не обладает свойством индуктора гаплоидов. Свойство индуктора гаплоидов, представленное как абсолютная скорость индукции гаплоидов, означает, что, по меньшей мере, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% или 1%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% или 5%, в более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12% 13%, 14% или 15%, или в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% опыленных семян или зародышей имеют гаплоидный набор хромосом.

Термин «функциональный фрагмент» нуклеотидной последовательности означает участок нуклеотидной последовательности, который обладает функциональными возможностями, идентичными или сопоставимыми с общей нуклеотидной последовательностью, из которой получен функциональный фрагмент. Как таковой, функциональный фрагмент может иметь нуклеотидную последовательность, идентичную или гомологичную общей нуклеотидной последовательности на, по меньшей мере, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%,

94%, 96%, 97%, 98% или 99% по длине. Кроме того, термин «функциональный фрагмент» нуклеотидной последовательности также может означать участок нуклеотидной последовательности, изменяющий функциональные возможности всей нуклеотидной последовательности, например, в ходе посттранскрипционного или транскрипционного сайленсинга генов. Как таковой, функциональный фрагмент нуклеотидной последовательности может содержать, по меньшей мере, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 или 140, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 последовательных нуклеотидов общей нуклеотидной последовательности.

Термин «функциональная часть» белка означает участок белка или участок аминокислотной последовательности, кодирующий белок, при этом, этот участок может реализовывать функциональные возможности, идентичные или сопоставимые с функциональными возможностями общего белка в растительной клетке. Функциональная часть белка имеет длину, которая на, по меньшей мере, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична или сходна с аминокислотной последовательностью, с учетом консервативного и полуконсервативного обменов аминокислот, как у белка, из которого получена эта функциональная часть.

Термин «индуктор гаплоидов» также означает индуктор гаплоидов в условиях *in vivo*.

Термин «гетерологичный» означает, что введенный полинуклеотид, например, происходит из одной клетки или организма, имеющего другой генетический фон одного и того же вида или другого вида, или он гомологичен прокариотической или эукариотической клетке-хозяину, но затем располагается в другой генетической среде и, таким образом, он отличается от любого соответствующего полинуклеотида природного происхождения. Гетерологичный полинуклеотид может присутствовать в дополнение к соответствующему эндогенному гену.

Под термином «гибридизирование» или «гибридизация» понимают процесс, в котором молекула одноцепочечной нуклеиновой кислоты присоединяется к практически комплементарной цепи нуклеиновой кислоты, то есть, вступает с ней в спаривание оснований. Стандартные способы гибридизации описаны, например, в работе Сэмбрук *и др.*, Молекулярное клонирование: Инструкция по проведению лабораторных работ, 3-е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, 2001. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, подразумевается, что, по меньшей мере, 80% или 85%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95%, в особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 96%, 97%, 98% или 99% оснований молекулы нуклеиновой кислоты вступают в спаривание оснований с практически комплементарной цепью нуклеиновой кислоты. Возможность такого присоединения зависит от жесткости условий гибридизации. Термин «жесткость» относится к

условиям гибридизации. Высокая жесткость задается, когда спаривание оснований затруднено, а низкая жесткость задается, когда спаривание оснований облегчено. Жесткость гибридизации зависит, например, от концентрации соли или ионной силы и температуры. Как правило, жесткость может быть повышена путем повышения температуры и/или понижения содержания соли. Под термином «жесткие условия гибридизации» понимают такие условия, при которых гибридизация происходит преимущественно только между гомологичными молекулами нуклеиновой кислоты и гомологами. Термин «условия гибридизации» относится не только к условиям, преобладающим во время фактического присоединения нуклеиновых кислот, но также и к условиям, преобладающим во время последующих этапов отмывания. Жесткие условия гибридизации представляют собой, например, условия, при которых гибридизируются преимущественно только те молекулы нуклеиновой кислоты, которые имеют, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% идентичности последовательностей. Жесткими условиями гибридизации являются, например: гибридизация в 4-кратном растворе хлорида и цитрата натрия (SSC) при 65° С с последующим многократным отмыванием в 0,1-кратном SSC при 65° С в течение, в совокупности, примерно, 1 часа. Используемый в настоящем документе термин «жесткие условия гибридизации» также может означать: гибридизацию при 68° С в 0,25 М фосфате натрия, pH 7,2, 7% додецилсульфате натрия (SDS), 1 mM этилендиаминтетрауксусной кислоте (EDTA) и в 1% бычьим сывороточном альбумине (BSA) в течение 16 часов с последующим двукратным отмыванием в 2-кратном SSC и 0,1% SDS при 68° С. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, гибридизация происходит в жестких условиях.

Выражение «повышение эффективности индукции индуктора гаплоидов» или подобные выражения означают, что скорость индукции гаплоидов у растения, обладающего свойством индуктора гаплоидов, повышена. Таким образом, количество опыленных семян, которые имеют гаплоидный набор хромосом и скрещивание индуктора гаплоидов с растением того же рода, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, того же вида, которое не обладает свойством индуктора гаплоидов, увеличилось на, по меньшей мере, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% или 1%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения на, по меньшей мере, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% или 5%, и в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения на, по меньшей мере, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 30% или 50% выше, чем количество опыленных семян, достигнутое без использования нуклеиновой кислоты или без модификации генома, в частности, без мутации пататин-фосфолипазы в контексте настоящего изобретения, то есть, скорость индукции гаплоидов может быть повышена на, по меньшей мере, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% или 1%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения на, по меньшей мере, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% или 5%, и в самом в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения на, по меньшей мере, 6%,

7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 30% или 50% относительно ранее достигнутой скорости индукции гаплоидов.

Термин «комплементарная» нуклеотидная последовательность относительно нуклеиновой кислоты в форме двухцепочечной ДНК означает, что вторая цепь ДНК, комплементарная первой цепи ДНК, имеет нуклеотиды в соответствии с правилами спаривания оснований, которые соответствуют основаниям первой цепи, соответствующим правилам Уотсона-Крика.

Термин «молекулярный маркер» представляет собой нуклеиновую кислоту, которая является полиморфной в популяции растений и используется в качестве исходной или ориентирующей точки. Маркер для детекции события рекомбинации должен быть способен отслеживать различия или полиморфизмы в пределах популяции растений. Таким образом, такой маркер способен детектировать и различать разнообразные аллельные состояния (аллели). Термин «молекулярный маркер» также относится к нуклеотидным последовательностям, которые комплементарны или, по меньшей мере, практически комплементарны или гомологичны геномным последовательностям, например, нуклеиновым кислотам, которые используются в качестве зондов или праймеров. Для маркеров, эти различия могут быть выявлены на уровне ДНК, и они представляют собой, например, различия в полинуклеотидных последовательностях, такие как, *SSR (простые повторяющиеся последовательности)*, *RFLP (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов)*, *FLP (полиморфизм длин фрагментов)* или *SNP (однонуклеотидный полиморфизм)*. Маркеры могут быть получены из геномных или экспрессируемых нуклеиновых кислот, таких как, сплайсированные РНК, сДНК или EST, а также они могут относиться к нуклеиновым кислотам, которые используются и считаются подходящими в качестве зонда или пар праймеров для амплификации фрагмента последовательности с использованием способов на основе PCR. Маркеры, описывающие генетический полиморфизм (между частями популяции), могут быть детектированы с использованием хорошо известных способов в соответствии с известным уровнем техники (Введение в генетический анализ. 7-е издание, Гриффите, Миллер, Сузуки и др., 2000). Они включают, например, секвенирование ДНК, сиквенс-специфичную амплификацию на основе PCR, детекцию RFLP, детекцию полинуклеотидного полиморфизма посредством аллель-специфичной гибридизации (ASH), детекцию амплифицированных переменных последовательностей генома растения, детекцию 3SR (*самоподдерживающаяся репликация последовательностей*), детекцию SSR, SNP, RFLP или AFLP (*полиморфизм длин амплифицированных фрагментов*). Кроме того, также известны способы детекции EST (*маркерные экспрессируемые последовательности*) и маркеров SSR, полученных из последовательностей EST и RAPD (*случайно амплифицированная полиморфная ДНК*). В зависимости от контекста, термин «маркер» в описании настоящего изобретения может также означать специфичное положение хромосомы в геноме того вида, у которого может быть выявлен специфичный маркер (например, SNP).

Термин «функционально сцепленный» означает соединенный в общую молекулу нуклеиновой кислоты таким образом, что объединенные элементы расположены и ориентированы друг к другу таким образом, что может произойти транскрипция молекулы нуклеиновой кислоты. ДНК, функционально сцепленная с промотором, регулируется этим промотором на уровне транскрипции.

Термин «растение» в контексте настоящего изобретения может, если не указано иное, принадлежать к любому виду двудольных и однодольных растений. Предпочтение отдается растениям, выращиваемым в сельском хозяйстве или садоводстве, или для производства биоэнергии (биоэтанол, биогаз и так далее). К ним относятся, например, *Solanum tuberosum*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum spelta*, *Helianthus annuus*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Brassica juncacea*, *Brassica nigra*, *Glycine max*, *Gossypium sp.*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum sudanense*, *Sorghum bicolor* × *Sorghum sudanense*, *triticale*, *Saccharum officinarum*, *Setaria italica*, *Oryza sativa*, *Oryza minuta*, *Oryza australiensis*, *Oryza alta*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum marinum*, *Aegilops tauschii*, *Daucus glochidiatus*, *Daucus pusillus*, *Daucus muricatus*, *Daucus carota*, *Eucalyptus grandis*, *Erythranthe guttata*, *Genlisea aurea*, *Musa sp.*, *Avena sp.*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Solanum lycopersicum*, *Coffea canephora*, *Vitis vinifera*, *Cucumis sativus*, *Morus notabilis*, *Crucihimalaya himalaica*, *Crucihimalaya wallichii*, *Cardamine flexuosa*, *Lepidium virginicum*, *Capsella bursa-pastoris*, *Olmarabidopsis pumila*, *Arabis hirsuta*, *Raphanus sativus*, *Eruca vesicaria sativa*, *Citrus sinensis*, *Jatropha curcas*, *Populus trichocarpa* или *Beta vulgaris*.

Растение сорго по настоящему изобретению представляет собой растение рода *Sorghum*, в частности, вида *Sorghum bicolor*, *Sorghum sudanense*, *Sorghum bicolor* × *Sorghum sudanense*, *Sorghum* × *almum* (*Sorghum bicolor* × *Sorghum halepense*), *Sorghum arundinaceum*, *Sorghum* × *drummondii*, *Sorghum halepense* и/или *Sorghum propinquum*, или их гибриды и все полученные из них сорта.

Термин «органы» растения означают, например, листья, каулом, стебель, корни, вегетативные почки, меристемы, зародыши, пыльники, семяпочки, семена или плоды, в частности, зерна. Термин «часть растения» или «части растения» включает, но этим не ограничивается, ось побега или стебель, листья, цветки, соцветия, корни, плоды и семена, и пыльцу. Термин «части» растения также означают комбинацию из нескольких органов, например, цветка или семени, или часть органа, например, поперечное сечение от оси побега. Термин «ткани» растения представляют собой, например, каллусную ткань, запасную ткань, меристематические ткани, ткань листа, ткань побега, ткань корня, опухолевую ткань растения или репродуктивную ткань, и развившуюся ткань, основную ткань (так называемую, паренхиму), ксилему, опорно-трофическую ткань и покровную ткань (так называемый, эпидермис). Однако ткань не ограничивается этим списком. Под термином «клетки» растения понимают, например, изолированные клетки, имеющие клеточную стенку или ее агрегаты, или протопласты.

Термин «промотор» означает нетранслируемый сегмент ДНК, обычно расположенный выше кодирующей области, который включает сайт связывания полимеразы РНК и инициирует транскрипцию ДНК. Промотор также содержит другие элементы, которые действуют в качестве регуляторного гена экспрессии генов (например, цис-регуляторные элементы). Термин «основной или минимальный промотор» означает промотор, который имеет, по меньшей мере, основные элементы, необходимые для инициации транскрипции (например, ТАТА-бокс и/или инициатор).

В контексте настоящего изобретения, термин «модификации» относится к нуклеотидной последовательности, которая влияет на специфичность и/или уровень экспрессии, например, к такой, в которой регуляторная последовательность опосредует тканеспецифичную специфичность. Такая регуляторная последовательность может быть расположена выше, а также ниже точки инициации транскрипции минимального промотора, например, в транскрибируемой, но нетранслируемой лидерной последовательности или в интроне.

Термин «трансгенное растение» относится к растению, в геном которого интегрирован, по меньшей мере, один полинуклеотид, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, гетерологичный полинуклеотид. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, полинуклеотид является стабильно интегрированным, а это означает, что интегрированный полинуклеотид стабильно поддерживается в растении, экспрессируется и может стабильно наследоваться потомством. Стабильное введение полинуклеотида в геном растения также включает интеграцию в геном растения предыдущего родительского поколения, при этом, полинуклеотид может стабильно наследоваться в дальнейшем. Термин «гетерологичный» означает, что введенный полинуклеотид, например, происходит из одной клетки или организма, имеющего другой генетический фон одного и того же вида или другого вида, или он гомологичен прокариотической или эукариотической клетке-хозяину, но затем располагается в другой генетической среде и, таким образом, он отличается от любого соответствующего полинуклеотида природного происхождения. Гетерологичный полинуклеотид может присутствовать в дополнение к соответствующему эндогенному гену.

Выражение «подходит для использования в качестве гаплоидного индуктора» или «способен индуцировать гаплоидию» означает, что растение способно продуцировать опыленные семена, имеющие простой (гаплоидный) набор хромосом, в результате скрещивания с растением того же рода, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, того же вида, которое не обладает свойством индуктора гаплоидов. Использование индуктора гаплоидов, представленного как абсолютная скорость индукции гаплоидов, означает, что, по меньшей мере, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% или 1%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% или 5%, в более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12% 13%, 14% или 15%, или в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 20%, 25%,

30%, 35%, 40%, 45% или 50% опыленных семян или зародышей имеют гаплоидный набор хромосом.

Схемы и варианты осуществления настоящего изобретения описаны в качестве примера со ссылкой на прилагаемые фигуры и последовательности:

Фигура 1: Выравнивание последовательностей (CLUSTAL O 1.2.4) аминокислотных последовательностей пататин-фосфолипазы дикого типа из сорго (Sorghum_PPL_AA, SEQ ID No.: 3), пататин-фосфолипазы из сорго с обменом аминокислоты аргинин (R) на глутамин (Q) в положении аминокислоты 59 (Sorghum_PPL_R59Q, SEQ ID No.: 6), пататин-фосфолипазы из сорго с обменом аминокислоты валин (V) на изолейцин (I) в положении аминокислоты 162 (Sorghum_PPL_V162I, SEQ ID No.: 9), пататин-фосфолипазы из сорго с обменом аминокислоты серин (S) на лейцин (L) в положении аминокислоты 291 (Sorghum_PPL_S291L, SEQ ID No.: 12) и пататин-фосфолипазы из сорго с обменом аминокислоты глутамин (Q) на стоп-кодон в положении аминокислоты 372 (Sorghum_PPL_Q372Stop, SEQ ID No.: 15). Положения аминокислот 59, 162 и 291 выделены черным цветом.

Фигура 2: Выравнивание последовательностей (CLUSTAL O 1.2.4) аминокислотных последовательностей пататин-фосфолипазы дикого типа из сорго (Sorghum bicolor_PPL_AA, SEQ ID No.: 3), пататин-фосфолипазы из ячменя (Hordeum vulgare_PPL_AA, SEQ ID No.: 21), пататин-фосфолипазы из подсолнечника (Helianthus annuus_PPL_AA, SEQ ID No.: 18), пататин-фосфолипазы 1 из сахарной свеклы (Beta vulgaris_PPL1_AA, SEQ ID No.: 24) и пататин-фосфолипазы 2 из сахарной свеклы (фосфолипаза Beta vulgaris 2_AA, SEQ ID No.: 27). Положения аминокислот, которые представляют собой функциональный домен фосфолипазы, выделены жирным шрифтом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предлагает растение рода *Sorghum*, в дальнейшем также именуемое растением сорго, которое способно индуцировать гаплоидию. Благодаря этому свойству индукции гаплоидов, растение способно продуцировать опыленные семена или зародыши, имеющие простой (гаплоидный) набор хромосом, в результате скрещивания с растением того же рода, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, того же вида, которое не обладает свойством индуктора гаплоидов. Благодаря этой системе, изобретатели смогли предложить эффективную систему скрещивания растений сорго, поскольку линии инокуляции, то

есть, гомозиготные отцовская и материнская линии для гибридного скрещивания, могут быть сгенерированы посредством удвоения хромосом у гаплоидного потомства.

Растения сорго по настоящему изобретению характеризуются тем, что они имеют, по меньшей мере, одну модификацию, которая относится к пататин-фосфолипазе, которая либо придает свойство индукции гаплоидов, либо также улучшает естественно присутствующую способность к индукции гаплоидов, или повышает эффективность индукции. Таким образом, модификация в отношении пататин-фосфолипазы является причиной того, что растение сорго по настоящему изобретению подходит для применения в качестве индуктора гаплоидов в программах по скрещиванию.

Растения по настоящему изобретению характеризуются тем, что они имеют скорость индукции составляет, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 0,5% и они, тем самым, отличаются от растений дикого типа или индукторов, не являющихся индукторами гаплоидов.

В экспериментах, проведенных в контексте настоящего изобретения, было выявлено, что пататин-фосфолипаза в сорго является пыльцеспецифично экспрессированной и поэтому, предположительно, оказывает влияние на рост пыльцевой трубки или взаимодействие между гаметофитами. Таким образом, растение сорго по настоящему изобретению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, характеризуется тем, что пататин-фосфолипаза является пыльцеспецифично экспрессированной и/или оказывает влияние на рост пыльцевой трубки или взаимодействие между гаметофитами.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, пататин-фосфолипаза кодируется нуклеотидной последовательностью в соответствии с SEQ ID No.: 1 или 2, или нуклеотидной последовательностью, которая на, по меньшей мере, 80%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, на 85%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, на 90%, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, на 95% и в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, на 99% идентична SEQ ID No.: 1 или 2, или кодируется нуклеотидной последовательностью, которая имеет последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID No.: 1 или 2 в жестких условиях, или содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID No.: 3, или гомологичную аминокислотную последовательность. Как уже упоминалось выше, растение сорго по настоящему изобретению содержит растения любых видов рода *Sorghum*, в частности, вида *Sorghum bicolor*, *Sorghum sudanense* и *Sorghum bicolor* x *Sorghum sudanense* или их гибриды и все полученные из них сорта. Соответственно, разумно предположить, что в процессе видообразования и скрещивания сортов нуклеотидная последовательность и, соответственно, аминокислотная последовательность пататин-фосфолипазы изменились. В этом контексте, термин «гомологичный» означает, что рассматриваемые гены (из двух различных видов или сортов

растений) имеют, по существу, одну и ту же функцию и общего предшественника, и поэтому обычно проявляют существенную идентичность в своей нуклеиновой кислоте или в закодированной аминокислотной последовательности, соответственно, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения на, по меньшей мере, 80%.

В контексте настоящего изобретения, под термином «гомолог» понимают белок, имеющий одинаковое филогенетическое происхождение, под термином «аналог» понимают белок, который выполняет такую же функцию, но он имеет иное филогенетическое происхождение, а под термином «ортолог» понимают белок из растения другого вида, который выполняет такую же функцию, и под термином «паралог» понимают белок, который был создан посредством дупликации в пределах вида, при этом, эта копия либо сохраняет такую же функцию белка, у нее изменяется профиль экспрессии гена, но не функция, у нее изменяется функция белка, либо функция предкового гена разделена между обеими копиями.

Закодированный белок (или аминокислотная последовательность), по существу, является гомологом в контексте настоящего изобретения, когда он выполняет одну и ту же функцию, независимо от того, имеет ли он одинаковое или разное филогенетическое происхождение, или происходит от одного и того же, или другого вида. Гомолог, кроме того, способен комплементировать свойство индукции гаплоидов, то есть, посредством модификации кодируемого гомологом генного продукта растения, из которого происходит ген, придавать свойство индуктора гаплоидов или повышать эффективность индукции индуктора гаплоидов. Соответственно, гомолог, соответствующий пататин-фосфолипазе, закодированный нуклеотидной последовательностью в соответствии с SEQ ID No.: 1 или 2, или содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID No.: 3, может, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, быть охарактеризован как обладающий способностью комплементировать свойство индуктора гаплоидов, которое наблюдается у растения сорго по настоящему изобретению. Дополнительно или в качестве альтернативы, гомолог пататин-фосфолипазы может быть, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, охарактеризован опосредованием свойства индуктора гаплоидов или повышением эффективности индукции индуктора гаплоидов посредством модификации генного продукта, закодированного гомологом.

Специалистам в данной области техники известны соответствующие методы и способы комплементарности в генетике у сорго, например, из публикации Ли и др., J. Genet. 94 (2015), 445-452, при которых фенотип сорго, который характеризуется коричневой *средней жилкой*, и который вызван точечной мутацией в гене *bmr-6*, был комплементирован введением гена дикого типа *bmr-6*.

Как показано на Примере 2, аминокислотная последовательность в аминокислотной последовательности пататин-фосфолипазы из сорго (SEQ ID No.: 3) приводит к тому, что скорость индукции гаплоидов у сорго частично превышает 1,5%. Можно предположить, что дальнейшее

повышение скорости индукции может быть результатом дополнительных обменов аминокислот, что приводит к дальнейшей модификации кодирующей последовательности пататин-фосфолипазы. Таким образом, растения сорго, содержащие, по меньшей мере, одну модификацию или мутацию, относящуюся к пататин-фосфолипазе, включены в настоящее изобретение.

В контексте настоящего изобретения, вышеупомянутые модификации, которые относятся к пататин-фосфолипазе, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, характеризуются тем, что они являются мутациями, которые приводят к, по меньшей мере, одному обмену аминокислот или к продуцированию стоп-кодона в эндогенной последовательности ДНК, кодирующей пататин-фосфолипазу.

Мутация означает модификацию на уровне ДНК, то есть, изменение в генетике и/или эпигенетике. Например, изменение в генетике может заключаться в обмене, по меньшей мере, одного нуклеотидного основания в эндогенной последовательности ДНК или в регуляторной последовательности эндогенной последовательности ДНК. Если такой обмен нуклеотидного основания происходит, например, в промоторе, то это может привести к изменению активности промотора, поскольку, например, *цис*-регуляторные элементы модифицируются таким образом, что аффинность фактора транскрипции для мутировавшего *цис*-регуляторного элемента, по сравнению с промотором дикого типа, изменяется таким образом, что активность промотора с мутировавшим *цис*-регуляторным элементом повышается или понижается, в зависимости от того, является ли фактор транскрипции репрессором или индуктором, или от того, усиливается или ослабляется аффинность фактора транскрипции для мутировавшего *цис*-регуляторного элемента. Если такой обмен нуклеотидного основания происходит, например, в кодирующей области эндогенной последовательности ДНК, то это может привести к обмену аминокислот в закодированном белке, что может вызвать изменение активности или стабильности белка, по сравнению с белком дикого типа. Еще одним примером изменения в генетике является делеция нуклеотидов в регуляторной последовательности и/или эндогенной последовательности ДНК и добавление нуклеотидов в регуляторной последовательности и/или эндогенной последовательности ДНК. Изменение эпигенетики может происходить, например, в результате изменения профиля метилирования ДНК.

Способы мутагенизации последовательностей ДНК описаны более подробно в контексте способа получения индуктора гаплоидов растения.

Поскольку описанные мутации приводят к изменению или укорочению аминокислотной последовательности пататин-фосфолипазы, то можно предположить, что мутации изменяют активность или стабильность пататин-фосфолипазы, закодированной эндогенной последовательностью ДНК в растении сорго, по сравнению с растением дикого типа, то есть, повышают или понижают.

Генерация стоп-кодонов в функциональных доменах белка обычно приводит к потере функции белка, тогда как генерация стоп-кодона после функционального домена также могла бы привести к повышению активности или стабилизации белка. В случае мутаций, которые, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, являются обменами аминокислот, может происходить повышение активности белка, например, посредством оптимизации последовательности или, в равной степени, посредством ингибирования или потери активности. Мутации в промоторной области также могут приводить к изменению экспрессии гена.

Следовательно, в соответствии с настоящим изобретением, описанная мутация изменяет биологическую активность пататин-фосфолипазы, в результате чего ее первоначальная функция в пыльце больше не выполняется в той же степени, как в случае с сорго дикого типа.

Этого можно достичь, с одной стороны, посредством сверхэкспрессии гена, ассоциированной с повышенным количеством белка и активностью, например, посредством мутаций в промоторной области, посредством повышения стабильности белка, например, посредством укорочения белка посредством генерации стоп-кодона или посредством образования более активной формы пататин-фосфолипазы, например, посредством обменов аминокислот в функциональном домене, например, которые могли бы привести к более быстрому росту пыльцевой трубки, разьединению транспорта генеративных клеток в пыльцевой трубке по мере ее роста или к нарушенному взаимодействию гаметофитов с последующим неполным опылением с последующим удалением хромосом. С другой стороны, сверхэкспрессия гена также могла бы ингибировать, предотвращать или уменьшать правильное образование, свертывание и/или стабильность пататин-фосфолипазы. Однако также могло бы происходить пониженное образование функциональной пататин-фосфолипазы или образование функциональной пататин-фосфолипазы могло бы отсутствовать, например, посредством мутаций в промоторной области, для образования менее активной, неактивной или нестабильной формы пататин-фосфолипазы, например, посредством генерации стоп-кодона или посредством обменов аминокислот в функциональном домене, что, в свою очередь, могло бы привести к неправильному опылению. Кроме того, локализация пататин-фосфолипазы могла бы быть изменена посредством описанных мутаций с тем, чтобы, например, она больше не была пыльцеспецифично экспрессированной.

В результате, настоящее изобретение также содержит растения сорго, имеющие, по меньшей мере, одну вставку кассеты экспрессии, которая представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую пататин-фосфолипазу, которая, посредством последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID No.: 1 или 2, или посредством нуклеотидной последовательности, которая на, по меньшей мере, 80%, в предпочтительном варианте

осуществления настоящего изобретения, на 85%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, на 90%, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, на 95% и в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, на 99% идентична SEQ ID No.: 1 или 2, или кодирующую функциональную часть этой пататин-фосфолипазы, или содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID No: 1 или 2 в жестких условиях, или которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую пататин-фосфолипазу, имеющую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID No: 3 или гомологичную аминокислотную последовательность или ее функциональную часть, и функционально сцепленную с промотором, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, с пыльцеспецифичным промотором, при этом, закодированная пататин-фосфолипаза или ее функциональная часть имеет, по меньшей мере, одну мутацию, приводящую к, по меньшей мере, одному обмену аминокислот или к генерации стоп-кодона и, таким образом, предложена пататин-фосфолипаза, кодирующая сверхэкспрессию гена, кодирующего растение или его часть, в сравнении с растением дикого типа или его соответствующей частью.

Кроме того, в настоящее изобретение также включены растения сорго, в которых экспрессия пататин-фосфолипазы частично или полностью ингибируется, или присутствует уменьшенное количество белка пататин-фосфолипазы, или функциональная пататин-фосфолипаза не образована. Таким образом, настоящее изобретение также содержит растения сорго, в которых экспрессия указанной пататин-фосфолипазы частично или полностью ингибируется посредством метода РНК-интерференции (Файер *и др.*, Nature 391 (1998), 806-811). Соответственно, растение по настоящему изобретению также характеризуется тем, что оно имеет, по меньшей мере, одну вставку кассеты экспрессии, содержащей промотор и, при необходимости, терминатор, который функционально сцеплен с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей dsРНК, которая содержит, по меньшей мере, 19 или 20, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 21, 22, 23, 24 или 25, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 30, 35, 40, 45 или 50 и в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 100, 200, 300 или 500 нуклеотидов, комплементарных частичной последовательности нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID No.: 1 или 2, или частичной последовательности нуклеотидной последовательности, которая на, по меньшей мере, 80%, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, на 85%, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, на 90%, в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, на 95% и в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, на 99% идентична частичной последовательности нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID No.: 1 или 2.

Кроме того, настоящее изобретение также содержит растения сорго, в которых происходит нокаут пататин-фосфолипазы посредством мутации.

Подходящие промоторы, используемые в кассетах экспрессии, могут представлять собой промоторы, которые индуцируются конститутивно (например: промотор 35S из работы «Вирус мозаики цветной капусты» (Оделл и др., Nature 313 (1985), 810-812), подходящими промоторами являются промоторы, у которых наблюдается специфичные для развития растения (например: промоторы, специфичные для цветка), или тканеспецифичные промоторы, в частности промоторы, у которых наблюдается активность, специфичная для пыльцы (примеры: Чен и др., Molecular Biology Reports 37 (2010), 737-744, Чжао и др., Planta 224 (2006), 405-412 или Твелл и др. Genes & Development 5(1991), 496-507). Подходящие промоторы также могут быть синтетическими или химерными промоторами, которые не встречаются в природе, которые состоят из нескольких элементов и содержат минимальный промотор, и выше минимального промотора у них имеется, по меньшей мере, один *cis*-регуляторный элемент, который служит сайтом связывания для специфичных факторов транскрипции. Химерные промоторы могут быть сконструированы в соответствии с желаемой специфичностью и индуцированы или репрессированы различными факторами. Примеры таких промоторов можно найти в работе Гурра и Раштона (TRENDS in Biotechnology 23 (2005), 275-282) или в работе Вентера (Trends in Plant Science 12 (2007), 118-1249). Подходящим терминатором является, например, терминатор *нопаин-синтазы* (Депикер и др., Journal of Molecular and Applied Genetics 126 (1982), 561-573). Промоторы и другие регуляторные элементы транскрипции хорошо известны и доступны специалистам в данной области техники; см., например, WO 00/75359 на стр. 23, строка 5 – стр. 24, строка 17.

Как показано в Примере 2, обмен аминокислоты аргинин на глутамин в положении аминокислоты 59 в соответствии с аминокислотной последовательностью пататин-фосфолипазы, показанной в SEQ ID No.: 6, или обмен аминокислоты валин на изолейцин в положении аминокислоты 162 в соответствии с аминокислотной последовательностью пататин-фосфолипазы, показанной в SEQ ID No.: 9, приводит к тому, что скорость индукции гаплоидов у сорго превышает 0,5%. Из Фигуры 2 видно, что эти положения аминокислоты лежат в функциональном домене пататин-фосфолипазы, что соответствует диапазону положений аминокислоты от 37 до 240.

Таким образом, настоящее изобретение предлагает растения сорго, имеющие, по меньшей мере, одну мутацию, приводящую к обмену аминокислот в диапазоне положений аминокислоты от 37 до 240 в соответствии с SEQ ID No.: 3, соответствующем, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, функциональному домену пататин-фосфолипазы. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, одна мутация в диапазоне положений аминокислоты 40-93 или 135- 204, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в диапазоне положений аминокислоты 53-85 или 150-192,

в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в диапазоне положений аминокислоты 55-75 или 157-167 приводит к обмену аминокислот.

Кроме того, обмен аминокислоты серин на лейцин в положении аминокислоты 291 в соответствии с аминокислотной последовательностью пататин-фосфолипазы, показанной в SEQ ID No.: 12, у растений сорго приводит к тому, что скорость индукции гаплоидов превышает 1,5%. Кроме того, индуктор гаплоидов сорго мог бы быть сгенерирован мутацией в нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID No.: 1, которая приводит к стоп-кодону в положении аминокислоты 372 в соответствии с SEQ ID No.: 3. Эта мутация заменила аминокислоту глутамин (Q) в положении 372 стоп-кодоном.

Из Фигуры 2 видно, что эти положения лежат за пределами функционального домена пататин-фосфолипазы.

Таким образом, настоящее изобретение также предлагает растения сорго, имеющие, по меньшей мере, одну мутацию, приводящую к обмену аминокислот в диапазоне положений аминокислоты от 241 до 385 в соответствии с SEQ ID No.: 3, соответствующем, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, области, находящейся за пределами функционального домена пататин-фосфолипазы, при этом, мутация также может приводить к стоп-кодону и, следовательно, к укорочению пататин-фосфолипазы. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, одна мутация в диапазоне положений аминокислоты от 270 до 320, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в диапазоне положений аминокислоты от 285 до 311, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в диапазоне положений аминокислоты от 285 до 298, приводит к обмену аминокислот и/или к стоп-кодону в диапазоне положений аминокислоты 322-402, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в диапазоне положений аминокислоты 342-392, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в диапазоне положений аминокислоты 362-382.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растение по настоящему изобретению характеризуется тем, что, по меньшей мере, одна мутация приводит к обмену аминокислот в положении аминокислоты 59, 162 и/или 291, и/или к стоп-кодону в положении аминокислоты 372 в соответствии с SEQ ID: 3.

В связи с этим, в одном варианте осуществления настоящего изобретения, модифицированная пататин-фосфолипаза содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID No.: 3, в которой присутствует, по меньшей мере, один обмен аминокислот, при этом, аргинин (R) в положении 59, валин (V) в положении 162 и/или серин (S) в положении 291 заменяется другой аминокислотой, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, глутамином (Q) в положении 59, изолейцином (I) в положении 162 и/или лейцином (L) в положении 291 или кодируется нуклеотидной последовательностью в соответствии с SEQ ID No.:

1, в которой присутствует, по меньшей мере, один обмен нуклеотидов, приводящий к обмену аминокислот и/или к стоп-кодону, при этом, по меньшей мере, один нуклеотид обменивается в положениях 421-423, 815-817, 1420-1422 и/или 1663-1665 в соответствии с SEQ ID No.: 1 (что соответствует положениям нуклеотида 175-177, 484-486, 871-873 и/или 1114-1116 в соответствии с SEQ ID No.: 2).

Растения, как и эукариоты, имеют, по меньшей мере, по две копии своей генетической информации на каждую клетку. Каждый ген обычно представлен двумя аллелями, которые могут быть идентичными в гомозиготном состоянии или разными в гетерозиготном состоянии. Фенотип растения по настоящему изобретению вызван, по меньшей мере, одной мутацией в пататин-фосфолипазе, при этом, растение по настоящему изобретению является гомозиготным или гетерозиготным, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, гомозиготным для мутировавшей пататин-фосфолипазы.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, заявлена молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит ранее определенные специфичные мутации, приводящие к обмену аминокислот R59Q, V162I, S291L и/или Q372stop на основе аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No.: 3. В этом случае, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению характеризуется тем, что ее присутствие в растении приводит к тому, что растение способно индуцировать гаплоидию, или к тому, что эффективность индукции растения, уже способного индуцировать гаплоид, улучшается. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, присутствие молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в отсутствие пататин-фосфолипазы дикого типа в растении приводит к тому, что растение способно индуцировать гаплоидию или улучшать эффективность индукции растения, уже способного индуцировать гаплоид.

Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может быть использована в качестве трансгена для придания свойства индуктора гаплоидов растению или для повышения эффективности индукции индуктора гаплоидов. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляет собой изолированную молекулу нуклеиновой кислоты, которую выделили ее естественной или исходной среды, то есть, вне генетического контекста. Молекула нуклеиновой кислоты может быть двухцепочечной или одноцепочечной, линейной или кольцевой. Это может быть геномная ДНК, синтетическая ДНК, сДНК или тип РНК, например, siРНК или miРНК, при этом, нуклеотидное основание урацил входит в состав РНК вместо нуклеотидного основания тимин.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, нуклеиновая кислота по настоящему изобретению или РНК, закодированная нуклеиновой кислотой, или белок, или полипептид, закодированный нуклеиновой кислотой, воздействует на рост пыльцевой трубки в растении, на взаимодействие между гаметофитами или на опыление, как таковое.

Гибридизационные ДНК-зонды, полученные из модифицированной последовательности пататин-фосфолипазы, то есть, содержащие любую из вышеописанных мутаций, можно использовать для идентификации растений по настоящему изобретению, то есть, для детекции мутаций в гене пататин-фосфолипазы. Для достижения специфичной гибридизации, такие зонды должны быть специфичными и иметь в длину, по меньшей мере, 15 нуклеотидов, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 20 нуклеотидов. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в работе Тиесена, Лабораторные методы в биохимии и молекулярной биологии – Гибридизация с зондами нуклеиновых кислот, Часть 1, Глава 2, Обзор принципов гибридизации и стратегия анализов нуклеиновых кислот, Elsevier, Нью-Йорк (1993); и в работе, Текущие протоколы в молекулярной биологии, Глава 2, Осубель и др., под ред., Greene Publishing и Wiley Interscience, Нью-Йорк (1995). Зонды также могут быть использованы для амплификации целого ряда модифицированной последовательности пататин-фосфолипазы, которая получает, по меньшей мере, одну из ранее описанных мутаций посредством известного процесса полимеразной цепной реакции (PCR).

Таким образом, молекула нуклеиновой кислоты, содержащая в длину, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 21, 22, 23, 24 или 25, в более в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 30, 35, 40, 45 или 50 и в самом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 100, 200, 300, 500 или 1000 нуклеотидов, является объектом настоящего изобретения, при этом, упомянутая молекула нуклеиновой кислоты специфично гибридизируется с ранее описанной нуклеотидной последовательностью, содержащей ген модифицированной пататин-фосфолипазы, и содержит одну из мутаций или пару подходящих молекул нуклеиновой кислоты в области, содержащей, по меньшей мере, одну из мутаций, для амплификации в полимеразной цепной реакции (PCR), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в форме олигонуклеотида, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, с максимальной длиной – 50 нуклеотидов. Предпочтительный вариант осуществления молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению описан в пункте [12].

Еще одним объектом настоящего изобретения являются векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или вышеупомянутую кассету экспрессии. Вектор по настоящему изобретению может содержать ген мутантной пататин-фосфолипазы, имеющий вышеупомянутые характеристики нуклеотидной последовательности, функционально сцепленный с гетерологичным промотором, или он может содержать ген мутантной пататин-фосфолипазы вместе со своим естественным промотором.

Другой вектор может содержать ген дикого типа пататин-фосфолипазы, функционально сцепленный с гетерологичным промотором. Кроме того, вектор может содержать молекулу рекомбинантной ДНК, которая имеет нуклеотидную последовательность, которая кодирует

двухцепочечную РНК и, следовательно, приводит к экспрессии гена пататин-фосфолипазы после экспрессии в растительной клетке.

Кроме того, вектор может содержать ранее описанную молекулу нуклеиновой кислоты, которая специфично связывается с мутировавшей нуклеотидной последовательностью пататин-фосфолипазы.

Описанный вектор может представлять собой плазмиду, космиду, бактериофаг или экспрессионный вектор, вектор для трансформации, бифункциональный вектор или клонирующий вектор, он может быть двухцепочечным или одноцепочечным, линейным или кольцевым, или он может трансформировать прокариотического или эукариотического хозяина либо посредством интеграции в его геном, либо экстрахромосомно. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению функционально сцеплена в экспрессионном векторе, имеющем, по меньшей мере, одну регуляторную последовательность, которая позволяет осуществлять транскрипцию и, при необходимости, экспрессию в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине; см., например, Сэмбрук *и др.*, Молекулярное клонирование: Инструкция по проведению лабораторных работ, 3-е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, 2001 и международная заявка WO 00/75359 на стр. 21, строка 20 - стр. 22, строка 32. Регуляторная последовательность, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – ДНК, может быть гомологичной или гетерологичной по отношению к нуклеиновой кислоте по настоящему изобретению. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, эти регуляторные последовательности представляют собой промоторы или терминаторы, в частности, начальную точку инициации транскрипции, сайт связывания рибосом, сигнал процессинга РНК, сайт терминации транскрипции и/или сигнал полиаденилирования. Кроме того, векторы обычно содержат гены-индикаторы/гены- репортеры или гены устойчивости для детекции переноса желаемого вектора или молекулы ДНК/молекулы нуклеиновой кислоты и для отбора индивидуумов, содержащих их, поскольку непосредственная детекция экспрессии гена довольно затруднительна. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, вектор представляет собой вектор растения.

В дополнение к вышеописанным векторам, настоящее изобретение также предлагает способ, содержащий введение описанного вектора в клетку-хозяина. Вектор может быть введен, например, посредством конъюгации, мобилизации, биолистической трансформации, трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, трансфекции, трансдукции, вакуумной инфльтрации или электропорации. Такие способы и способы получения описанных векторов известны специалисту в данной области техники (Сэмбрук *и др.*, 2001).

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим описанные векторы, молекулы нуклеиновой кислоты или кассеты экспрессии. Клетка-хозяин в контексте настоящего изобретения может представлять собой прокариотическую (например, бактериальную)

или эукариотическую клетку (например, растительную клетку или дрожжевую клетку). В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, клетка-хозяин представляет собой *Agrobacterium*, например, *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes*, или растительную клетку, содержащую нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, описанные вектор или кассету экспрессии. Специалисту в данной области техники известны многочисленные способы, такие как, конъюгация или электропорация, посредством которых он может вводить нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению или кассету экспрессии в *Agrobacterium*, и способы, такие как различные способы трансформации (биолистическая трансформация, трансформация, опосредованная *Agrobacterium*), посредством которых он может вводить нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, вектор или кассету экспрессии по настоящему изобретению в растительную клетку (Сэмбрук и др., 2001).

В более предпочтительном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к трансгенной растительной клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в качестве трансгена, вектору по настоящему изобретению или кассете экспрессии, и к трансгенному растению или его части, которая содержит клетку трансгенного растения. Такая трансгенная растительная клетка или растение представляет собой, например, растительную клетку или растение, которое, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, стабильно трансформировано молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектором по настоящему изобретению или кассетой экспрессии. Трансгенное растение по настоящему изобретению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, подходит для использования в качестве индуктора гаплоидов. В предпочтительном варианте осуществления трансгенной растительной клетки по настоящему изобретению, молекула нуклеиновой кислоты функционально сцеплена, по меньшей мере, с одной регуляторной последовательностью, которая обеспечивает транскрипцию и, при необходимости, экспрессию в растительной клетке. Регуляторная последовательность, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – ДНК, может быть гомологичной или гетерологичной по отношению к нуклеиновой кислоте по настоящему изобретению. Общая конструкция молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и регуляторной последовательности (последовательностей) в последствии представляет собой трансген. Часть растения может представлять собой опыленное или неопыленное семя, зародыш, пыльцу, ткань, орган или растительную клетку, при этом, опыленное или неопыленное семя, зародыш или пыльца продуцируется на трансгенном растении и в его геноме, нуклеиновая кислота по настоящему изобретению интегрирована в качестве трансгена, вектора или кассеты экспрессии. Кроме того, настоящее изобретение также включает потомство трансгенного растения, в геном которого интегрирована нуклеиновая кислота по настоящему изобретению в качестве трансгена, вектора или кассеты экспрессии, и которое подходит для использования в качестве индуктора гаплоидов.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу продуцирования растения, подходящего для использования в качестве индуктора гаплоидов. Способ может содержать следующие этапы:

- (a) мутагенез растительных клеток и затем регенерацию растений из растительных клеток, подвергнутых мутагенезу, или мутагенез растений; и
- (b) идентификацию растения из этапа (a), имеющего, по меньшей мере, одну мутацию в эндогенной последовательности ДНК, кодирующей вышеописанную пататин-фосфолипазу, что приводит к, по меньшей мере, одному обмену аминокислот или к генерации стоп-кодона, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения к, по меньшей мере, одному из описанных обменов аминокислот S291L, R59Q, V162I и Q372stop в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID No.: 3 или приводит к, по меньшей мере, одному обмену аминокислот в последовательностях пататин-фосфолипаз растения, соответствующему обмену аминокислот S291L, R59Q, V162I и Q372stop в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID No.: 3, и которое способно индуцировать получение гаплоидного потомства с большей скоростью, по сравнению с растением, не подвергнутым мутагенезу. В этом случае, по меньшей мере, одна мутация приводит к приданию свойства индуктора гаплоидов идентифицированному растению или к повышению эффективности индукции индуктора гаплоидов.

Кроме того, дальнейшие исследования показывают, что существуют дополнительные потенциальные мутагенные сайты, которые подходят для придания растениям свойства индукции гаплоидов или для повышения у них эффективности индукции. Эти мутации приводят к обмену аспарагиновой кислоты (D) в положении 75, глицина (G) в положении 79 и/или пролина (P) в положении 203 аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No.: 3 на другую аминокислоту, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, на аспарагин (N) в положении 75, аргинин (R) в положении 79 и/или лейцин (L) в положении 203 или к таким обменам аминокислот, которые соответствуют обмену аминокислот, происходящему в пататин-фосфолипазах растения.

Эндогенная последовательность ДНК из этапа (b) вышеуказанного способа может, по существу, кодировать любую пататин-фосфолипазу растения. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, эндогенная последовательность ДНК кодирует пататин-фосфолипазу из сорго (SEQ ID No.: 3), подсолнечника (SEQ ID No.: 18), ячменя (SEQ ID No.: 21) или сахарной свеклы, причем сахарная свекла имеет две предполагаемые пататин-фосфолипазы (SEQ ID No.: 24 и 27). Пататин-фосфолипазы растения, упомянутые в этапе (b), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, представляют собой пататин-фосфолипазы растения из подсолнечника (SEQ ID No.: 18), ячменя (SEQ ID No.: 21) или сахарной свеклы, при этом, сахарная свекла имеет две предполагаемые пататин-фосфолипазы (SEQ ID No.: 24 и 27).

Специалисту в данной области техники известно, как может быть достигнута мутация в контексте настоящего изобретения посредством процесса мутагенизации в этапе (а) способа продуцирования растения, которое подходит для использования в качестве индуктора гаплоидов. В данном документе мутагенез включает как обычный мутагенез, так и сайт-специфичный мутагенез или «редактирование генома». Модификация на уровне ДНК не является намеренно индуцированной обычным мутагенезом. Растительная клетка или растение подвергается мутагенным условиям, например, TILLING, посредством облучения ультрафиолетовым светом или посредством использования химических веществ (Тилл *и др.*, BMC Plant Biology 4 (2004), 12). Другим способом случайного мутагенеза является мутагенез посредством транспозона. Сайт-специфичный мутагенез позволяет ввести модификацию на уровне ДНК, нацеленную на предварительно определенные сайты ДНК. Например, могут использоваться методы TALEN (WO 2010/079430, WO 2011/072246), мегануклеазы (Силва *и др.*, Current Gene Therapy 11 (2011), 11), хоуминг-эндонуклеазы (Шевалье, Molecular Cell 10 (2002), 895-905), цинк-пальцевые нуклеазы (Ллойд *и др.*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (2005), 2232-237 или система CRISPR/Cas (Гай *и др.*, Trends in Biotechnology 31 (2013), 397-405).

Идентификация растения в этапе (b) может быть осуществлена, например, посредством молекулярных маркеров или зондов. ДНК-зонды представляют собой, например, праймеры или пары праймеров, которые можно использовать в реакции PCR. Например, TILLING-мутанты (TILLING – Targeting Induced Local Lesions in Genomes – целенаправленное воздействие на индуцированные локальные повреждения в геномах – метод «обратной» генетики) могут быть детектированы или идентифицированы посредством секвенирования гена-мишени в TILLING-популяции или посредством других способов, которые детектируют ошибочные спаривания оснований в ДНК, таких как, анализы температуры плавления или использование нуклеаз, специфичных для ошибочного спаривания оснований. Настоящее изобретение также включает праймер/пары праймеров, которые можно использовать для этой цели, например, праймеры для пататин-фосфолипазы.

Кроме того, мутанты, сгенерированные посредством транспозонов, могут быть детектированы с использованием транспозон-специфичных праймеров и праймеров, специфичных для гена-мишени, в PCR у всей популяции и у продуктов PCR, подвергнутых последующему секвенированию. Настоящее изобретение также содержит такие праймеры. Специалистам в данной области техники известны и другие методы и способы, которые они могут использовать для идентификации растения в этапе (b). Настоящее изобретение также относится к молекулярным маркерам, которые детектируют наличие или отсутствие мутации в эндогенной последовательности ДНК или в регуляторной последовательности эндогенной последовательности ДНК. Например, такие маркеры основаны на SNP (Single Nucleotide Polymorphism –

однонуклеотидный полиморфизм), и они являются специфичными для мутации (примеры: маркеры KASPar или TaqMan).

Идентификация растения в этапе (b) также может быть проведена посредством тестирования эффективности индукции, как описано в рассматриваемом Примере 1. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу идентификации растения по настоящему изобретению посредством детекции мутации в гене пататин-фосфолипазы или посредством детекции маркерного аллеля, который соединен с мутацией, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, с использованием вышеописанных молекулярных маркеров.

Примером растения, продуцированного и идентифицированного таким способом, является растение сорго по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к растению, которое может быть продуцировано или продуцировано вышеуказанным способом, или к части этого растения, при этом, часть растения может представлять собой опыленное или неопыленное семя, зародыш, пыльцу, ткань, орган или растительную клетку, при этом, опыленное или неопыленное семя, зародыш или пыльца продуцированы на трансгенном растении, и в геноме которого присутствует, по меньшей мере, одна мутация. Кроме того, настоящее изобретение также включает потомство растения, которое имеет, по меньшей мере, одну мутацию и подходит для использования в качестве индуктора гаплоидов. По существу, этот способ может быть применен к любому растению, содержащему пататин-фосфолипазу, и, таким образом, ему можно придать свойство индукции гаплоидов. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, это растение представляет собой сорго, подсолнечник, ячмень, сахарную свеклу, рожь, пшеницу или картофель.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу продуцирования трансгенного растения, подходящего для использования в качестве индуктора гаплоидов. Способ может содержать следующие этапы:

- (a) введение молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая кодирует вышеописанную пататин-фосфолипазу и имеет, по меньшей мере, одну мутацию, приводящую к, по меньшей мере, одному из описанных обменов аминокислот или к генерации стоп-кодона, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, приводящую к, по меньшей мере, одному обмену аминокислот, отобранному из S291L, R59Q, V162I и Q372stop в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID No. 3, введение молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, одну мутацию, приводящую к, по меньшей мере, одному обмену аминокислот в последовательностях пататин-фосфолипаз растения, соответствующему обмену аминокислот S291L, R59Q, V162I и Q372stop в соответствии с аминокислотной последовательностью SEQ ID No. 3, введение ранее описанной кассеты экспрессии, содержащей либо молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированную пататин-фосфолипазу растения по настоящему изобретению и функционально сцепленную с

промотором, либо содержащей промотор и, при необходимости, терминатор, функционально сцепленный с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей dsPНК, содержащую, по меньшей мере, 19 нуклеотидов нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID No.: 1 или 2, или имеющей нуклеотидную последовательность, которая на, по меньшей мере, 80% идентична нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID No.: 1 или 2, или введение вектора по настоящему изобретению в растительную клетку; и

(b) регенерацию трансгенных растений из растительных клеток из этапа (a).

Способ продуцирования трансгенного растения, подходящего для использования в качестве индуктора гаплоидов, также включает предложение, по меньшей мере, двух вышеописанных нуклеиновых кислот, а также, посредством отбора различных вариантов осуществления нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и, при необходимости, по меньшей мере, в одном векторе, и трансформирующихся растительных клеток посредством введения, по меньшей мере, двух нуклеиновых кислот. В альтернативном или дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения, в дополнение к нуклеиновой кислоте по настоящему изобретению, предложена и трансформирована или введена в систему скрещивания, по меньшей мере, одна нуклеиновая кислота, о которой известно, что она подходит для генерации индуктора гаплоидов (например, подвергнутый манипуляциям ген *cenh3* (Рави и Чан, Nature 464 (2010), 615-618, EP 2989889 A1; EP 3037540 A1, WO 2016/138021 A1).

Молекула нуклеиновой кислоты из этапа (a) способа продуцирования растения, подходящего для использования в качестве индуктора гаплоидов, может кодировать пататин-фосфолипазу любого растения. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, эндогенная последовательность ДНК кодирует пататин-фосфолипазу из сорго (SEQ ID No.: 3), подсолнечника (SEQ ID No.: 18), ячменя (SEQ ID No.: 21) или сахарной свеклы, причем сахарная свекла имеет две предполагаемые пататин-фосфолипазы (SEQ ID No.: 24 и 27). Пататин-фосфолипазы растения, упомянутые в том же этапе (b), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, представляют собой пататин-фосфолипазы из подсолнечника (SEQ ID No.: 18), ячменя (SEQ ID No.: 21) или сахарной свеклы, при этом, сахарная свекла имеет две предполагаемые пататин-фосфолипазы (SEQ ID No.: 24 и 27).

Введение молекулы нуклеиновой кислоты или вектора из этапа (a) происходит посредством трансформации, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, посредством стабильной трансформации растительных клеток. Вектор может быть введен, например, посредством конъюгации, мобилизации, биолистической трансформации, опосредованной *Agrobacterium* трансформации, трансфекции, трансдукции, вакуумной инфльтрации или электропорации. Такие способы известны специалисту в данной области техники (Сэмбрук и др., 2001). Кроме того, молекула нуклеиновой кислоты также может быть

введена в геном растения посредством гомологичной рекомбинации, например, посредством системы CRISPR/Cas или системы CRISPR/Cpf1 и матрицы для репарации.

Настоящее изобретение также относится к трансгенному растению, которое может быть продуцировано или продуцировано этим способом, или к части этого растения, при этом, часть растения может представлять собой опыленное или неопыленное семя, зародыш, пыльцу, ткань, орган или растительную клетку, при этом, опыленное или неопыленное семя, зародыш или пыльца продуцированы на трансгенном растении, и в геном которого интегрирована введенная нуклеиновая кислота в качестве трансгена или вектора. Кроме того, настоящее изобретение также включает потомство трансгенного растения, которое имеет введенную нуклеиновую кислоту в качестве трансгена и подходит для использования в качестве индуктора гаплоидов. По существу, этот способ может быть применен к любому растению, содержащему пататин-фосфолипазу, и, таким образом, ему можно придать свойство индукции гаплоидов. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, это растение представляет собой сорго, подсолнечник, ячмень, сахарную свеклу, рожь, пшеницу или картофель.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу продуцирования гаплоидного растения, содержащему следующие этапы:

- (a) скрещивание нетрансгенного или трансгенного индуцированного растения по настоящему изобретению, которое подходит для использования в качестве индуктора гаплоидов, с растением того же рода, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, того же вида,
- (b) отбор опыленного гаплоидного семени или зародыша, и
- (c) продуцирование гаплоидного растения из семени или зародыша из этапа (b).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растение, подходящее для использования в качестве индуктора гаплоидов, используют в качестве отцовской формы и скрещивают с материнской формой того же рода, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, того же вида. Растение, подходящее для использования в качестве индуктора гаплоидов, также можно использовать в качестве материнской формы для скрещивания с отцовской формой того же рода, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, того же вида. Оба партнера по скрещиванию в этапе (a), то есть, материнская форма и отцовская форма, также могут быть одним и тем же индивидуумом. Этап скрещивания далее представляет собой самоопыление.

Отбор гаплоидного опыленного семени или зародыша может содержать этап детектирования гаплоидии и отделения гаплоидного опыленного семени или зародыша от полиплоидных опыленных семян или зародышей. Детектирование гаплоидии опыленного спермия или зародыша может быть фенотипическим или генотипическим, например, посредством предложения индуктора со специфичным для зародыша доминантным маркером, который виден у всего диплоидного потомства, но не у индуцированного гаплоидного потомства. Кроме того, статус

плоидности может быть определен посредством проточной цитометрии. Кроме того, паттерн полной гомозиготности молекулярных маркеров указывает на гаплоидные растения. Отделение может быть автоматизированным, например, на основе данных, полученных в результате детекции гаплоидии.

Настоящее изобретение также относится к гаплоидному опыленному семени или зародышу, которые плучают в результате скрещивания в этапе (а) способа продуцирования гаплоидного растения, и к гаплоидному растению, которое может быть продуцировано или продуцировано этим способом, или к части этого растения, при этом, часть растения может представлять собой семя, зародыш, ткань, орган или растительную клетку. Кроме того, настоящее изобретение также включает потомство растения.

Кроме того, настоящее изобретение также включает двойное гаплоидное (диплоидное) растение или его часть, при этом, двойное гаплоидное (диплоидное) растение или его часть было продуцировано посредством удвоения хромосом гаплоидного растения или его части. Эти двойные гаплоидные (диплоидные) растения могут быть получены следующим способом:

- (а) продуцированием гаплоидного растения посредством способа по настоящему изобретению;
- (b) удвоением гаплоидного набора хромосом в, по меньшей мере, одной клетке гаплоидного растения, и
- (с) регенерацией диплоидного растения из клетки из этапа (b).

В способе получения двойных гаплоидных растений по настоящему изобретению, гаплоидные растения из этапа (а) обрабатывают ингибитором клеточного деления колхицином. Это приводит к удвоению хромосом. Специалист в данной области техники знает об этом процессе, и он описан, например, в работе Сеги-Симарро и Нуэц, *Cytogenetic and Genome Research* 120 (2008), 358-369.

Специалистам в данной области техники известны общие способы продуцирования гаплоидных и двойных гаплоидных растений, например, из работы Дживеди *и др.*, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015), 812-29 и из работы Муровец и Боганец, *Биохимия, генетика и молекулярная биология «Скрещивание растений»* (2012), под ред. Абдурахмонова, Глава 5, и они могут быть применены к настоящему изобретению.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения содержит способ продуцирования гибридных растений посредством следующих этапов:

- (а) скрещиванием двойного гаплоидного (диплоидного) растения по настоящему изобретению со вторым растением того же рода, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, того же вида,
- (b) отбором гибридных растений с учетом желаемого признака.

Двойные гаплоидные растения являются гомозиготными, и известный эффект гетерозиса возникает при скрещивании двух гомозиготных растений, что приводит к особенно выраженной

эффективности гибридных растений. Соответственно, гибридные растения, полученные таким способом, также являются объектом настоящего изобретения.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к использованию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению или вышеописанной кассеты экспрессии в растении для придания свойства индуктора гаплоидов или для повышения эффективности индукции индуктора гаплоидов, или к использованию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению или ранее описанной кассеты экспрессии для продуцирования растения или трансгенного растения, подходящего для использования в качестве индуктора гаплоидов. Кроме того, настоящее изобретение также включает использование растения по вышеописанному изобретению, которое подходит для использования в качестве индуктора гаплоидов для продуцирования гаплоидного опыленного семени или зародыша, или гаплоидного растения. Приведенные выше пояснения объектов и способов настоящего изобретения также применимы к упомянутым вариантам использования.

В экспериментах с растениями сорго по настоящему изобретению мог бы быть выявлен ген, в частности, ген пататин-фосфолипазы, имеющий, по меньшей мере, одну мутацию, которая подходила бы для придания растению свойства индуктора гаплоидии и эффективности индукции на уровне, по меньшей мере, от 0,4% до 1,5% или более, в результате чего впервые могла бы быть предложена эффективная и, следовательно, экономически применимая система продуцирования гаплоидных и двойных гаплоидных растений сорго для гибридного скрещивания. Способ по настоящему изобретению для продуцирования таких индукторов гаплоидов и идентификации пататин-фосфолипаз в будущих сельскохозяйственных культурах также может быть перенесен в эту систему.

Следующие примеры демонстрируют настоящее изобретение, однако они не ограничивают объем настоящего изобретения. Если не указано иное, использовались стандартные способы молекулярной биологии, см., например, (Сэмбрук *и др.*, Молекулярное клонирование: Инструкция по проведению лабораторных работ, 3-е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, 2001), Фрич *и др.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989; Майер *и др.*, Иммунохимические способы в клеточной и молекулярной биологии, под ред., Academic Press, Лондон, 1987) и Вейр *и др.*, Справочник по экспериментальной иммунологии, Тома I-IV, Blackwell, под ред., 1986).

ПРИМЕРЫ

1. Идентификация пататин-фосфолипазы в качестве мишени для придания сорго свойства индукции гаплоидов

В TILLING-популяции было выявлено растение сорго, способное индуцировать гаплоидию с эффективностью, примерно, 1%. Особое внимание уделено различным генам в качестве потенциальных мишеней при поиске генетической основы, которая придает это свойство

идентифицированному растению сорго. Отбор генов был сделан на основании того факта, что они преимущественно экспрессируются в репродуктивных органах растения и каким-либо образом играют роль в опылении, потому что элиминация хромосом может происходить посредством дефектного или неполного опыления, например, при отсутствии или некорректной транспортировки генеративных клеток в женские семяпочки или посредством воздействия на энергетический метаболизм пыльцы, что приводит к гаплоидному набору хромосом.

Согласно предварительным исследованиям в контексте настоящего изобретения, был впоследствии выявлен мутировавший ген, который можно было бы идентифицировать как пататин-фосфолипазу в сорго посредством биоинформационных методов BLASTP и Synteny Study (исследование синтении) (Альтшуль *и др.*, Nucleic Acid Res. 25 (1997), 3389-3402), нуклеотидная и аминокислотная последовательности которого проиллюстрированы в SEQ ID No.: 1 или SEQ ID No.: 3, и они были идентифицированы как пыльцеспецифичная экспрессированная пататин-фосфолипаза посредством РНК-секвенирования (RNASeq). Мутировавший ген имел точечную мутацию в нуклеотидной последовательности пататин-фосфолипазы (см. SEQ ID No.: 10), что вызвало замену аминокислоты серин на лейцин в положении 291 (см. SEQ ID No.: 12). Точечная мутация в нуклеотидной последовательности пататин-фосфолипазы была идентифицирована с использованием способа PCR с праймерами в соответствии с SEQ ID Nos.: 44 и 45.

Для верификации того факта, что мутировавший ген является причиной наблюдаемой индукции гаплоидов, в генетический фон неиндуктора ввели локус, содержащий ген, посредством скрещивания и способов биотехнологии. Это позволило ввести свойство индуктора гаплоидов в неиндуктор со средней эффективностью 1,5%, когда мутация была гомозиготной, и 1,2%, когда мутация была гетерозиготной. Во время верификации, за мутантным геном могла бы следовать PCR с праймерами в соответствии с SEQ ID Nos.: 36-38. Эффективность индукции потенциального индуктора осуществляли посредством опыления растений сорго мутантными растениями сорго (содержащими мутировавший ген). В этом случае, использованные растения сорго дикого типа генетически отличались от нескольких маркеров линии потенциального индуктора. Эти маркеры были использованы для идентификации гомозиготных растений, которые впоследствии были протестированы на предмет гаплоидии посредством проточной цитометрии.

2. Создание в условиях *in vivo* других индукторов гаплоидов сорго

После верификации, посредством ранее описанного эксперимента, того факта, что пататин-фосфолипаза в сорго является подходящей мишенью для придания сорго свойства индукции гаплоидов, в эндогенный ген дикого типа были введены дополнительные мутации. Была введена мутация, которая привела к обмену аминокислоты глутамин (Q) на стоп-кодон в положении 372. Это привело к укорочению белка пататин-фосфолипазы и придало растению сорго, содержащему эту мутацию, свойство индукции гаплоидов со средней эффективностью от 1% до 3%. Как

показано на Фигуре 2, ранее описанные мутации S291L и Q372stop находятся за пределами функционального домена пататин-фосфолипазы. Следовательно, в следующем эксперименте мутации были введены в ген пататин-фосфолипазы, которые, с одной стороны, вызвали обмен аминокислот R59Q а, с другой стороны, обмен аминокислот V162I. Эти две мутации находятся в пределах функционального домена и заставляют сорго приобрести свойство индуктора гаплоидов, при этом, первоначальные эксперименты показали, что скорость индукции лежит в пределах, превышающих, примерно, 0,5%. Выравнивание последовательностей четырех мутантов с белком дикого типа показано на Фигуре 1.

Ожидается, что дополнительные или разные мутации, или комбинация множественных мутаций в пататин-фосфолипазе приведут к повышению или к дальнейшему повышению скорости индукции, таким образом, могут быть проведены дальнейшие эксперименты для скрининга TILLING-популяций с целью идентификации растения, обладающего повышенной эффективностью индукции.

Кроме того, мутации также могут быть введены в пататин-фосфолипазу не только посредством TILLING или других способов мутагенеза у различных видов сорго и у видов, полученных из него, но, например, дополнительные индукторы гаплоидов могут быть продуцированы посредством трансгенной экспрессии пататин-фосфолипазы. Для этой цели, соответствующие гены, включая их промоторы из линий индукторов сорго, имеющих мутации S291L, R59Q, V162I и/или Q372stop в пататин-фосфолипазе в соответствии с SEQ ID No.: 3, должны быть клонированы. Эти гены могут быть клонированы в подходящий вектор для трансформации и трансформированы в желаемое растение.

Вышеописанное свойство индукции растений сорго можно отнести к проиллюстрированным мутациям в пататин-фосфолипазе, которые обычно приводят к изменению их биологической активности. Однако биологическая активность может быть изменена не только посредством введения описанных мутаций, но также посредством многочисленных дополнительных способов генной инженерии.

Например, ген дикого типа пататин-фосфолипазы вместе с подходящим промотором может быть клонирован в вектор для трансформации и трансформирован в желаемое растение, что приводит к сверхэкспрессии пататин-фосфолипазы. Кроме того, активность пататин-фосфолипазы можно понизить посредством РНК-интерференции. Для этого, например, необходимо продуцировать шпилечные конструкции, которые затем клонируются в подходящий вектор для трансформации и трансформируются в желаемое растение, включая подходящий промотор и терминатор, которые обеспечивают проведение транскрипции шпилечной конструкции до или во время образования пыльцы. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, могут быть выявлены нокаутные мутанты, которые еще больше понижают активность.

3. Создание в условиях *in vivo* новых индукторов гаплоидов

Первые исследования в контексте настоящего изобретения дают разумные основания предполагать, что некоторым другим сельскохозяйственным культурам возможно придать свойство индукции гаплоидов или улучшение этого свойства посредством модификаций пататин-фосфолипазы, в частности, посредством вышеописанных соответствующих мутаций для растения сорго или в соответствии со способом по вышеописанному изобретению. Это – гены-мишени, кодирующие предполагаемые пататин-фосфолипазы, имеющие одну из следующих аминокислотных последовательностей в подсолнечнике (SEQ ID No.: 18), ячмене (SEQ ID No.: 21) или сахарной свекле, при этом, сахарная свекла имеет две потенциальные фосфолипазы (SEQ ID No.: 24 и 27). Выравнивание последовательностей последовательностей белка из сорго, подсолнечника, ячменя и сахарной свеклы проиллюстрировано на Фигуре 2, на которой дополнительно охарактеризован (**жирным шрифтом**) предполагаемый функциональный домен. Экспрессия этих генов в пыльце может быть осуществлена, например, посредством PHKSeq пыльцы.

В соответствии с вышеописанным способом по настоящему изобретению, модификации, относящиеся к пататин-фосфолипазе, теперь можно, посредством отбора, вводить в подсолнечник, ячмень (и другие зерновые культуры, такие как, пшеница, рожь и овес) и сахарную свеклу. Например, посредством выравнивания последовательностей на Фигуре 2, можно идентифицировать аминокислоты, соответствующие и обменивающие аминокислоты в положениях 291, 59, 162 и 372 в соответствии с SEQ ID No.: 3. Соответственно, растения подсолнечника, ячменя или зерновая культура и растение сахарной свеклы также являются объектом настоящего изобретения, которые способны индуцировать гаплоидию и характеризуются тем, что они имеют, по меньшей мере, одну модификацию, одну эндогенную, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, пыльцеспецифичную экспрессируемую пататин-фосфолипазу, соответственно относящуюся к одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, охарактеризованных в вышеуказанных пунктах [] или в формуле изобретения, в частности, для растений сорго, и/или для растений, получаемых способом по вышеописанному изобретению или описанных в формуле изобретения. Уже есть первые показатели, свидетельствующие, что обмены аминокислот в положении 75 (аспарагиновая кислота (D) заменяется аспарагином (N) (D75N)), в положении 79 (глицин (G) заменяется аргинином (R) (G79R)) и/или в положении 203 (пролин (P) заменяется лейцином (L) (P203L)) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No.: 3 также могут придать индукцию гаплоидов как сорго, так и другим сельскохозяйственным культурам.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение сорго, которое способно индуцировать гаплоидию, отличающееся тем, что оно имеет, по меньшей мере, одну модификацию, относящуюся к эндогенному гену, кодирующему пататин-фосфолипазу.
2. Растение по пункту 1, отличающееся тем, что пататин-фосфолипаза кодируется нуклеотидной последовательностью в соответствии с SEQ ID No.: 1 или 2, или нуклеотидной последовательностью, которая на, по меньшей мере, 80% идентична последовательности SEQ ID No.: 1 или 2, или кодируется нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется с последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID No.: 1 или 2 в жестких условиях, или которая содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID No.: 3, или гомологичную аминокислотную последовательность.
3. Растение по пункту 1 или 2, отличающееся тем, что, по меньшей мере, одна модификация представляет собой, по меньшей мере, одну мутацию в эндогенном гене, кодирующем пататин-фосфолипазу, предпочтительно, замещением, которое приводит к, по меньшей мере, одному обмену аминокислот или к образованию стоп-кодона, при этом, предпочтительно, по меньшей мере, одна мутация приводит к обмену аминокислот
 - a) в диапазоне положений аминокислоты от 37 до 240 в соответствии с SEQ ID No.: 3, при этом, предпочтительно, данный диапазон соответствует функциональному домену пататин-фосфолипазы; и/или
 - b) в диапазоне положений аминокислоты от 241 до 385 в соответствии с SEQ ID No.: 3, или
 - c) к генерации стоп-кодона в диапазоне положений аминокислоты от 241 до 385 в соответствии с SEQ ID No.: 3.
4. Растение по пункту 3, отличающееся тем, что, по меньшей мере, одна мутация приводит к обмену аминокислот в положении аминокислоты 59, 162 и/или 291 в соответствии с SEQ ID No.: 3 и/или к стоп-кодону в положении аминокислоты 372 в соответствии с SEQ ID No.: 3.
5. Растение по одному из пунктов 1-4, отличающееся тем, что модифицированная пататин-фосфолипаза
 - (i) содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID No.: 3 или гомологичную аминокислотную последовательность, в которой присутствует, по меньшей мере, один обмен аминокислот, при этом, аргинин (R) в положении 59, валин (V) в положении 162 и/или серин (S) в положении 291 в соответствии с SEQ ID No.: 3

- заменяется другой аминокислотой, предпочтительно, глутамином (Q) в положении 59, изолейцином (I) в положении 162 и/или лейцином (L) в положении 291;
- (ii) кодируется нуклеотидной последовательностью, содержащей кодирующую последовательность последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID No.: 1 или последовательность ДНК, которая на, по меньшей мере, 80% идентична SEQ ID No.: 1, в которой присутствует, по меньшей мере, один обмен нуклеотидов, приводящий к обмену аминокислот, при этом, по меньшей мере, один нуклеотид обменивается в положениях 421-423, 815-817, 1420-1422 и/или 1663-1665 в соответствии с SEQ ID No.: 1;
- (iii) содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID No.: 6, 9 или 12; или (iii) кодируется нуклеотидной последовательностью, содержащей кодирующую последовательность последовательности ДНК в соответствии с SEQ ID No.: 4, SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 10, SEQ ID No.: 13.
6. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует мутировавшую пататин-фосфолипазу по любому из пунктов 3-5.
7. Молекула нуклеиновой кислоты по пункту 6, отличающаяся тем, что ее присутствие в растении, в отсутствие пататин-фосфолипазы дикого типа, приводит к тому, что растение способно индуцировать гаплоидию.
8. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая в длину, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, предпочтительно, по меньшей мере, 21, 22, 23, 24 или 25, более предпочтительно, по меньшей мере, 30, 35, 40, 45 или 50 и, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 100, 200, 300, 500 или 1000 нуклеотидов, которая специфически гибридизируется с нуклеотидной последовательностью, определенной в пункте 4 или 5, и содержит одну из мутаций или пару молекул нуклеиновой кислоты, которая подходит для диапазона, содержащего, по меньшей мере, одну из мутаций, для амплификации в полимеразной цепной реакции (PCR), предпочтительно, в форме олигонуклеотида, предпочтительно, имеющего максимальную длину – 50 нуклеотидов, который, предпочтительно, имеет одну из следующих нуклеотидных последовательностей в соответствии с SEQ ID No.: 28-30, 32-34, 36-38 или 40-42.
9. Клетка-хозяин, предпочтительно, растительная клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 6-8, вектор, предпочтительно, вектор растения, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 6-8 или молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 6-8 в качестве трансгена, при необходимости, регулируемого гетерологичным промотором.

10. Способ получения растения, способного индуцировать гаплоидию или имеющего повышенную скорость индукции относительно дикого типа, содержащий следующие этапы:
- (a)
 - (i) мутагенез растительных клеток и затем регенерацию растений из растительных клеток, подвергнутых мутагенезу, или мутагенез растений;
 - (ii) идентификацию растения из этапа (i), имеющего, по меньшей мере, одну мутацию в эндогенной последовательности ДНК, которая соответствует, и/или которая приводит к, по меньшей мере, одной мутации, идентифицированной в пунктах 3-5, где аспарагиновая кислота (D) в положении 75, глицин (G) в положении 79 и/или пролин (P) в положении 203 аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No.: 3, заменяется другой аминокислотой, предпочтительно, аспарагином (N) в положении 75, аргинином (R) в положении 79 и/или лейцином (L) в положении 203, или соответствующими им аминокислотами, и способного индуцировать получение гаплоидного потомства с повышенной скоростью, по сравнению с растением, не подвергнутым мутагенезу; или
 - (b)
 - (i) введение молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, одну мутацию, которая соответствует, по меньшей мере, одной мутации, охарактеризованной в одном из пунктов 3-5, и/или которая приводит к замене в клетке растения аспарагиновой кислоты (D) в положении 75, глицина (G) в положении 79 и/или пролина (P) в положении 203 аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 3 другой аминокислотой, предпочтительно, аспарагином (N) в положении 75, аргинином (R) в положении 79 и/или лейцином (L) в положении 203 или соответствующими им аминокислотами, и
 - (ii) регенерацию растения из растительной клетки (i), предпочтительно эндогенная последовательность ДНК или молекула нуклеиновой кислоты представляет собой кодирующую нуклеотидную последовательность, которая содержит аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID No.: 3 для sorgho (*Sorghum bicolor*), SEQ ID No.: 18 для подсолнечника (*Helianthus annuus*), SEQ ID No.: 21 для ячменя (*Hordeum vulgare*) или в SEQ ID No.: 24 или 27 для Beta vulgaris (например, для сахарной свеклы).
11. Растение, содержащее растительную клетку по пункту 9 и/или получаемое способом по пункту 10, предпочтительно растение представляет собой сорго, подсолнечник, рожь, пшеницу, картофель, ячмень или сахарную свеклу.

12. Орган, часть растения, ткань или клетка растения по одному из пунктов 1-5 или 11, или семена, или потомство растения по одному из пунктов 1-5 или 11, отличающееся тем, что семя или потомство имеет мутацию, по пунктам 3-5, и/или молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 6-8 или вектор, предпочтительно, вектор растения, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по одному из пунктов 6-8.
13. Способ получения гаплоидного растения, содержащий этапы:
 - (a) скрещивание растения по одному из пунктов 1-5 или 11 с растением того же рода, предпочтительно, того же вида,
 - (b) отбор опыленного гаплоидного семени или зародыша, и
 - (c) продуцирование гаплоидного растения из семени или зародыша из этапа (b).
14. Гаплоидное растение, гаплоидное опыленное семя или зародыш, получаемый способом по пункту 13.
15. Орган, часть растения, ткань, клетка, семя или потомство растения по пункту 14.

Sorghum_PPL_AA	MATYYSSRRPCNACSTKAMAGSVVGEPPVVLGQQRVTVLTVDGGGIRGLIPGTILAFLEARL
Sorghum_PPL_R59Q	MATYYSSRRPCNACSTKAMAGSVVGEPPVVLGQQRVTVLTVDGGGIRGLIPGTILAFLEAQL
Sorghum_PPL_V162I	MATYYSSRRPCNACSTKAMAGSVVGEPPVVLGQQRVTVLTVDGGGIRGLIPGTILAFLEARL
Sorghum_PPL_S291L	MATYYSSRRPCNACSTKAMAGSVVGEPPVVLGQQRVTVLTVDGGGIRGLIPGTILAFLEARL
Sorghum_PPL_Q372stop	MATYYSSRRPCNACSTKAMAGSVVGEPPVVLGQQRVTVLTVDGGGIRGLIPGTILAFLEARL *****;
Sorghum_PPL_AA	QELDGPEVRLADYFDYIAGTSTGGLITAMLTAPGKDRRPLYAAKDINQFYMENCPRIFPQ
Sorghum_PPL_R59Q	QELDGPEVRLADYFDYIAGTSTGGLITAMLTAPGKDRRPLYAAKDINQFYMENCPRIFPQ
Sorghum_PPL_V162I	QELDGPEVRLADYFDYIAGTSTGGLITAMLTAPGKDRRPLYAAKDINQFYMENCPRIFPQ
Sorghum_PPL_S291L	QELDGPEVRLADYFDYIAGTSTGGLITAMLTAPGKDRRPLYAAKDINQFYMENCPRIFPQ
Sorghum_PPL_Q372stop	QELDGPEVRLADYFDYIAGTSTGGLITAMLTAPGKDRRPLYAAKDINQFYMENCPRIFPQ *****
Sorghum_PPL_AA	KSSRLAAAMSALRKPRYNGKCLRNLIMSMLGETRVSDTLTNVIIPTFDVRLLQPIIFSTY
Sorghum_PPL_R59Q	KSSRLAAAMSALRKPRYNGKCLRNLIMSMLGETRVSDTLTNVIIPTFDVRLLQPIIFSTY
Sorghum_PPL_V162I	KSSRLAAAMSALRKPRYNGKCLRNLIMSMLGETRVSDTLTNIIIPTFDVRLLQPIIFSTY
Sorghum_PPL_S291L	KSSRLAAAMSALRKPRYNGKCLRNLIMSMLGETRVSDTLTNVIIPTFDVRLLQPIIFSTY
Sorghum_PPL_Q372stop	KSSRLAAAMSALRKPRYNGKCLRNLIMSMLGETRVSDTLTNVIIPTFDVRLLQPIIFSTY *****;
Sorghum_PPL_AA	DAKSMPKLNALLSDVCIGTSAAPTYLPAHYFQTKDAGSGKEREYNLIDGGVAANNPTMVA
Sorghum_PPL_R59Q	DAKSMPKLNALLSDVCIGTSAAPTYLPAHYFQTKDAGSGKEREYNLIDGGVAANNPTMVA
Sorghum_PPL_V162I	DAKSMPKLNALLSDVCIGTSAAPTYLPAHYFQTKDAGSGKEREYNLIDGGVAANNPTMVA
Sorghum_PPL_S291L	DAKSMPKLNALLSDVCIGTSAAPTYLPAHYFQTKDAGSGKEREYNLIDGGVAANNPTMVA
Sorghum_PPL_Q372stop	DAKSMPKLNALLSDVCIGTSAAPTYLPAHYFQTKDAGSGKEREYNLIDGGVAANNPTMVA *****
Sorghum_PPL_AA	MTQITKKMLASKEKAEELYPVKPWNCRKFLVLSIGTGSTSEQGLYTARQCSRWGICRWIR
Sorghum_PPL_R59Q	MTQITKKMLASKEKAEELYPVKPWNCRKFLVLSIGTGSTSEQGLYTARQCSRWGICRWIR
Sorghum_PPL_V162I	MTQITKKMLASKEKAEELYPVKPWNCRKFLVLSIGTGSTSEQGLYTARQCSRWGICRWIR
Sorghum_PPL_S291L	MTQITKKMLASKEKAEELYPVKPWNCRKFLVLSIGTGSTSEQGLYTARQCIRWGICRWIR
Sorghum_PPL_Q372stop	MTQITKKMLASKEKAEELYPVKPWNCRKFLVLSIGTGSTSEQGLYTARQCSRWGICRWIR *****
Sorghum_PPL_AA	NNGMAPIIDIFMAASSDLVDIHVAAMFQSLHSDGDYLRIQDNSLHGAAATVDAATPENMR
Sorghum_PPL_R59Q	NNGMAPIIDIFMAASSDLVDIHVAAMFQSLHSDGDYLRIQDNSLHGAAATVDAATPENMR
Sorghum_PPL_V162I	NNGMAPIIDIFMAASSDLVDIHVAAMFQSLHSDGDYLRIQDNSLHGAAATVDAATPENMR
Sorghum_PPL_S291L	NNGMAPIIDIFMAASSDLVDIHVAAMFQSLHSDGDYLRIQDNSLHGAAATVDAATPENMR
Sorghum_PPL_Q372stop	NNGMAPIIDIFMAASSDLVDIHVAAMFQSLHSDGDYLRIQDNSLHGAAATVDAATPENMR *****
Sorghum_PPL_AA	TLVGIGERMLAQRVSRVNVETGRYEPVPGEGSNADALAGIARQLSEERRTRLARRTSAIV
Sorghum_PPL_R59Q	TLVGIGERMLAQRVSRVNVETGRYEPVPGEGSNADALAGIARQLSEERRTRLARRTSAIV
Sorghum_PPL_V162I	TLVGIGERMLAQRVSRVNVETGRYEPVPGEGSNADALAGIARQLSEERRTRLARRTSAIV
Sorghum_PPL_S291L	TLVGIGERMLAQRVSRVNVETGRYEPVPGEGSNADALAGIARQLSEERRTRLARRTSAIV
Sorghum_PPL_Q372stop	TLVGIGERMLA----- *****
Sorghum_PPL_AA	SSGGASRRTCASKVSNV
Sorghum_PPL_R59Q	SSGGASRRTCASKVSNV
Sorghum_PPL_V162I	SSGGASRRTCASKVSNV
Sorghum_PPL_S291L	SSGGASRRTCASKVSNV
Sorghum_PPL_Q372stop	----- *****

Sorghum bicolor_PPL_AA	MATYYSSRRPCNACSTKAM-----AGSVVGEPPVVLGQRTVTLTVDGGGIRGLI
Hordeum vulgare_PPL_AA	-MASYWCRRPCESCSTRAM-----AGSVVGQPVAPGQRTVTLTIDGGGIRGLI
Helianthus annuus_PPL_AA	-----MNNINLVIVSLVIAIVAIQPLAQEQTDVGEANFVTVLSIDGGGVRGIV
Beta vulgaris_PPL1_AA	-----MENSRL-----GNPVSPRPNNHGNLITILSIDGGGIRGII
Beta vulgaris_PPL2_AA	-----MTN--LQ-----SSPFSFNYYNRKKLVTTILSIDGGGIRGII
	: :*:**:*****:**:
Sorghum bicolor_PPL_AA	PGTILAFLEARLQELDGPEVRLADYFDYIAGTSTGGLITAMLTAPGKDRRPLYAAKDINQ
Hordeum vulgare_PPL_AA	PGTILAFLEARLQELDGP DARLADYFDYIAGTSTGGLITAMLTAPGQDGRPLFAAKDVNR
Helianthus annuus_PPL_AA	PATLLAFLESKIQEIDGPDARIADYFDYIAGTSTGGLMTTMLAAPNEKNRPMFAAKDITN
Beta vulgaris_PPL1_AA	PAVMLEFLESQLOKLDGEEARLADYFDYIAGTSTGGLITAMLTAPNDKTRPLYAAKEITP
Beta vulgaris_PPL2_AA	PAVILAFLERLQLQELDGEEVRLADYFDYIAGTSTGGLITAMLTAPDDYNRPLYAAKDITT
	.: *** :*:** :*:***** ******:**:***. **:****:.
Sorghum bicolor_PPL_AA	FYMENCPRIFPQKSSRL-----AA---AMSALRKPRYNGKCLRNV
Hordeum vulgare_PPL_AA	FYLDNGPYIFPQRRCAL-----AA---VTASLRPRYSGKYLHG
Helianthus annuus_PPL_AA	FYFQHSRPRIFPKIGHTFDEAQPYP SQNEACEMGRKFMNSVTVLGEATGPKYDGKYLRA
Beta vulgaris_PPL1_AA	FYLEHCPKIFRQPSGIF-----GSIGTLMKLLSGPKYDGKYLHN
Beta vulgaris_PPL2_AA	FYLKHGPQIFPQERGPL-----AQLISFIKAMTGPKYDGKYLRH
	.: * ** : : **:* :
Sorghum bicolor_PPL_AA	LIMSMLGETRVSDTLTNVIIPTFDVRLLOPIIFSTYDAKSMP LKNALLSDVCIGTSAAPT
Hordeum vulgare_PPL_AA	KIRSM LGETRLCDALTDVVIPTFDVKLLQPIIFSTYDARNMPLKNARLADICIGTSAAPT
Helianthus annuus_PPL_AA	MAKMLKKNLTIKDTLTNIVIPAFDIRRLQPVIFSSAQGKEVAWNALLADVCIISTAAAPT
Beta vulgaris_PPL1_AA	LVKELLGQRRLLHQALTNVVIPTFDIKNLQPVLFSTYMPVIAKELDVLLSDICIGTSAAPT
Beta vulgaris_PPL2_AA	ILREKLKETRLHHTLTNVVIPTFDIKTFQPVIFSSYKILSYDLDALSDICIGTSAAPT
	* : :. *:***:****
Sorghum bicolor_PPL_AA	YLP AHYFQTKDAGSGKEREYNLIDGGVAANNPTMVAMTQITKKMLASKEKAEELYPVKWPV
Hordeum vulgare_PPL_AA	YLP AHHFHTQDD-NGKEREYNLIDGGVAANNPTMVTMTQITKKMMVK--DREELYPVKPS
Helianthus annuus_PPL_AA	FFPPYYFETRDV-DGTHFTFDLIDGGVAANNPTHLAITHITKEAVMG---KYRFSGPEVF
Beta vulgaris_PPL1_AA	FLPAHHFENKDD-QGNVKEFNLIDGGIAANNPSLVAISEVTQIVKS---NPNFFPIKAT
Beta vulgaris_PPL2_AA	ILPSFYFQNAFE-NEKTREFNLIDGGIVSTNPTYLAINEVTQOMKE---NPDYGTI---
	:* :*:.. : : :*****:..*: : : : :*: :
Sorghum bicolor_PPL_AA	NCRKFLVLSIGTGSTSEQGLYTARQCSRWGICRWIRNNGMAPIIDIFMAASSDLVDIHVA
Hordeum vulgare_PPL_AA	DCGKFLVLSIGTGSTSDQGLYTAQCSQWGIIRWLRNKGMAPIIDIFMAASSDLVDIHAA
Helianthus annuus_PPL_AA	DGRRMLVLSIGTGTQTYNDLYTAQKAAGWLLSWIFTNGTAPILRIFGDAMSDMVDIHVS
Beta vulgaris_PPL1_AA	DRERLLVISLGTGSDKVEQLYNAKSAKWGII SWLFDNGNTPLLD AFNQSKADMVDFHNS
Beta vulgaris_PPL2_AA	-HNKLLVLSIGTGSGKIEQYNAKTAGKWGLVSWLFQNGSSPIISAFYEAGADLVYQNN
	:***:****: . : *.*: ..*: : * : * :*: : * :*:** :
Sorghum bicolor_PPL_AA	AMFQSLHSDGDYLRIQDNSLHGAAATVDAATPENMRTL VGIGERM LAQRVSRVNVETGRY
Hordeum vulgare_PPL_AA	VLFQSLHSDGNYLRIQDNSLHGPAATVDAATPENMAELLRIGERM LAQRVSRVNVETGRY
Helianthus annuus_PPL_AA	TIFQSLQVEKNYLRIQEDNLKGEATAMDISSPENMRALEDIGKKLLKKPLSRLDVETGKL
Beta vulgaris_PPL1_AA	VAFAQYAGSLDNYLRIQDDTLKGVSASVDVATTENLANLVITIGKALLKKPVSRINFDTGRY
Beta vulgaris_PPL2_AA	ILFQSFRESDKYLRVQDDSLTGTTASTDVATEKNLENLVKIGQELLNKPASRVDPETGHL
	** : .*****:..* * : : * : : * : * : * : * : * : * : * :
Sorghum bicolor_PPL_AA	EPVPGEGSNADALAGIARQLSEERRTRLARRTSAIVSSGGASRRTCASKVSNV
Hordeum vulgare_PPL_AA	EEIRGAGSNADALAGFAQLSDERRTRLGRRRVGAGRLKSRR-----
Helianthus annuus_PPL_AA	EPVKGEGTNADALARFATLLCAERKRRNP-----
Beta vulgaris_PPL1_AA	QPIPNGGTNEEALIRFAKLLTEEKSRREQYRTNRS-----
Beta vulgaris_PPL2_AA	KAIPHLGTNADALRRFAQLSDERKYRRGKDSNQMQEYS-----
	: : *.* :** :* * * : *

Фиг. 2