

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092647 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.07.08

(22) Дата подачи заявки
2019.05.24

(51) Int. Cl. *A01H 1/02* (2006.01)
A01H 5/10 (2018.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 6/46 (2018.01)
C12Q 1/6895 (2018.01)

(54) РАСТЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНЫ-ВОССТАНОВИТЕЛИ ДЛЯ
ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ G-ТИПА ПШЕНИЦЫ, И
ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 18174269.3

(32) 2018.05.25

(33) EP

(86) PCT/EP2019/063463

(87) WO 2019/224353 2019.11.28

(71) Заявитель:

БАСФ СЕ (DE); КОММОНВЕЛС
САЙЕНТИФИК ЭНД ИНДАСТРИАЛ
РИСЕРЧ ОРГАНИЗЕЙШН (AU)

(72) Изобретатель:

Давей Марк, Якобс Джонни (BE),
Кэвэнах Колин Роберт (AU), Роде
Антъе, Ариядаса Рувини, Верстичеле
Арне, Ван Таурнаут Майкл (BE), Ван
Александр, Барреро Санчез Джозе,
Сингарам Натараджан Асвинкумар,
Сприггс Андрэ, Бовилл Виллиам (AU)

(74) Представитель:

Юрчак Л.С. (KZ)

(57) Описаны способы отбора или получения злакового растения, содержащего функциональный ген-восстановитель для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы и нуклеиновые кислоты и/или полипептиды для использования при этом.

202092647

A1

A1

202092647

Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится в основном к области селекции растений и молекулярной биологии и касается способа отбора или получения злакового растения, содержащего ген-восстановитель для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, и нуклеиновые кислоты для использования в рамках данного изобретения.

Предпосылки создания изобретения

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) является основным признаком, представляющим интерес в отношении зерновых культур, таких как пшеница, в аспекте коммерческого гибридного семеноводства (Kihara, 1951, Cytologia 16, 177-193); Wilson and Ross, Wheat Inf Serv.(Kyoto) 14:29-30, 1962; Lucken, 1987 (Hybrid wheat. In Wheat and wheat improvement. Edited by E.G. Heyne. American Society of Agronomy, Madison, Wis.); Sage, 1976, Adv. Agron. 28, 265–298). Цитоплазмы *Triticum timopheevii* (G-mun) и *Aegilops kotschyi* (K-mun) широко изучены в качестве индукторов мужской стерильности у обыкновенной пшеницы (*Triticum aestivum*), что обусловлено небольшим вредным воздействием (Kaul, Male sterility in higher plants. Springer Verlag, Berlin 1988; Lucken, 1987, ранее; Mukai и Tsunewaki, Theor. Appl. Genet. 54, 1979).

В системах гибридного семеноводства, использующих цитоплазму G-типа, восстановление цитоплазматической мужской стерильности является существенно важной проблемой. Большинство гексаплоидных сортов пшеницы естественным образом не содержат генов восстановления фертильности (“Rf”) (Ahmed et al. 2001, Genes and Genetic Systems 76, 33-38). В сложной системе восстановления T. timopheevii, были отмечены восемь локусов Rf для восстановления фертильности цитоплазматической мужской стерильности цитоплазмы T. timopheevii, и локализации хромосом этих локусов были определены как: Rf1 (Chr 1A), Rf2 (Chr 7D), Rf3 (Chr 1B), Rf4 (Chr 6B), Rf5 (Chr 6D), Rf6 (Chr 5D), Rf7 (Chr 7B) и Rf8 (Tahir & Tsunewaki, 1969, Jpn J Genet 44: 1 - 9; Yen et al., Can. J. Genet. Cytol. 11, 531-546, 1969; Bahl & Maan, Crop Sci. 13, 317-320, 1973; Du et al. Crop Sci, 31: 319-22, Crop 1991; Sinha et al., Genetica 2013, <http://dx.doi.org/10.1007/s10709-013-9742-5>). Ma et al. (Genome 34:727-732,

1991) переносящие локус гена *Rf* от *Aegilops umbellulata* к пшенице; были созданы две независимые линии транслокации с локусом *Rf*, расположенным либо на хромосоме 6AS, либо на хромосоме 6BS (Zhou et al., 2005, *Euphytica* 141(1-2):33-40, doi: 10.1007/s10681-005-5067-5).

Zhang et al., (*Acta Genetica Sinica* 06/2003; 30(5):459-64.) описание *Rf*-локуса, расположенного на 1AS в линии восстановителя 7269-10, при этом генетическое расстояние между SSR-маркером Xgwm136 и этим *Rf*-геном составляет 6,7 см.

В заявках на изобретение WO2017158126A1 и WO2017158128A1 предоставили более точные маркеры для идентификации и отслеживания локуса *Rf1* на хромосоме 1AS, как это представлено, например, в линии пшеницы PI 583676 (Национальная коллекция зерновых культур Министерства сельского хозяйства США).

Geyer et al., (2017, *Molecular Genetics and Genomics*, <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1396-z>, online 11/2017) картировали тот же локус *Rf*, что и *Rf1* в линиях восстановителя R3, R113 и L19, и оценили его влияние в популяциях.

Тем не менее остается необходимость идентификации дополнительных и/или альтернативных *Rf*-генов, которые могут быть использованы для разработки усовершенствованных способов восстановления фертильности пшеницы, содержащей цитоплазму *T. timopheevii*, в том числе путем комбинации с другими идентифицированными *Rf*-генами. Настоящее изобретение вносит свой вклад в уровень техники раскрытием *Rf*-гена из локуса *Rf1* на хромосоме 1A.

Сущность изобретения

В одном воплощении данное изобретение обеспечивает (выделенную (-ые) или модифицированную (-ые)) молекулу(-ы) нуклеиновой кислоты, кодирующую аллель функционального гена- восстановителя фертильности (*Rf*) для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, причем аллель функционального гена- восстановителя представляет собой аллель функционального гена белка пентатрикопептидного повтора (PPR), содержащегося в нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1. Функциональный

ген-восстановитель может содержать нуклеотидную последовательность, выбранную из нуклеотидной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности SEQ ID №: 4 от нуклеотида в положении 55 до нуклеотида в положении 2433; нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности SEQ ID №: 4; или нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности SEQ ID №: 5. Аллель функционального гена-восстановителя может кодировать белок пентатрикопептидного повтора, способный связываться с мРНК гена ORF256, предпочтительно, с нуклеотидной последовательностью, содержащей нуклеотиды (nt) 105 – 121 нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 2, хотя белок пентатрикопептидного повтора может также быть способным взаимодействовать с другими сайтами на гене *orf256*, и/или с другими транскриптами митохондрий или органелл или пептидами, и могут быть получены из нуклеотидной последовательности с номером доступа PI 583676 в базе данных Министерства сельского хозяйства США. Нуклеотидная последовательность SEQ ID № 4 также может быть транскрибирована, по меньшей мере, в 2 раза выше, или, по меньшей мере, в 5 раз выше, или, по меньшей мере, в 10 раз выше в линиях пшеницы с функциональным геном-восстановителем *Rf1*, чем в линиях без гена *Rf1*, хотя в большинстве случаев наблюдаемая разница заключается в значимом обнаружении транскрипции в линиях пшеницы с функциональным геном-восстановителем *Rf1* и отсутствии обнаруживаемой транскрипции в линиях не содержащих ген *Rf1*.

В другом воплощении данного изобретения предлагается (выделенный или модифицированный) полипептид, кодируемый молекулами нуклеиновых кислот, описанными в настоящей заявке, или содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 85% идентичную последовательности аминокислот SEQ ID №: 5, предпочтительно по всей длине полипептида.

В еще одном воплощении данного изобретения предлагается химерный ген, содержащий следующие функционально связанные элементы: (a) экспрессируемый растением промотор; (b) нуклеиновую кислоту, содержащую описанную в настоящей заявке молекулу нуклеиновой кислоты или кодирующую описанный в настоящей заявке полипептид; и, необязательно, (c) функциональную область терминации транскрипции и полиаденилирования в клетках растения, где, по меньшей мере, один из функционально

связанных элементов гетерологичен по отношению, по меньшей мере, к одному другому элементу или содержит модифицированную последовательность. Таким образом, экспрессируемый растениями промотор (a) может быть гетерологичным по отношению к нуклеиновой кислоте, кодирующей описанный в настоящей заявке полипептид (b), или может быть гетерологичным по отношению к области терминации транскрипции и полиаденилирования (c), когда последняя присутствует, или нуклеиновая кислота, кодирующая описанный в настоящей заявке полипептид (b), может быть гетерологичной по отношению к области терминации транскрипции и полиаденилирования (c), когда последняя присутствует. Экспрессируемый растением промотор может быть способен направлять экспрессию функционально связанной нуклеиновой кислоты, по меньшей мере, во время (раннего) развития пыльца и мейоза, например, в пыльнике или, более точно, тапетуме, или развивающихся микроспорах.

Данное изобретение также охватывает информацию о клетках злаковых растений или их семян, таких как клетки растений пшеницы или их семена, содержащие молекулы нуклеиновых кислот или полипептиды или химерные гены, описанные в настоящей заявке, предпочтительно, причем полипептид, нуклеиновая кислота или химерный ген в каждом случае гетерологичны по отношению к клетке растения или растению или семени.

[1] Еще одним воплощением изобретения является способ получения клетки злакового растения или растения или его семени, такого как клетка злакового растения или растение или его семя, содержащего функциональный ген-восстановитель для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, или для повышения способности к восстановлению для цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) G-типа пшеницы в злаковом растении или клетке, таком как растение пшеницы, включающий стадию обеспечения клетки растения или растения молекулами нуклеиновых кислот или химерными генами, описанными в настоящей заявке, причем подразумевается, что стадия обеспечения включает обеспечение путем трансформации, скрещивания, бэкроссирования, геномного редактирования или мутагенеза. Молекулы нуклеиновых кислот или химерные гены могут быть транскрибированы, по меньшей мере, в 2 раза выше.

Данное изобретение далее предусматривает способ получения клетки злакового растения или растения или его семени, такого как клетка растения пшеницы или растения или его семя, с

восстановительной способностью цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, или способ увеличения восстановительной способности для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы в злаковом растении, таком как растение пшеницы, включающий стадии обеспечения или экспрессии или увеличения экспрессии одного или нескольких полипептидов, как описано в настоящей заявке, в клетке растения или растении или семени. Полипептид белка пентатрикопептидного повтора Rf-PPR может быть получен путем модификации генома растения, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты или химерный ген, описанный в настоящем изобретении, причем стадия модифицирования включает модифицирование трансформацией, скрещиванием, бэккроссированием, геномным редактированием или мутагенезом. Далее в настоящей заявке представлена модифицированная нуклеиновая кислота, кодирующая белок пентатрикопептидного повтора Rf-PPR, такой как (модифицированный или выделенный) белок пентатрикопептидного повтора Rf1-PPR-09, в котором указанная нуклеиновая кислота модифицируется путем геномного редактирования или мутагенеза (например, мутагенеза под воздействием этилметансульфоната (EMS)).

Кроме того, предлагается способ для преобразования невосстанавливаемых злаковых растений, таких как растение пшеницы, в восстанавливаемое растение в отношении цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, или для повышения способности к восстановлению для цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) G-типа пшеницы в злаковых растениях, например, в растении пшеницы, включающий стадию модифицирования генома растения для включения молекулы нуклеиновой кислоты, или химерного гена, описанного в настоящей заявке, при котором данная стадия модифицирования включает в себя модифицирование трансформацией, скрещиванием, бэккроссированием, геномным редактированием и мутагенезом.

В другом воплощении предусмотрен способ преобразования невосстанавливаемого злакового растения, такого как растение пшеницы, в восстанавливаемое растение в отношении цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы или для повышения способности восстановления для цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) G-типа пшеницы в злаковом растении, таком как растение пшеницы, включающий стадии модифицирования генома растения для повышения экспрессии полипептидов, как описано в настоящей заявке, в растении.

Данное изобретение также относится к клеткам злаковых растений или злаковым растениям или их семенам, таким как клетки растений пшеницы или растения или семена по настоящему изобретению, полученные в соответствии с описанными в настоящем изобретении способами, предпочтительно в которых растение обладает повышенной способностью к восстановлению для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, предпочтительно, когда описанный полипептид белка пентатрикопептидного повтора Rf-PPR экспрессируется, по меньшей мере, во время (раннего) развития пыльцы и мейоза, например, в пыльнике или, более точно, тапетуме, или развивающихся микроспорах. Клетка растения, растение или семя может быть гибридной клеткой растения, гибридным растением или семенем. В одном воплощении такое растение содержит модифицированную нуклеиновую кислоту Rf1_PPR_09 и/или белок, что приводит к улучшенному восстановлению цитоплазматической мужской стерильности G-типа в злаковом растении, таком как пшеница, по сравнению с восстановлением, полученным с последовательностью нуклеиновых кислот SEQ ID №: 1 или 4 или последовательностью белков SEQ ID №: 5 в указанном растении.

В еще одном воплощении данного изобретения, предлагается способ селекции злаковых растений, содержащий аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы или для производства злакового растения, содержащего аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, включающий стадии (а) идентификации присутствия, экспрессии или транскрипции, таких как анализ транскрипции нуклеотидной последовательности, содержащей нуклеотидные последовательности SEQ ID №: 4 от нуклеотидной позиции 55 до нуклеотидной позиции 2433; и, необязательно, селекции растения, включая экспрессию, или транскрибирование нуклеотидной последовательности.

Данное изобретение также предлагает способ для восстановления фертильности в потомстве злакового растения с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа или для производства потомства фертильных растений из родительского злакового растения с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа, включающий стадии (а) обеспечения популяции потомства растений, полученных от скрещивания женского злакового растения с мужским злаковым растением, при котором женское злаковое родительское растение

является злаковым растением с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа, и при этом мужское родительское растение содержит аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы включающий или транскрибирующий нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 1 (частично) или последовательность SEQ ID №: 4; или, необязательно, (с) селекцию потомства фертильного растения, и, необязательно, (d), размножение потомства фертильного растения.

В качестве другого воплощения данного изобретения предлагается способ идентификации и/или селекции злакового растения (например, пшеницы), содержащего аллель функционального гена-восстановителя цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, включающий стадии (а) идентификации или обнаружения в растении присутствия, экспрессии или транскрипции нуклеиновой кислоты или полипептида белка пентатрикопептидного повтора PPR или химерных генов, как это предусмотрено в настоящем заявке, и, необязательно, селекцию растения, включая, экспрессию или транскрибирование нуклеиновой кислоты или полипептида или химерного гена.

Задачей данного изобретения является также предоставить способ получения злакового растения, такого как растение пшеницы, содержащее аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, включающий стадии (а) скрещивания первого злакового растения, как описано в настоящей заявке со вторым злаковым растением; и (b1) идентифицирование потомства растения, включая экспрессию или транскрибирование аллели функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, включающей нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 4; или (b2) идентифицирование и селекцию потомства растений, включая экспрессию или транскрибирование аллеля функционального гена-восстановителя цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, включая нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 4.

Еще одной задачей изобретения является создание способа получения гибридного семени, включающего стадии: (а) получения мужского родительского зернового растения, такого как растение пшеницы, как это предусмотрено в настоящей заявке, причем данное растение содержит или экспрессирует аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы при этом данный аллель

функционального гена-восстановителя предпочтительно присутствует в гомозиготной форме; (b) обеспечение получения женского родительского злакового растения, которое является растением с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа пшеницы, и (c) скрещивания женского родительского зернового растения с мужским родительским злаковым растением; или (a) обеспечение получения мужского родительского злакового растения, такого как растение пшеницы, в соответствии с данной заявкой, растение, содержащее или экспрессирующее функциональный аллель гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, при котором данный функциональный аллель гена-восстановителя предпочтительно присутствует в гомозиготной форме; (b) обеспечение получения женского родительского злакового растения, которое является злаковым растением с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа пшеницы, (c) скрещивание женского родительского злакового растения с мужским родительским злаковым растением ; и (d) сбор семян.

Данное изобретение также предусматривает использование описанной в настоящей заявке нуклеиновой кислоты для идентификации одного или нескольких дополнительных аллелей функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы.

Кроме того, предусмотрено использование нуклеиновых кислот, полипептидов или химерных генов, как описано в настоящей заявке, для идентификации растения, содержащего и/или экспрессирующего аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы.

Растения, содержащие и/или экспрессирующие функциональный ген-восстановитель для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, как описано в настоящей заявке, могут быть использованы для восстановления фертильности в потомстве злакового растения с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа, такого как растение пшеницы, и/или для получения гибридного семени или популяции гибридных злаковых растений, таких как семя или растения пшеницы.

Краткое описание рисунков

Рис. 1: (а) - прогнозируемая структура гена для идентифицированного гена *Rfl-PPR-09*. @ указывает кодирующую последовательность, # обозначает 5' нетранслируемую область (некодирующий участок мРНК, располагающийся на её 5'-конце после кодирующей области), и * означает 3' нетранслируемую область (В) аминокислотная последовательность идентифицированного гена *Rfl-PPR-09* с указанием транзитного пептида (курсив) и мотивы белка пентатрикопептидного повтора (попеременно подчеркнутый и не подчеркнутый), в том числе 5-я и 35-я аминокислоты подразумевается в распознавании РНК (жирным шрифтом). (С) графическое представление структуры полипептида *Rfl-PPR-09* с мотивами белка пентатрикопептидного повтора.

Рис. 2: средние относительные уровни экспрессии гена *Rfl-PPR-09* в 6 контрастных нулевых парах, каждая из которых содержит/не содержит локус *Rfl*, а также в контрольной линии, не содержащей локус *Rfl*, и в донорской линии *Rfl*. Потомство, содержащее ген *Rfl* было идентифицировано после генотипирования KASP (аллель-специфическая ПЦР) с помощью маркеров тонкого картирования и фенотипирования для подтверждения восстановления фертильности.

Осуществление изобретения

В настоящем изобретении описывается идентификация функционального (*Rf*) гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы (т. е. линий, содержащих цитоплазму *T. timopheevii*), расположенного на хромосоме 1A (короткое плечо 1AS), а также способы обнаружения *Rf*-гена. Эти способы могут быть использованы в маркер-вспомогательной селекции (MAS) злаковых растений, таких как пшеница, содержащей указанные функциональные гены-восстановители, расположенные на хромосомах 1A. Поэтому идентификация данного гена чрезвычайно полезна в способах производства гибридных семян, поскольку она может быть использована, например, в способе восстановления фертильности в потомстве растения, обладающего мужской стерильностью цитоплазмы G-типа, тем самым производя потомство фертильных растений от родительского растения с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа. Аналогичным образом, настоящее раскрытие сущности изобретения также позволяет

идентифицировать растения, лишенные требуемого гена, так что растения, не являющиеся восстановителями, могут быть идентифицированы и, например, исключены из последующих скрещиваний. Идентификация гена-восстановителя, лежащего в основе локуса гена *Rfl* на хромосоме 1AS, далее позволяет целенаправленной инженерии, например, увеличить его экспрессию, или увеличить активность, или направленную комбинацию гена, лежащего в основе локуса гена *Rfl*, с другими локусами-восстановителями или генами.

Еще одно использование знаний о данном гене, лежащем в основе локуса *Rfl*, в селекции растений заключается в содействии восстановлению рекуррентного родительского генотипа путем обратного скрещивания. Обратное скрещивание (бэккроссирование)-это процесс скрещивания потомства с одним из его родителей. Бэккроссирование обычно выполняется с целью интрогрессирования одного или нескольких локусов от родителя-донора в другое требуемое генетическое окружение рекуррентного родителя. Чем больше циклов бэккроссирования выполняется, тем больше генетический вклад рекуррентного родителя в сорт, полученный в результате. Это часто необходимо, потому что родительские растения-доноры могут быть нежелательными по другим причинам, например, из-за низкой урожайности, низкой плодovitости и т.п. Напротив, разновидности, которые являются результатом интенсивных селекционных программ, могут иметь превосходную урожайность, плодovitость или тому подобное, просто не имея одного требуемого признака, такого как восстановление фертильности. Как понимает квалифицированный специалист, бэккроссирование может быть сделано для выбора какого-либо признака или против него (исключения данного признака). Например, в настоящем изобретении можно выбрать ген-восстановитель для размножения линии-восстановителя или можно сделать выбор против гена-восстановителя для размножения линии-закрепителя (женский пул).

Локус *Rfl* на хромосоме 1A был картирован в сегменте по хромосоме 1A, в интервале 15,6 сМ. Дальнейшее тонкое картирование сузило область 1A до интервала 1,9 сМ (с 30,9 до 32,8 сМ по хромосоме 1A) (см. опубликованную заявку согласно Договору о патентной кооперации (РСТ) WO2017/158126 – включена в настоящую заявку по ссылке полностью).

Мужская стерильность применительно к настоящему изобретению означает неспособность или частичную неспособность растений продуцировать функциональную пыльцу или мужские гаметы. Это может происходить из-за естественной или искусственно созданной

генетической предрасположенности или вмешательства человека в растение в данной области. Мужская фертильность, с другой стороны, имеет отношение к растениям, способным производить достаточные уровни функциональной пыльцы и мужских гамет, предпочтительно, нормальные их уровни. Мужская стерильность/фертильность может быть отражена в фертильном/жизнеспособном семени, после самоопыления, например, мешкованием головок, чтобы вызвать самоопыление. Аналогичным образом, восстановление фертильности также можно описать в отношении семян, полученных при скрещивании растения с мужской стерильностью с растением, несущим функциональный ген-восстановитель, по сравнению с семенами, полученными в результате скрещивания (или самоопыления) полностью фертильных растений. Частичная неспособность производить пыльцу или мужские гаметы преимущественно относится к растениям, которые производят менее 20%, менее 15% или менее 10% или даже менее 5% фертильных семян при самоопылении.

Мужское родительское растение или пыльцевое родительское растение -это родительское растение, которое обеспечивает мужские гаметы (пыльцу) для оплодотворения, в то время как женское родительское растение или семенное родительское растение -это растение, которое обеспечивает женские гаметы для опыления, причем указанное женское растение является тем, которое содержит семена.

Цитоплазматическая мужская стерильность или “ЦМС” (“CMS”), в данном контексте, относится унаследованной по материнской линии мужской стерильности на основе цитоплазмы. ЦМС - это полная или частичная мужская стерильность у растений в результате специфических ядерных и митохондриальных взаимодействий и наследуется по материнской линии через цитоплазму. Мужская стерильность-это неспособность или частичная неспособность растений производить функциональные пыльники, пыльцу или мужские гаметы, хотя растения с ЦМС все еще производят жизнеспособные женские гаметы. Частичная неспособность производить пыльцу или мужские гаметы преимущественно относится к растениям, которые производят менее 20%, менее 15% или менее 10% или даже менее 5% фертильных семян при самоопылении. Цитоплазматическая мужская стерильность используется в сельском хозяйстве для производства гибридных семян. Цитоплазматическая мужская стерильность (“ЦМС”) происходит по причине одной или нескольких мутаций в митохондриальном геноме (называемом “стерильной цитоплазмой”) и наследуется как

доминантный, передаваемый по материнской линии признак. Для использования цитоплазматической мужской стерильности в гибридном семеноводстве родительское растение с семенами должно содержать стерильную цитоплазму, а родительское растение с пыльцой должно содержать (ядерные) гены-восстановители (*Rf*-гены) для восстановления фертильности гибридных растений, выращенных из гибридного семени. Соответственно, такие *Rf*-гены предпочтительно являются , по меньшей мере, частично доминантными, наиболее предпочтительно доминантными, чтобы иметь достаточную восстанавливающую способность у потомства.

[2] “Цитоплазматическая мужская стерильность G-типа пшеницы ”, согласно настоящей заявке, относится к цитоплазме *Triticum timopheevii*, которая может передавать мужскую стерильность при введении в обычную пшеницу (т. е. *Triticum aestivum*), в результате чего растение несет ядерные гены обычной пшеницы, но цитоплазму от *T. timopheevii*, которая обладает мужской стерильностью. Цитоплазма *T. timopheevii* (G-тип) в качестве индукторов мужской стерильности у обыкновенной пшеницы широко изучена (Wilson и Ross, 1962, ранее; Kaul, Male sterility in higher plants. Springer Verlag, Berlin. 1988; Lucken, Hybrid wheat. In Wheat and wheat improvement. Edited by E.G. Heyne. American Society of Agronomy, Madison, Wis, 1987; Mukai and Tsunewaki, Theor. Appl. Genet. 54, 153-60, 1979; Tsunewaki, Jpn. Soc. Prom. Sci. (Tokyo), 49-101, 1980 (In: Tsunewaki K. (ed.) Genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*; Tsunewaki et al., Genes Genet. Syst. 71, 293-311, 1996). Происхождение фенотипа ЦМС, передаваемого цитоплазмой *T. timopheevii*, заключается в экспрессии нового химерного гена/транскрипта, называемого *orf256*, который расположен против хода транскрипции от последовательностей *cox1* и котранскрибируется с очевидно нормальным геном *cox1*. Антисыворотка, приготовленная против полипептидных последовательностей, прогнозируемых из нуклеотидной последовательности *orf256*, распознала белок 7-kDa, присутствующий в линии ЦМС, но не в родительских или восстановленных линиях (Song and Hedgcoth, Genome 37(2), 203-209, 1994; Hedgcoth et al., Curr. Genet. 41, 357–365, 2002).

Используемый в настоящем изобретении “аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы” или “локус функционального восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы” или “локус количественного признака восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы” обозначает аллель, который обладает способностью

восстанавливать фертильность в потомстве скрещивания с линией цитоплазматической мужской стерильности G-типа ("ЦМС"), т. е. линией несущей ядерные гены пшеницы обыкновенной, но в тоже время и цитоплазму от *T. timopheevii*. Восстановление против цитоплазмы G-типа было описано, например, Робертсоном и Кёртисом (Crop Sci. 7, 493–495, 1967), Yen et al. (Can. J. Genet. Cytol. 11, 531–546, 1969), Bahl and Maan (Crop Sci. 13, 317–320, 1973), Talaat et al. (Egypt. J. Genet. 2, 195–205, 1973) Zhang et al., (2003, ранее) Ma и Sorrells (1995, ранее), Kojima (1997, supra), Ahmed et al (2001, ранее), Zhou et al (2005, ранее). Такие гены-восстановители или аллели также называются *Rf*-генами и *Rf*-аллелями. Как описано, по меньшей мере, в примерах, ген-восстановитель, описанный в настоящей заявке, также более высоко экспрессируется, особенно в развивающихся колосьях, в линиях пшеницы, идентифицированных как содержащие локус *Rf1*, по сравнению с линиями пшеницы, которые были идентифицированы как не содержащие локус *Rf1* или по сравнению с не восстанавливающимися линиями пшеницы. Средний относительный уровень экспрессии гена-восстановителя в линиях пшеницы, идентифицированных как содержащие восстанавливающий локус *Rf1*, по сравнению со средним относительным уровнем экспрессии гена-восстановителя в линиях пшеницы, идентифицированных как не содержащие восстанавливающий локус *Rf1* (особенно средний относительный уровень экспрессии в развивающихся колосьях), колеблется примерно в 2 раза, по крайней мере, примерно в 25 раз выше, так например, от 7 до 12 раз выше. Обычно это соотношение примерно в 10 раз выше. Ожидается, что уровни белка, кодируемые геном *Rf1*, также увеличиваются в линиях пшеницы, идентифицированных как содержащие восстанавливающий локус *Rf1*, по сравнению с линиями пшеницы, идентифицированными как не содержащие восстанавливающий локус *Rf1*, и могут быть одинаково, по меньшей мере, в 2 раза выше или варьироваться от примерно в 2 раза до, по меньшей мере, примерно в 25 раз выше, так например, от 7 до 12 раз выше.

Термин "закрепитель" относится к растению, которое при скрещивании с растением с цитоплазматической мужской стерильностью не восстанавливает фертильность, а сохраняет стерильность в потомстве. Закрепитель используется для размножения линии ЦМС, а также может относиться к линии, не являющейся восстановителем. Линии закрепителя имеют те же ядерные гены, что и линия ЦМС (т. е. не содержат функциональных *Rf*-генов), но отличаются составом цитоплазматических факторов, вызывающих мужскую стерильность у растений, т. е. закрепители имеют "фертильную" цитоплазму. Поэтому при скрещивании мужской

стерильной линии с ее закрепителем будет получено потомство с тем же мужским стерильным генотипом.

Термин “злак” и “злаковое растение” относится к членам семейства однодольных *Poaceae*, которые культивируются для получения съедобных компонентов зерна. Эти зерна состоят из эндосперма, зародыша и отрубей. Кукуруза, пшеница и рис вместе составляют более 80% мирового производства зерна. Другие представители семейства злаковых растений включают рожь, овес, ячмень, тритикале (гибрид ржи и пшеницы), сорго, дикий рис, пшеницу спельту, эйнкорн (пшеница однозернянка), эммер (пшеница двузернянка), дурум (твердая пшеница) и камут (американская полба). “Женское злаковое растение” или “цитоплазматическое мужское стерильное злаковое растение” - это злаковое растение, содержащее цитоплазму, вызывающую мужскую стерильность, как описано в настоящей заявке.

В одном варианте осуществления злаковое растение согласно изобретению представляет собой злаковое растение, которое содержит, по меньшей мере, геном А или родственный геном, такое как гексаплоидная пшеница (*T. aestivum*; ABD), спельта (*T. spelta*; ABD) дурум (*T. turgidum*; AB), ячмень (*Hordeum vulgare*; H) и рожь (*Secale cereale*; R). В частном варианте воплощения изобретения злаковым растением согласно изобретению является пшеница (*T. aestivum*; ABD).

Особенно полезным анализом для обнаружения SNP-маркеров (однонуклеотидные полиморфные маркеры) является, например, конкурентная аллель KBioscience -специфичная ПЦР (KASP (аллель-специфическая ПЦР (полимеразная цепная реакция)), см. www.krbioscience.co.uk), для разработки KASP-анализа отбираются 70 пар оснований расположенных выше и 70 пар оснований расположенных по ходу транскрипции от SNP (однонуклеотидный полиморфизм) и разрабатываются два аллель-специфичных прямых праймера и один аллель-специфичный обратный праймер. Метод анализа KASP (аллель-специфическая ПЦР) см., например, в Allen *et al.* 2011, Plant Biotechnology J. 9, 1086-1099, особенно стр.1097-1098.

Положение идентифицированных хромосомных сегментов и их маркеров, при выражении в виде частот рекомбинации или единиц хромосомной карты, приводятся в настоящем описании в качестве общей информации. Описанные в настоящей заявке воплощения были

получены с использованием конкретных популяций пшеницы. Соответственно, положения отдельных сегментов и маркеров как единиц хромосомной карты выражаются в отношении к [file://abegens0010.emea.agrogroup.net/personal/bbmto/Personal%20Data/PROJECTS/BCS%2016-200X%20\(Rf\)/](file://abegens0010.emea.agrogroup.net/personal/bbmto/Personal%20Data/PROJECTS/BCS%2016-200X%20(Rf)/) используемым популяциям. Предполагается, что числа, приведенные для конкретных сегментов и маркеров в качестве единиц хромосомной карты, могут варьироваться от сорта к сорту и не являются частью существенного определения сегментов и маркеров ДНК, которые иначе описываются, например, нуклеотидной последовательностью.

Лocus (локусы), используемый (-ые) в настоящем описании, относится (-ятся) к определенному месту или положению в геноме, например, на хромосоме или хромосомном плече, где, например, обнаружен ген или генетический маркер. Лocus количественного признака (QTL), используемый в настоящей заявке, относится к позиции в геноме, которая соответствует измеряемой характеристике, то есть признаку, такому как *Rf*-локусы.

Используемый данным описанием термин “аллель(-и)”, например, в случае “аллель гена”, означает любую из одной или нескольких альтернативных форм гена в определенном локусе. В диплоидной клетке организма аллели данного гена располагаются в определенном месте или локусе (локусах) на хромосоме. Один аллель присутствует на каждой хромосоме пары гомологичных хромосом или, возможно, на гомеологичных хромосомах.

Используемый в настоящем описании термин “гомологичные хромосомы” означает хромосомы, которые содержат информацию в отношении одних и тех же биологических признаков и содержат одни и те же гены в одних и тех же локусах, но, возможно, разные аллели этих генов. Гомологичные хромосомы-это хромосомы, которые образуют пары во время мейоза. “Негомологичные хромосомы”, представляющие все биологические признаки организма, образуют набор, и количество наборов в клетке называется пloidностью. Диплоидные организмы содержат два набора негомологичных хромосом, причем каждая гомологичная хромосома наследуется от другого родителя. У тетраплоидных видов существуют два набора диплоидных геномов, причем хромосомы этих двух геномов называются “гомеологичными хромосомами” (и аналогичным образом локусы или гены этих двух геномов называются гомеологичными локусами или генами). Аналогично, гексаплоидные виды имеют три набора диплоидных геномов и т. д. Диплоидные, тетраплоидные или гексаплоидные виды растений могут содержать большое количество

различных аллелей в определенном локусе. Уровни пloidности одомашненных видов пшеницы варьируют от диплоидных (*T. monococcum*, $2n = 14$, AA), тетраплоидных (*T. turgidum*, $2n = 28$, AABB) до гексаплоидных (*T. aestivum*, $2n = 42$, AABBDD).

[3] Используемый в настоящем описании термин “гетерозиготный” означает генетическое состояние, существующее, когда два различных аллеля находятся в определенном локусе, но расположены индивидуально на соответствующих парах гомологичных хромосом в клетке. И наоборот, используемый в настоящем описании термин “гомозиготный” означает генетическое состояние, существующее, когда два идентичных аллеля находятся в определенном локусе, но расположены индивидуально на соответствующих парах гомологичных хромосом в клетке.

Аллель определенного гена или локуса может иметь определенную пенетрантность, то есть он может быть доминантным, частично доминантным, ко-доминантным, частично рецессивным или рецессивным. Доминантный аллель - это вариант определенного локуса или гена, который, будучи представленный в гетерозиготной форме в организме, приводит к тому же фенотипу, что и в гомозиготной форме. Рецессивный аллель, с другой стороны, является вариантом аллеля, который в гетерозиготной форме подавляется доминантным аллелем, что приводит к фенотипу, присвоенному доминантным аллелем, в то время как только в гомозиготной форме приводит к рецессивному фенотипу. Частично доминантный, кодоминантный или частично рецессивный относится к ситуации, когда гетерозигота отображает фенотип, который является промежуточным между фенотипом организма, гомозиготного по одному аллелю, и организмом, гомозиготным по другому аллелю конкретного локуса или гена. Этот промежуточный фенотип является демонстрацией частичного или неполного доминирования или пенетрантности. При частичном доминировании у потомства обычно наблюдается целый ряд фенотипов. То же самое относится и к частично рецессивным аллелям.

Термин “контиг”, используемый в настоящем описании, относится к набору перекрывающихся сегментов ДНК, которые вместе представляют собой консенсусную область ДНК. В проектах восходящего секвенирования, контиг относится к данным перекрывающиеся последовательности (считывания); в проектах нисходящего секвенирования, контиг относится к перекрывающимся клонам, которые формируют

физическую карту генома, который применяется для секвенирования и сборки. Таким образом, контиги могут относиться как к перекрывающейся последовательности ДНК, так и к перекрывающимся физическим сегментам (фрагментам), содержащимся в клонах, в зависимости от контекста.

В другом воплощении упомянутый аллель функционального гена-восстановителя представляет собой функциональный аллель гена, кодирующего белок пентатрикопептидного повтора (PPR) (т. е. ген белка с пентатрикопептидным повтором), локализующийся в пределах геномной области, описанной в заявке на изобретение WO2017/158126.

Белки пентатрикопептидного повтора классифицируются на основе их доменной архитектуры. Белки пентатрикопептидного повтора Р-класса обладают несколькими каноническими аминокислотными мотивами, обычно состоящими из 35 аминокислотных остатков, хотя мотивы могут варьироваться от 34 до 36 или даже 38 аминокислот. Белки пентатрикопептидного повтора могут содержать митохондриально-нацеленный пептид, но, как правило, не содержат дополнительных доменов. В большинстве аспектов представители этого класса обладают функциями экспрессии генов органоидов. Белки пентатрикопептидного повтора класса PLS имеют три различных типа мотивов белка пентатрикопептидного повтора, которые различаются по длине; Р (35 аминокислот), L (длинные, 35-36 аминокислот) и S (короткие, ~ 31 аминокислота), и представители этого класса, как полагают, в основном задействованы в процессе редактирования РНК. Подтипы класса PLS классифицируются на основе дополнительных С-концевых доменов, которыми они обладают (обзор Manna et al., 2015, *Biochimie* 113, p. 93-99, ссылка включена в заявку).

Большинство генов восстановления фертильности (*Rf*), идентифицированных на сегодняшний день, происходят из небольшой клады генов, кодирующих белки пентатрикопептидного повтора (Fuji et al., 2011, *PNAS* 108(4), 1723-1728 - ссылка включена в заявку). Гены *белков пентатрикопептидного повтора* функционирующие как гены-восстановители фертильности (*Rf*) у Fuji (*ранее*) называются генами *Rf-PPR*. Они состоят в основном из tandemных повторов 15-20 мотивов белка пентатрикопептидного повтора, каждый из которых состоит из 35 аминокислот.

Большинство генов *Rf-PPR* принадлежат к подсемейству *Rf-PPR* класса Р, хотя также были идентифицированы гены *Rf-PPR* класса PLS. Высокие скорости замещения, наблюдаемые для

отдельных аминокислот в пределах иначе высококонсервативных мотивов белка пентатрикопептидного повтора, указывая на дизруптивный отбор, побудили сделать вывод, что эти остатки могут быть непосредственно вовлечены в связывание с мишенями РНК. Это привело к предложению “кода белка пентатрикопептидного повтора”, который позволяет прогнозировать последовательности-мишени РНК естественно присутствующих белков пентатрикопептидного повтора, а также дизайна синтетических белков пентатрикопептидного повтора, которые могут связывать молекулы РНК, представляющие интерес, в соответствии с которым специфичность к последовательности обеспечивается за счет отдельных типов водородных связей между РНК - основанием и аминокислотами с боковыми цепями, присутствующими в положениях 2 и/или 5 и/или 35 в соответствующем мотиве белка пентатрикопептидного повтора (см. мотив в работе Melonek et al., 2016, Nat Sci Report 6:35152, Barkan et al., 2012, PLoS Genet 8(8): e1002910; Barkan and Small 2014, Annu. Rev. Plant Biol. 65:415–442 (<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040159>); Miranda, McDermott, and Barkan 2017, Nucleic Acids Res. 46, 2613–2623 (<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1288>); Shen et al. 2016, Nat. Commun. 7, 11285 (<https://doi.org/10.1038/ncomms11285>); и, особенно, в работе Yagi Y, Hayashi S, Kobayashi K, Hirayama T, Nakamura T (2013) Elucidation of the RNA Recognition Code for Pentatricopeptide Repeat Proteins Involved in Organelle RNA Editing in Plants. PLoS ONE 8(3): e57286. doi:10.1371/journal.pone.0057286, все включены по ссылке).

Соответственно, функциональный аллель гена *Rf-PPR*, в данном контексте, относится к аллелю гена *Rf-PPR*, который является аллелем функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, в соответствии с данным контекстом, т. е. при экспрессировании в (скрещиваемое) злаковое растение обладает способностью восстанавливать фертильность в потомстве при скрещивании со злаковым растением с цитоплазматической мужской стерильностью G типа. Такой функциональный аллель гена *Rf-PPR* также называется геном *PPR-Rf* (или геном *Rf-PPR*), который, в свою очередь, кодирует белок PPR-Rf (или Rf-PPR).

Хотя не предполагается ограничивать изобретение конкретным способом действия, считается, что аллель функционального гена-восстановителя кодирует полипептид, такой как белок пентатрикопептидного повтора (PPR), который обладает способностью (специфично) связываться с митохондриальным транскриптом гена *orf256* (SEQ ID №: 2), ответственным за

фенотип цитоплазматической мужской стерильности. Фенотип цитоплазматической мужской стерильности может быть восстановлен посредством утилизации "мусорных" белков или интерферирующим иным образом с мРНК *orf256*. В контексте данного документа, "связывать с" или "специфично связывать с" или "(специфично) распознавать" означает, что в соответствии с вышеописанным кодом белка пентатрикопептидного повтора белок пентатрикопептидного повтора содержит ряд мотивов белка пентатрикопептидного повтора со специфичными остатками в положениях 5 и 35 и которые упорядочены таким образом, чтобы иметь возможность связываться с мРНК-мишенью, такой как мРНК *orf256*, специфичной для последовательности или предпочтительным для последовательности образом.

В качестве альтернативы аллель функционального гена-восстановителя может кодировать полипептид, такой как белок пентатрикопептидного повтора, который обладает способностью (специфически) связываться с другими митохондриальными мРНК или химерными мРНК, ответственными за летальность пыльцы и фенотип цитоплазматической мужской стерильности. Аллель функционального гена-восстановителя может также кодировать полипептид, такой как белок пентатрикопептидного повтора, который обладает способностью (специфично) связываться с несколькими митохондриальными мРНК, влияя на транскрипцию и т. д. С помощью другого альтернативного способа действия аллель функционального гена-восстановителя может кодировать полипептид, такой как белок пентатрикопептидного повтора, который способен образовывать комплекс с дополнительными взаимодействующими белками, такими как глицин-обогащенный белок (GRP), гексокиназа или DUF-WD40, напрямую деструктурировать или расщеплять *orf256* и/или другие цитотоксические митохондриальные или пластидные мРНК, или ингибировать их транскрипцию, или ингибировать трансляцию цитотоксических химерных пептидов, ответственных за образование полипептида фенотипа цитоплазматической мужской стерильности.

Например, аллель функционального гена-восстановителя может кодировать белок пентатрикопептидного повтора (PPR), содержащий мотивы белка пентатрикопептидного повтора со специфичными остатками в положениях 5 и 35, и таким образом распознавать целевую последовательность в пределах *orf256* митохондриальной РНК. В одном примере прогнозируемая последовательность распознавания Rf1-PPR-09, описанная в настоящей

заявке, может быть определена матрицей вероятностей (как описано в Yagi et al., 2013, ранее) и была найдена 5'-ATTTGTCTATTTTCT-3' (SEQ ID №: 3). Такая последовательность расположена в нуклеотидах 105-121 ниже по ходу транскрипции от иницирующего кодона ATG SEQ ID №: 2 (позиции 192-207 *orf256*). Не намереваясь ограничивать изобретение конкретным способом действия, возможным механизмом действия белка Rf1-PPR-09 может быть блокирование трансляции цитотоксического транскрипта *orf256* и направление транскрипции в сторону транскрипции *coxI*. Известно, что в линии *T. aestivum*, содержащей цитоплазматическую мужскую стерильность G-типа, происходит продуцирование длинных химерных транскриптов мРНК, охватывающих последовательности генов *orf256* и *cox1* в одной химерной мРНК, что приводит к трансляции *orf256* и, следовательно, к продуцированию цитотоксического белка ORF256. В восстановленных линиях *T. aestivum*, содержащих цитоплазматическую мужскую стерильность G-типа, тогда все еще существует транскрипция длинной РНК *orf256* – *coxI*, но больше нет трансляции белка ORF256. Предполагается, что связывание Rf1-PPR-09 с его целевым сайтом предотвращает трансляцию ORF256 в длинную химерную мРНК. (Rathburn HB, & Hedgcoth C, A chimeric open reading frame in the 5' flanking region of *coxI* mitochondrial DNA from cytoplasmic male-sterile wheat., Plant Mol Biol. 1991 May;16(5):909-12.; Song J, & Hedgcoth C., Influence of nuclear background on transcription of a chimeric gene (*orf256*) and *CoxI* in fertile and cytoplasmic male sterile wheats. Genome. 1994 Apr;37(2):203-9.; Song J & Hedgcoth C., A chimeric gene (*orf256*) is expressed as protein only in cytoplasmic male-sterile lines of wheat., Plant Mol Biol. 1994 Oct;26(1):535-9.; Hedgcoth C, el-Shehawi AM, Wei P, Clarkson M, Tamalis D., A chimeric open reading frame associated with cytoplasmic male sterility in alloplasmic wheat with *Triticum timopheevi* mitochondria is present in several *Triticum* and *Aegilops* species, barley, and rye. Curr Genet. 2002 Aug;41(5):357-65)).

Кроме того, белки пентатрикопептидного повтора могут работать в сочетании с другими белками пентатрикопептидного повтора, которые могут кодироваться геном в том же *Rf*-локусе и/или геном, расположенным в любом другом *Rf*-локусе, включая *Rf3*-локус, идентифицируемый на хромосоме 1B (описано в заявке на изобретение WO2017/158127). В одном воплощении ген Rf1_PPR_09 используется в злаковых растениях, таких как растения пшеницы, в комбинации с одним или несколькими локусами *Rf* или генами *Rf*, выбранными из группы *Rf2*, *Rf3*, *Rf4*, *Rf5*, *Rf6*, *Rf7* и *Rf8*; например, в комбинации с *Rf3* и *Rf6*, в комбинации с *Rf3* и *Rf7*, в комбинации с *Rf4* и *Rf6*, в комбинации с *Rf4* и *Rf7* или в

комбинации с *Rf3* и *Rf4*. В одном воплощении такая комбинация *Rf*-локусов или *Rf*-генов с геном *Rf1_PPR-09* изобретения происходит в одном и том же локусе в геноме пшеницы (например, путем транслокации, трансформации или геномной инженерии в один локус).

Функциональный ген-восстановитель или аллель может, например, содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 4 или кодировать полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID №: 5.

Аллель функционального гена-восстановителя может, например, также кодировать белок пентатрикопептидного повтора, имеющий одну или несколько мутаций (вставка, делеция, замещение), которые могут влиять на стабильность мРНК или белка, например, мутацию, которая увеличивает стабильность мРНК или белка, тем самым приводя к повышенной экспрессии белка пентатрикопептидного повтора, особенно во время раннего развития пыльцы и мейоза, например, в пыльнике или, а именно, тапетуме или развивающейся микроспоре.

В одном воплощении аллель функционального гена-восстановителя представляет собой функциональный аллель гена *Rf-PPR*, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 4 от нуклеотидной позиции 55 до 2433, или SEQ ID №: 4, или нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность SEQ ID №: 5. Аллель функционального гена-восстановителя может содержать нуклеотидную последовательность в значительной степени идентичную (как определено в настоящей заявке) нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 4, например, , по меньшей мере, на 85%, 85.5%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичную последовательности SEQ ID №: 4 от нуклеотидной позиции 55 до 2433. Процент идентичности последовательности предпочтительно вычисляется по всей длине нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 4 от нуклеотидной позиции 55 до 2433. Аллель функционального гена-восстановителя также может содержать нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность , по меньшей мере, на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности SEQ ID №: 5. Процент идентичности последовательностей предпочтительно вычисляется по всей длине полипептида SEQ ID №: 5.

В другом воплощении аллель функционального гена-восстановителя является аллелем функционального гена-восстановителя, присутствующим (и производным от него), по меньшей мере, в учётном номере PI 583676 (Национальная коллекция знаков Министерства сельского хозяйства США, также известная как Dekalb 582M и зарегистрированная как US PVP 7400045).

В данном изобретении далее описывается способ получения злакового растения (например, пшеницы), содержащего аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, включающий стадии:

- a. Скрещивание первого злакового растения, содержащего функциональный ген-восстановитель для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, расположенный на хромосоме 1A и у которого нуклеотидная последовательность имеет значительную степень идентичности с последовательностью seq ID №: 4 от нуклеотидной позиции 55 до 2433, или нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в значительной степени идентичную последовательности seq ID №: 5, со вторым растением;
- b. Идентификация (и, необязательно, отбор) потомства растения, содержащего или содержащего и транскрибирующего аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, расположенный на хромосоме 1A, путем идентификации растения-потомка, содержащего, по меньшей мере, нуклеотидную последовательность в значительной степени идентичную последовательности SEQ ID №: 4 от нуклеотидной позиции 55 до 2433, или нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в значительной степени идентичную последовательности SEQ ID №: 5.

Также предложен способ получения злакового растения, содержащего аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, расположенный на хромосоме 1A, включающий стадии:

- c. Скрещивание первого злакового растения, гомозиготного по функциональному гену-восстановителю для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, расположенного на хромосоме 1A и имеющего нуклеотидную

последовательность со значительной степенью идентичности последовательности SEQ ID NO: 4, от нуклеотидной позиции 55 до 2433, или нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность со значительной степенью идентичности последовательности SEQ ID №: 5, со вторым злаковым растением;

- d. Получение растения-потомства, в котором указанное растение-потомство содержит аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, расположенный на хромосоме 1A, определенной на стадии (a).

Вторым злаковым растением может быть растение, лишенное функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, расположенного на хромосоме 1A, включая злаковое растение, не транскрибирующее или экспрессирующее идентифицированный ген-восстановитель.

В еще одном дополнительном воплощении данное изобретение обеспечивает способ получения гибридных семян злаков F1 или гибридных растений злаков F1, включающий стадии:

- a. Обеспечение родительского мужского злакового растения (например, пшеницы), содержащего или содержащего и экспрессирующего аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, расположенный на хромосоме 1A и имеющий нуклеотидную последовательность в значительной степени идентичную последовательности SEQ ID №: 4 от нуклеотидной позиции 55 до 2433, или нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в значительной степени идентичную последовательности SEQ ID №: 5.;
- b. Скрещивание указанного мужского родительского растения с женским злаковым родительским растением (например, пшеницей), причем женское родительское растение представляет собой злаковое растение с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа; и
- c. Необязательно, сбор гибридных семян с указанного скрещивания.

Гибридные семена и растения F1 предпочтительно содержат, по меньшей мере, один маркерный аллель, связанный с аллелем функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, расположенным на хромосоме 1A, как описано в настоящей заявке, и поэтому растения F1, выращенные из данных семян, являются фертильными. Предпочтительно, чтобы мужское родительское растение было гомозиготным по указанному аллелю функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, расположенному на хромосоме 1A.

В приведенном выше способе мужское родительское растение, используемое для скрещивания, может быть отобрано или идентифицировано путем анализа присутствия, транскрипции или экспрессии нуклеотидной последовательности в значительной степени идентичную последовательности SEQ ID №: 4, от нуклеотидной позиции 55 до 2433, или нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в значительной степени идентичную последовательности SEQ ID №: 5.

В настоящем изобретении также предусматривается получение злаковых растений, таких как растения пшеницы, любым из вышеуказанных способов, причем указанное злаковое растение содержит, экспрессирует или транскрибирует нуклеотидную последовательность в значительной степени идентичную последовательности SEQ ID №: 4, от нуклеотидной позиции 55 до 2433, или нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в значительной степени идентичную последовательности SEQ ID №: 5.

Такие растения могут содержать аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы в разном геномном контексте, и могут, например, быть лишены нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 от позиции 1 до 1000 и/или нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1 от позиции 6467 до 7923, или лишены каких-либо из следующих нуклеотидных последовательностей или их комбинаций: нуклеотидная последовательность SEQ ID №: 1 от позиции 1 до 500, нуклеотидная последовательность SEQ ID №: 1 от позиции 1 до 1000, нуклеотидная последовательность SEQ ID №: 1 от позиции 6467 до 7000, нуклеотидная последовательность SEQ ID №: 1 от позиции 7000 до 7500 или нуклеотидная последовательность SEQ ID №: 1 от позиции 7500 до 7923.

Также представлены части, клетки и семена злаковых растений согласно изобретению, содержащие или содержащие и экспрессирующие аллель функционального гена-восстановителя. Растения, части растений, клетки растений и семена данного изобретения также могут быть гибридными растениями, частями растений, клетками растений или семенами.

Также предложен способ определения наличия или отсутствия аллеля функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, расположенного на хромосоме 1A, или его статуса зиготности в биологическом образце злакового растения, включающий предоставление геномной ДНК из указанного биологического образца и анализ указанной ДНК на наличие или отсутствие или статуса зиготности нуклеотидной последовательности в значительной степени идентичной последовательности SEQ ID NO: 4, от нуклеотидной позиции 55 до 2433, или нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в значительной степени идентичную последовательности SEQ ID №: 5.

Также представлен способ идентификации и/или отбора злакового растения, (например, пшеницы) содержащего аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, включающий стадии:

- e. Идентификация или обнаружение в указанном растении присутствия нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность в значительной степени идентичную последовательности SEQ ID №: 4, от нуклеотидной позиции 55 до 2433, или нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в значительной степени идентичную последовательности SEQ ID №: 5, или полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в значительной степени идентичную последовательности SEQ ID №: 5.;
- f. И, необязательно, отбор указанного растения, содержащего указанную нуклеиновую кислоту или полипептид.

Аналогично, идентификация или обнаружение может включать получение биологического образца (например, белка) или геномной ДНК и определение присутствия нуклеиновой

кислоты или полипептида в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники, такими как гибридизация, полимеразная цепная реакция (PCR), полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой (Rt-PCR), саузерн-блоттинг, саузерн-блоттинг секвенированием, методы обнаружения однонуклеотидного полиморфизма (SNP) (например, как описано в настоящей заявке), вестерн-блоттинг, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и т.д. на основе последовательностей, представленных в настоящей заявке.

Данное изобретение также предусматривает использование последовательности (последовательностей) функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, расположенного на хромосоме 1A, для идентификации, по меньшей мере, одного дополнительного маркера, содержащего аллель, связанный с указанным функциональным геном-восстановителем для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, расположенный на хромосоме 1A. Такие маркеры также генетически связаны или тесно связаны с геном-восстановителем, а также входят в рамки объема данного изобретения. Маркеры могут быть идентифицированы любым из множества методов генетического или физического картирования. Методы определения связаны ли маркеры генетически с геном-восстановителем известны специалистам в данной области техники и включают, например, интервальное картирование (Lander и Botstein, (1989) *Genetics* 121:185), регрессионное картирование (Haley и Knott, (1992) *Heredity* 69:315) или картирование MQM (картирование множественных локусов количественного признака (QTL)) (Jansen, (1994) *Genetics* 138:871), rMQM картирование (ограниченное картирование множественных локусов количественного признака). Кроме того, для идентификации и выделения дополнительных последовательностей, полезных в качестве маркеров в контексте настоящего изобретения, могут быть использованы такие методы физического картирования, как "прогулка по хромосоме" (метод скрининга аллельных локусов гена), картирование и сборка контига, ампликонное ресеквенирование, транскриптомное секвенирование, целевой захват и секвенирование, секвенирование следующего поколения и т.п.

Для идентификации растения, содержащего указанный функциональный ген-восстановитель данное изобретение также предусматривает использование нуклеотидной последовательности в значительной степени идентичной последовательности SEQ ID №: 4, от

нуклеотидной позиции 55 до 2433, или нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в значительной степени идентичную последовательности SEQ ID №: 5, или использование полипептида в значительной степени идентичного аминокислотной последовательности SEQ ID №: 5.

Также предусмотрено использование растения, полученного любым из описанных в настоящей заявке способов и содержащего, по меньшей мере, один маркерный аллель, связанный с функциональным геном-восстановителем для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, расположенного на хромосоме 1A, как описано в настоящей заявке, для восстановления фертильности в потомстве злакового растения с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа, такого как растение пшеницы, или для получения популяции гибридных злаковых растений, таких как растения пшеницы.

Далее представлена рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, особенно рекомбинантная молекула ДНК, которая содержит функциональный ген-восстановитель, как описано в настоящей заявке. В одном воплощении рекомбинантная молекула ДНК содержит экспрессируемый растением промотор, предпочтительно гетерологичный растительный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью в значительной степени идентичной, как определено в настоящем описании, нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 4 от нуклеотидной позиции 55 до 2433, или нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 4, или кодирующей полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в значительной степени идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID №: 5. Рекомбинантная молекула ДНК может, необязательно, содержать область терминации транскрипции и полиаденилирования, преимущественно функциональную в клетках растения. Кроме того, предусмотрен ДНК-вектор, содержащий рекомбинантную ДНК. Рекомбинантная молекула ДНК или ДНК-вектор может быть выделенной или модифицированной молекулой нуклеиновой кислоты. ДНК, содержащая функциональный ген-восстановитель, может находиться в микроорганизме, таком как бактерия (например, *Agrobacterium* или *E. coli*).

Термин "гетерологичный" относится к отношениям между двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот или белков, которые получены из разных источников. Например, промотор гетерологичен по отношению к функционально связанной

последовательности нуклеиновых кислот, такой как кодирующая последовательность, если такая комбинация обычно не встречается в природе. Кроме того, определенная последовательность может быть "гетерологичной" по отношению к клетке или организму, в который она встроена (т.е. не встречается в природе в этой конкретной клетке или организме). В одном воплощении термин "гетерологичный", используемый в настоящем описании по отношению к нуклеиновой кислоте или белку, встречающемуся в определенном виде растения, также включает нуклеиновую кислоту или белок, последовательность которых была модифицирована или мутирована по сравнению с ранее существующей последовательностью нуклеиновой кислоты или белка, встречающихся в указанном виде растения. Следовательно, после делеции, добавления или замены одного или нескольких нуклеотидов в нуклеиновой кислоте или одной или нескольких аминокислотах в последовательности белка, встречающегося в растении пшеницы (например, модифицирование нативного промотора для включения регуляторных элементов, усиливающих транскрипцию, таких как энхансерный элемент, или модифицирование нативного промотора путем инактивации или удаления определенных негативных регуляторных элементов, таких как репрессорные элементы или целевые сайты для малых некодирующих молекул РНК (микроРНК, miRNAs) или длинных некодирующих РНК (днкРНК, lncRNAs)), такая модифицированная нуклеиновая кислота или белок также считаются гетерологичными растению пшеницы или функционально связанным последовательностям.

Аллель функционального гена-восстановителя может также кодировать белок пентатрикопептидного повтора, имеющий мутацию в α -спиральном домене мотива белка пентатрикопептидного повтора, например, мутацию, которая влияет на образование "шпильки" между двумя α -спиралями, составляющими мотив белка пентатрикопептидного повтора.

Аллель функционального гена-восстановителя может также кодировать белок пентатрикопептидного повтора, имеющий мутацию, которая влияет на димеризацию белка пентатрикопептидного повтора. Например, было обнаружено, что белок 'Thylakoid assembly 8' (тилакоидная сборка 8) (THA8) представляет собой РНК-связывающий белок пентатрикопептидного повтора (PPR), необходимый для сплайсинга транскрипта *usf3*, гена, участвующего в биогенезе тилакоидных мембран хлоропластов. THA8 формирует

асимметричный димер, однократно связанный с одноцепочечной РНК, причем связанная РНК находится на границе раздела димеров. Это образование димерного комплекса опосредовано N-концевыми мотивами белка пентатрикопептидного повтора 1 и 2 и C-концевыми мотивами 4 и 5 (Ke et al., 2013, *Nature Structural & Molecular Biology*, 20, 1377–1382).

Аллель функционального гена-восстановителя может также кодировать белок пентатрикопептидного повтора, который при экспрессии нацелен на митохондрию или другой органоид. Это может достигаться, например, наличием (растительно-функциональной) последовательности с митохондриальной нацеленностью или митохондриального сигнального пептида, или митохондриального транзитного пептида или другого сигнала нацеленности на органоиды. Сигнал митохондриальной нацеленности представляет собой пептид длиной 10-70 аминокислот, который направляет недавно синтезированный белок в митохондрии, обычно находящийся на N-конце. Митохондриальные транзитные пептиды богаты положительно заряженными аминокислотами, но обычно не имеют отрицательных зарядов. Они обладают способностью образовывать амфипатические α -спирали в неводных средах, таких как мембраны. Сигналы митохондриальной нацеленности могут содержать дополнительные сигналы, которые впоследствии нацеливают белок на различные области митохондрий, такие как митохондриальный матрикс. Как и сигнальные пептиды, сигналы митохондриальной нацеленности расщепляются после завершения целенаправленного воздействия. Митохондриальные транзитные пептиды - это пептиды, например, которые описаны в работах: Shewry и Gutteridge (1992, *Plant Protein Engineering*, 143-146, и ссылки в тексте), Sjoling и Glaser (*Trends Plant Sci* том 3, выпуск 4, 1 апреля 1998 г., стр. 136-140), Pfanner (2000, *Current Biol*, том 10, выпуск 11, стр. R412-R415), Huang et al (2009, *Plant Phys* 150(3): 1272–1285), Chen et al. (1996, *PNAS*, т. 93, стр. 11763-11768), Fujii et al. (*Plant J* 2016, 86, 504–513). Аминокислотная последовательность SEQ ID №: 5 от позиции 1 до 48 является примером такой митохондриально-нацеленной последовательности.

В другом воплощении указанный аллель функционального гена-восстановителя, кодируемый указанной (выделенной) молекулой нуклеиновой кислоты, можно получить из нуклеотидной последовательности с учётным номером PI 583676 в базе данных Министерства сельского хозяйства США.

Также представлен (выделенный или модифицированный) полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, как описано выше, причем данный полипептид является функциональным восстановителем белка для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы или содержит аминокислотную последовательность в значительной степени идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID №: 5.

Аллель функционального гена-восстановителя также может быть клонирован и может быть получен химерный ген, например, путем функционального связывания экспрессируемого растением промотора с аллелем функционального гена-восстановителя и, необязательно, 3' - концевой областью, участвующей в терминации транскрипции и функциональном полиаденилировании в растениях. Такой химерный ген может быть введен в растительную клетку, и растительная клетка может быть регенерирована в целое растение для производства трансгенного растения. В одном аспекте трансгенное растение является злаковым растением, таким как пшеница, в соответствии с любым хорошо известным в данной области методом.

Таким образом, в частном случае воплощения данного изобретения предусмотрен химерный ген, содержащий (выделенную или модифицированную) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую аллель функционального гена-восстановителя, как описано выше, функционально связанную с гетерологичным экспрессируемым растением промотором и, необязательно, 3' - концевой областью и областью полиаденилирования.

Использование такой (выделенной или экстрагированной или модифицированной) молекулы нуклеиновой кислоты и/или такого химерного гена и/или такого фрагмента хромосомы для получения клеток растений и растений, содержащих аллель функционального гена-восстановителя включено в настоящее описание. В одном аспекте она может быть использована для получения трансгенных клеток злаковых растений (например, пшеницы), и частей растений или семян, содержащих аллель функционального гена-восстановителя, и растения, обладающего способностью восстанавливать фертильность против цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, как описано выше.

Хозяин или клетка-хозяин, такие как клетка растения (злакового) или растение (злаковое) или его семя, такие как клетка растения пшеницы или растение пшеницы или его семя, включая (выделенную или модифицированную) молекулу нуклеиновой кислоты, (выделенный или

модифицированный) полипептид, или химерный ген, как описано выше, при этом предпочтительно, вышеуказанный полипептид, вышеуказанная нуклеиновая кислота, или вышеуказанный химерный ген в каждом случае являются гетерологичными по отношению к вышеуказанному растению, клетке растения или семени, или модифицированными. Клетка-хозяин также может быть бактерией, такой как *E. coli* или *Agrobacterium sp.*, как *A. tumefaciens*.

Таким образом, предложен также способ получения клетки злакового растения или растения или его семени, таких как клетка растения пшеницы или растение пшеницы или его семя, включающие функциональный ген-восстановитель для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, или способ для повышения способности к восстановлению для цитоплазматической мужской стерильности (“ЦМС”) G-типа пшеницы в злаковых растениях, например, растениях пшеницы, включающий стадии обеспечения указанной клетки растения или растения выделенной или модифицированной молекулой нуклеиновой кислоты, или химерным геном, как описано в настоящей заявке, при котором такое обеспечение включает в себя трансформацию, скрещивание, бэккроссирование, геномное редактирование или мутагенез. Способность к восстановлению, используемая в настоящем контексте, означает способность растения восстанавливать фертильность в потомстве скрещивания с линией цитоплазматической мужской стерильности G-типа. Предпочтительно, чтобы указанное растение экспрессировало или имело повышенную экспрессию полипептида согласно данному изобретению. Предпочтительно, указанная (увеличенная) экспрессия происходит, по крайней мере, во время (ранних фаз) развития пыльцы и мейоза, например, в пыльнике или, более точно, тапетуме, или развивающихся микроспорах (при которой указанное растение не экспрессировало или в меньшей степени экспрессировало полипептид до стадии обеспечения).

Таким образом, также предусмотрен способ получения клетки злакового растения или растения или его семени, такого как клетка растения пшеницы или растение или его семя, со способностью к восстановлению для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, или способ увеличения способности к восстановлению для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы в злаковом растении, таком как растение пшеницы, включающий стадии увеличения экспрессии (выделенного или модифицированного) полипептида, как описано в настоящей заявке, в указанной клетке растения или растении или

семени. Предпочтительно, указанное (увеличение) экспрессии происходит, по меньшей мере, во время (ранних фаз) развития пыльца и мейоза, например, в пыльнике или, более точно, тапетуме, или развивающихся микроспорах. До стадии экспрессии или увеличения стадии экспрессии указанное растение не экспрессировало или в меньшей степени экспрессировало полипептид и/или не обладало или в меньшей степени обладало способностью к восстановлению для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы. В одном воплощении экспрессия полипептида, как описано в настоящей заявке, повышается путем инженерии нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид-восстановитель, в том числе путем преднамеренной модификации нуклеотидной последовательности гена, кодирующего полипептид-восстановитель, такой как увеличение числа копий гена, вставка модификаций, которые повышают стабильность РНК, транскрибируемой из данного гена, или полипептида, экспрессируемого из данного гена, модификаций области против хода транскрипции/области промотора, модификаций области терминации транскрипции и полиаденилирования и т.д.

Увеличение экспрессии может быть произведено путем как обеспечения растения (рекомбинантным) фрагментом хромосомы или (выделенной или модифицированной) молекулой нуклеиновой кислоты или химерным геном, как описано в настоящей заявке, при котором нуклеиновая кислота, кодирующая аллель функционального гена-восстановителя находится под контролем соответствующих регуляторных элементов, таких как промотор, управляющий экспрессией в нужные ткани/клетки, так и на обеспечении растения факторами транскрипции, например, (специфично) распознают область промотора и провоцируют транскрипцию, такие как TAL-эффекторы, белок dCas (каталитически неактивный), белок dCpf1 (каталитически неактивный Cpf1) и т. д. в сочетании с транскрипционными энхансерами.

Далее описан способ преобразования злаковых растений, таких как пшеница, не имеющий возможности для восстановления фертильности в потомстве скрещивания с линией цитоплазматической мужской стерильности G-типа (растение не восстановитель) в растение, обладающее способностью восстанавливать фертильность в потомстве скрещивания с линией цитоплазматической мужской стерильности G-типа (растение-восстановитель), включающий стадии модифицирования генома указанного растения, для включения (или включения и экспрессирования) в (выделенные или модифицированные) молекулы нуклеиновой кислоты

или химерный ген, кодирующий аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, как описано в настоящей заявке, отличающийся тем, что модификация включает в себя трансформацию, скрещивание, бэккроссирование, геномное редактирование или мутагенез. Предпочтительно, указанное растение экспрессирует полипептид согласно данному изобретению, в частности, по меньшей мере, во время (ранних фаз) развития пыльца и мейоза, например, в пыльнике или, более точно, тапетуме, или развивающихся микроспорах. До указанной модификации указанное растение не экспрессировало или в меньшей степени экспрессировало полипептид и/или не обладало или в меньшей степени обладало способностью к восстановлению для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы.

Также предоставляется способ преобразования невосстанавливающего злакового растения, такого как растение пшеницы, в восстанавливающее растение для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы или для повышения способности к восстановлению для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы в злаковом растении, таком как растение пшеницы, включающий стадии модификации генома указанного растения для повышения экспрессии полипептида согласно данному изобретению в указанном растении. Предпочтительно, указанное (увеличение) экспрессии происходит, по меньшей мере, во время (ранних фаз) развития пыльца и мейоза, например, в пыльнике или, более точно, тапетуме, или развивающихся микроспорах. До указанной модификации указанное растение не экспрессировало или в меньшей степени экспрессировало полипептид и/или не обладало или в меньшей степени обладало способностью к восстановлению для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы.

Модификация генома для увеличения экспрессии полипептида может быть, например, выполнена как путем модификации нативного промотора для включения регуляторных элементов, которые увеличивают транскрипцию, таких как определенный энхансерный элемент, так и путем инактивации или удаления определенных негативных регуляторных элементов, таких как репрессорные элементы или целевые сайты для микроРНК или днкРНК. *Rf1* 5' область против хода транскрипции в том числе промоутер включается в последовательность SEQ ID № 1 против хода транскрипции от нуклеотида 3616.

Также описана клетка растения или растение, предпочтительно клетка злакового растения или злаковое растение или его семя, такие как клетка растения пшеницы или растение пшеницы или его семя, полученное в соответствии с любым из вышеуказанных способов, предпочтительно в котором указанное растение имеет повышенную способность к восстановлению для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы в сравнении с указанным растением до стадии обеспечения или стадии модификации. Описано также использование такого растения, полученного в соответствии с вышеуказанными способами, для восстановления фертильности в потомстве скрещивания с растением с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа или для получения гибридных растений или гибридного семени. Такая клетка растения, растение или семя может быть гибридной клеткой растения, растением или семенем.

Геномное редактирование, используемое в данном изобретении, относится к направленной модификации геномной ДНК с использованием специфичных для последовательности (сиквенс-специфичных) ферментов (таких как эндонуклеаза, нуклеазы, ферменты конверсии оснований) и/или донорных нуклеиновых кислот (например, двухцепочечной ДНК, олиго) для внесения желаемых изменений в ДНК. Нуклеазы, специфичные для последовательности, которые могут быть запрограммированы для распознавания определенных последовательностей ДНК включают мегануклеазы (MGNs), цинк-пальцевые нуклеазы (ZFNs), TAL-эффекторные нуклеазы (TALENs) и РНК-или ДНК-направленные (гидовые) нуклеазы такие как Cas9, Cpf1, CasX, CasY, C2c1, C2c3, определенных систем основанных на специфическом белке Аргонавт (Argonaut) (см., например, Osakabe и Osakabe, *Plant Cell Physiol.* 2015 Mar; 56(3):389-400; Ma et al., *Mol Plant.* 2016 Jul 6;9(7):961-74; Bortesi et al., *Plant Biotech J.* 2016, 14; Murovec et al., *Plant Biotechnol J.* 15:917-926, 2017; Nakade et al., *Bioengineered* Vol 8, No.3: 265–273, 2017; Burstein et al., *Nature* 542, 37–241; Komor et al., *Nature* 533, 420–424, 2016; все включены по ссылке). Донорные нуклеиновые кислоты могут быть использованы в качестве матрицы для репарации разрыва ДНК, индуцированного нуклеазой, специфичной для последовательности, и также могут быть использованы как таковые для направленного воздействия на гены (без индукции разрыва ДНК) для введения желаемого изменения в геномную ДНК.

Соответственно, используя эти технологии, растения, лишенные функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы (не

восстанавливающиеся растения), могут быть преобразованы в восстанавливающие растения путем внесения желаемых изменений в существующие гены *Rf-PPR* или в альтернативном варианте путем введения одной или нескольких полных последовательностей, кодирующих функциональные белки *Rf-PPR*, например, как описано в настоящей заявке, в определенной локализации в геноме.

Мутагенез, в контексте настоящей заявки, относится, например, к мутагенезу, индуцированному этилметансульфонатом (EMS) или радиационно-индуцированному мутагенезу и т. п.

Воплощением настоящего изобретения также являются трансгенные клетки злаков, например, трансгенные клетки пшеницы, содержащие в своем геноме (выделенную или модифицированную) молекулу нуклеиновой кислоты, в соответствии с описанием, или химерный ген, в соответствии с описанием, содержащий аллель функционального гена-восстановителя, в соответствии с описанием. В одном аспекте молекула ДНК, содержащая *Rf*-аллель, стабильно интегрирована в геном злаков (например, пшеницы).

Таким образом в настоящем описании представлены злаковые растения, части растений, клетки растений или их семена, особенно пшеница, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению или полипептид согласно изобретению или химерный ген согласно изобретению, кодирующий функциональный ген-восстановитель согласно изобретению, причем указанное растение обладает способностью восстанавливать фертильность против цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы. В одном воплощении молекула нуклеиновой кислоты, полипептид или химерный ген гетерологичны растению, такому как трансгенные злаковые растения или трансгенные растения пшеницы. Оно также включает клетки растения или клеточные культуры, содержащие такую молекулу нуклеиновой кислоты, полипептид или химерный ген, независимо от того, были ли они введены трансгенными методами или методами селекции. Данные клетки, например, *in vitro* и клетки, которые могут быть регенерированы в растения, содержащие фрагмент хромосомы или молекулу нуклеиновой кислоты или химерный ген данного изобретения. Указанные растения, части растений, клетки растений и семена также могут быть гибридными растениями, частями растений, клетками растений или семенами.

Такие растения также могут быть использованы в качестве мужского материнского растения в способе получения гибридных семян F1 или гибридных растений F1, как описано выше.

Экспрессируемый растением промотор, используемый в настоящей заявке, может быть любым промотором, который стимулирует достаточную экспрессию, по меньшей мере, во время (раннего) развития пыльцы и мейоза, например, в пыльнике или, более точно, в тапетуме или развивающейся микроспоре. Это может быть, например, конститутивный промотор, индуцируемый промотор, а также специфичный/предпочтительный для пыльцы, пыльника, тапетума или микроспоры промотор.

Конститутивный промотор-это промотор, способный направлять высокие уровни экспрессии в большинстве типов клеток (пространственно-временным независимым образом). Примеры конститутивных промоторов растений, экспрессируемых растениями включают промоторы бактериального происхождения, такие как октопинсинтаза (OCS) и нопалинсинтаза (NOS) промоторы их агробактерий, а также промоторы вирусного происхождения, таких, как промоторы вируса мозаики цветной капусты (CaMV) 35S-транскрипт (Hapster et al., 1988, Mol. Gen. Genet. 212: 182-190) или гены 19S PHK (Odell et al., 1985, Nature. 6;313(6005):810-2; U.S. Pat. No. 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al., 1989, EMBO J. 8:2195-2202), усиленный промотор 2x35S (Kay et al., 1987, Science 236:1299–1302; Datla et al. (1993), Plant Sci 94:139–149) промоторы вируса мозаики маниоки (cassava vein mosaic virus) (CsVMV; WO 97/48819, US 7,053,205), 2xCsVMV (WO2004/053135) промотор цирковируса (AU 689 311), промотор бациллоформного вируса сахарного тростника (ScBV) (Samac et al., 2004, Transgenic Res. 13(4):349-61), промотор вируса мозаики норичника (FMV) (Sanger et al., 1990, Plant Mol Biol. 14(3):433-43), промотор вируса клевера подземного № 4 или № 7 (WO 96/06932) и усиленный 35S промотор как описано в US 5,164,316, US 5,196,525, US 5,322,938, US 5,359,142 и US 5,424,200. Среди промоторов растительного происхождения следует упомянуть промоторы генов малой субъединицы рибулоза-бискарбоксилазы/оксигеназы растения (Rubisco) (US 4,962,028; WO99/25842) из индийской кукурузы (*Zea mays*) и подсолнечника, промотора гена гистона H4 *Arabidopsis thaliana* (Chabouté et al., Plant Mol. Biol. 8, 179-191, 1987), промоторы убиквитина (Holtorf et al., 1995, Plant Mol. Biol. 29:637-649, US 5,510,474) кукурузы, риса и сахарного тростника, промотор рисового актина -1 (Act-1, US 5,641,876), промоторы гистонов, описанные в EP 0 507 698 A1, промотор кукурузной алкогольдегидрогеназы 1 (Adh-1) (от <http://www.patentlens.net/daisy/promoters/242.html>)). Также можно использовать

промотор малой субъединицы из хризантемы (*Chrysanthemum*), если это использование сочетается с использованием соответствующего терминатора (Outchkourov et al., *Planta*, 216: 1003-1012, 2003).

Примеры индуцируемых промоторов включают промоторы, регулируемые применением химических соединений, включая промоторы, регулируемые спиртами (см., например, EP637339), промоторы, регулируемые тетрациклином (см., например, US 5464758), промоторы, регулируемые стероидами (см., например, US5512483; US6063985; US6784340; US6379945; WO01/62780), промоторы, регулируемые металлами (см., например, US4601978), а также промоторы, регулируемые развитием.

Промоторы активные в пыльце/микроспорах включают, например, промотор специфичный для пыльцы кукурузы (см., например, Guerrero (1990) *Mol. Gen. Genet.* 224:161-168), PTA29, PTA26 и PTA1 3 (например, см. U.S. Pat. No. 5,792,929) и, как описано, например, у Baerson et al. (1994 *Plant Mol. Biol.* 26: 1947-1959), специфичный для микроспор промотор NMT19, как описано, например, в заявке W097/30166. Дополнительные специфичные для пыльников или пыльцы промоторы описаны, например, в Khurana et al., 2012 (*Critical Reviews in Plant Sciences*, 31: 359-390), WO2005100575, WO 2008037436. Другими подходящими промоторами являются, например, промотор ячменя *vtn1*, описанный в работе Alonso-Peral et al. (2001, *PLoS One*. 2011;6(12):e29456).

Примеры тканеспецифичных промоторов включают меристемспецифичные промоторы, такие как промотор OSH1 риса (Sato et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8117-8122) промотор металлотеина риса (BAD87835.1) промоторы WAK1 и WAK2 (Wagner & Kohorn (2001) *Plant Cell* 13(2): 303-318, специфичный для ткани колоса промотор D5 из ячменя (US6291666), промотор Lem2, специфичный для цветковой чешуи в колосе/чешуи из ячменя (Abebe et al. (2005) *Planta*, 221, 170-183), промотор *Pvrn1*, специфичный для раннего соцветия из ячменя (Alonso Peral et al. 2011, *PLoS ONE* 6(12) e29456), промотор *Pcrs4/PrA2*, специфичный для раннего соцветия из ячменя (Koppolu et al. 2013, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 110(32), 13198-13203), меристемспецифичный промотор *pkn1* с интроном *Act1* из риса (Zhang et al., 1998, *Planta* 204: 542-549, Postma-Haarsma et al. 2002, *Plant Molecular Biology* 48: 423-441), промотор, специфичный для SAM/соцветий из рода *Dendrobium* sp. *Pdomads1* (Yu et al. 2002, *Plant Molecular Biology* 49: 225-237).

Становится ясно, что идентифицированные в настоящей заявке нуклеиновые кислоты и полипептиды могут быть использованы для идентификации дальнейших функциональных генов-восстановителей для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы. Таким образом, данное изобретение также предусматривает использование выделенных или модифицированных нуклеиновых кислот или полипептидов, как описано в настоящей заявке, таких как последовательность SEQ ID № 4, для идентификации одного или нескольких дополнительных функциональных генов-восстановителей для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы.

Кроме того, гомологичные или со значительной степенью идентичности функциональные гены-восстановители могут быть идентифицированы с использованием методов, известных в данной области техники. Гомологичная нуклеотидная последовательность может быть идентифицирована и выделена путем гибридизации в жестких или очень жестких условиях с использованием в качестве зондов нуклеиновой кислоты, содержащей, например, нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 4 или ее часть, как описано в настоящей заявке. Другие последовательности, кодирующие функциональные гены-восстановители, также могут быть получены путем амплификации ДНК с использованием олигонуклеотидов, специфичных для генов, кодирующих функциональные гены-восстановители, в качестве праймеров, но не ограничиваясь ими, таких как, олигонуклеотиды, содержащие или состоящие из 20-50 последовательных нуклеотидов из последовательности SEQ ID №: 4 или ее комплемента. Гомологичные или со значительной степенью идентичности функциональные гены-восстановители могут быть идентифицированы методом компьютерного моделирования *in silico* с помощью гомологического поиска нуклеотидных или аминокислотных последовательностей с использованием средства поиска основного локального выравнивания (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST), как это предусмотрено в настоящей заявке.

Функциональность генов-восстановителей или аллелей, таких как определены выше, может быть валидирована, например, путем трансформации или скрещивания, такого гена-восстановителя под контролем экспрессируемого растением промотора в злаковом растении (пшеница), которое не обладает способностью к восстановлению фертильности потомства растения пшеницы с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа, скрещивая, таким

образом созданное злаковое растение с растением с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа пшеницы и оценивая образование семян в потомстве. Альтернативно, линия восстановителя может быть преобразована с помощью конструкции РНК-интерференции RNAi или генно-отредактирована, например, с помощью технологии CRISPR-Cas или любой другой специфичной для последовательности нуклеазы, чтобы генерировать вариант потери функции, который делает растение невосстанавливающим фертильность. Аналогичным образом, другие способы мутации гена-восстановителя (например, индуцированная этилметансульфонатом (EMS) или гамма - излучением) могут быть использованы для оценки влияния мутации потери функции на способность к восстановлению.

В любом из описанных в настоящей заявке воплощений и аспектов растение может содержать или может быть выбрано для включения или может быть обеспечено дополнительным функциональным геном-восстановителем цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы (расположенным на той же или другой хромосоме или доступным из нее), таким как *Rf2* (7D), *Rf3* (1B), *Rf4* (6B), *Rf5* (6D), *Rf6* (5D), *Rf7* (7B), *Rf8*, 6AS или 6BS (Tahir & Tsunewaki, 1969, supra; Yen et al, 1969, ранее; bahl & Maan, 1973, ранее; du et al., 1991, ранее; sihna et al., 2013, ранее; ma et al., 1991, ранее; Zhou et al., 2005, ранее).

[4] Любой из описанных в настоящей заявке способов, маркеров и маркерных аллелей, нуклеиновых кислот, полипептидов, химерных генов, растений также может быть использован для восстановления фертильности против цитоплазмы Sv-типа, как, например, описано в Ahmed et al 2001 (ранее). Данные способы, нуклеиновые кислоты, полипептиды, химерные гены также могут быть полезны для восстановления фертильности против другой индуцирующей мужскую стерильность идиоплазмы пшеницы или других злаков.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Используемый в настоящей заявке термин “химерный ген” относится к конструкции нуклеиновых кислот, которая обычно не встречается у каких-либо видов растений. Химерная конструкция нуклеиновой кислоты может быть ДНК или РНК конструкцией. “Химерная ДНК-конструкция” и “химерный ген” используются взаимозаменяемо для обозначения гена, в котором промотор или одна или несколько других регуляторных областей, таких как

область терминации транскрипции и полиаденилирования данного гена, не связаны в природе с частью или всей транскрибируемой областью ДНК, или гена, который присутствует в локусе в геноме растения, в котором он не встречается естественным образом, или присутствует в растении, в котором он не встречается естественным образом. Другими словами, ген и функционально связанная регуляторная область, или ген и геномный локус, или ген и растение гетерологичны по отношению друг к другу, т. е. они не встречаются естественным образом вместе. Это включает в себя ситуацию, когда один или несколько регуляторных элементов (таких как промотор или 3'-концевая область и область полиаденилирования) или кодирующая область гена пшеницы (например, гена *Rf1_PPR_09* настоящего изобретения) являются модифицированной нуклеиновой кислотой (поскольку она обычно не встречается в пшенице и гетерологична элементам гена, с которыми она функционально связана).

Первая нуклеотидная последовательность “функционально связана” со второй последовательностью нуклеиновых кислот, когда первая последовательность нуклеиновых кислот находится в функциональной связи со второй последовательностью нуклеиновых кислот. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. При рекомбинантном производстве функционально связанные последовательности нуклеиновых кислот обычно являются перекрывающимися и, при необходимости, соединяют две кодирующие белок области в одной и той же рамке считывания (например, в полицистронной открытой рамке считывания (ORF)). Однако чтобы быть функционально связанными нуклеиновые кислоты не обязательно должны быть перекрывающимися.

[5] “Бэкроссирование” относится к методу селекции, с помощью которого (единичный) признак, такой как восстановление фертильности (*Rf*), может быть перенесен из одного генетического фона (“донора”) в другой генетический фон (также называемый “рекуррентным родителем”), например, растение, не содержащее такого *Rf*-гена или локуса. Потомство скрещивания (например, растение F1, полученное путем скрещивания растения содержащим ген *Rf*, с растением не содержащим ген *Rf*, или растение F2 или F3, и т. д., полученные от самоопыления F1) - подвергается бэкроссированию с родителем. После многократного бэкроссирования (BC1, BC2 и т. д.) и в некоторых случаях самоопылений

(BC1S1, BC2S1 и т. д.) признак одного генетического фона включается в другой генетический фон.

“Маркерная селекция” (“MAS”) - это процесс использования наличия молекулярных маркеров, которые генетически связаны с определенным локусом или с определенной областью хромосомы (например, фрагмент интрогрессии), для отбора растений на наличие конкретного локуса или области (фрагмент интрогрессии). Например, молекулярный маркер, генетически и физически связанный с *Rf*-локусом, может быть использован для обнаружения и/или отбора растений, содержащих *Rf*-локус. Чем ближе генетическая связь молекулярного маркера с локусом, тем менее вероятно, что данный маркер диссоциирован от локуса посредством рекомбинации в мейозе.

“Биологическим образцом” может быть растение или часть растения, например, ткань растения или клетка растения, или экстракт растения или часть растения, включая белок.

“Предоставление геномной ДНК”, в соответствии с данным контекстом, относится к предоставлению образца, содержащего геномную ДНК из растения. Данный образец может относиться к образцу ткани, который был получен из указанного растения, например, образец листа, содержащий геномную ДНК из указанного растения. Данный образец может еще относиться к геномной ДНК, которая получена из образца ткани, такой как геномная ДНК, полученной из ткани, например, образца листа. Предоставление геномной ДНК может включать, но не обязательно, очистку геномной ДНК из образца ткани. Таким образом, получение геномной ДНК также включает получение тканевого материала из растения или более крупной части ткани и получение из него суммарного экстракта или лизата.

“Выделенная ДНК” или “выделенная нуклеиновая кислота”, используемая в рамках данного изобретения, относится к ДНК или нуклеиновой кислоте, не встречающейся в ее естественном геномном окружении, независимо от ее длины и последовательности. Выделенная ДНК может, например, относиться к ДНК, которая физически отделена от геномного окружения, например, фрагмента геномной ДНК. Выделенная ДНК также может быть искусственно полученной ДНК, такой как химически синтезированная ДНК, или такой как ДНК, полученная с помощью реакций амплификации, например, полимеразной цепной реакцией (PCR), хорошо известной в данной области техники. Выделенная ДНК может далее относиться к ДНК, присутствующей в окружении ДНК, в котором она не встречается

естественным образом. Например, выделенная ДНК может относиться к фрагменту ДНК, присутствующему в плазмиде. Еще, выделенная ДНК может относиться к фрагменту ДНК, присутствующему в другом хромосомном окружении, чем окружение, в котором она встречается естественным образом, например, в другом положении в геноме, чем естественное положение, в геноме другого вида, чем вид, в котором она встречается естественным образом, или в искусственной хромосоме. Термин “выделенный”, используемый в настоящей заявке, когда речь идет о белке (последовательности), также включает белок (последовательность), который был модифицирован человеком (например, путем модификации нуклеиновой кислоты, кодирующей этот белок), также как это делают в попытке получить некоторое улучшение активности белка (например, восстановительной активности). Термин “выделенная”, используемый в настоящей заявке, когда речь идет о нуклеиновой кислоте (последовательности), также включает нуклеиновую кислоту (последовательность), которая была модифицирована человеком (например, путем вставки, удаления или замены одного или нескольких нуклеотидов в нативной нуклеиновой кислоте), также как это делается в попытке получить некоторое улучшение (например, улучшение экспрессии РНК или белка, нацеливания или стабильности, или улучшение активности белка (например, восстановительной активности)). “Модифицированная” нуклеиновая кислота или белок (последовательность), в контексте данной заявки, относится к нуклеиновой кислоте или белку (последовательность), которая отличается от нативной нуклеиновой кислоты или белка, в результате модификации или мутации нуклеиновой кислоты или белка (или нуклеиновой кислоты, кодирующей белок), также как это делается при попытке получить некоторое улучшение.

В одном воплощении данного изобретения нуклеиновая кислота Rf1_PPR_09 имеет модифицированную или мутированную последовательность по сравнению с последовательностью в SEQ ID № 1 или 4, причем нуклеотид, который находится в положении, соответствующем нуклеотидной позиции 3286 в последовательности SEQ ID № 1 (или нуклеотид находится в положении, соответствующем нуклеотидной позиции 2286 в последовательности SEQ ID № 4) - это G, или имеет модифицированную или мутированную последовательность по сравнению с последовательностью в SEQ ID № 1, причем указанная модифицированная или мутированная последовательность имеет удлинение не более 6 А, предпочтительно 6 А - между Т, соответствующей нуклеотидной позиции 753 в последовательности SEQ ID №: 1, и С, соответствующей нуклеотидной позиции 760 в

последовательности SEQ ID №: 1. В одном варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота Rf1_PPR_09 имеет модифицированную или мутированную последовательность по сравнению с последовательностью в SEQ ID № 1, где нуклеотид в положении, соответствующем позиции 3286 нуклеотида в последовательности SEQ ID № 1, - это G, и где указанная модифицированная или мутированная последовательность имеет удлинение не более 6 А, предпочтительно 6 А, между Т, соответствующей позиции 753 нуклеотида в последовательности SEQ ID № 1, и С, соответствующей позиции 760 нуклеотида в последовательности SEQ ID № 1. В одном воплощении модифицированная или мутировавшая нуклеиновая кислота последовательности SEQ ID №:1 от нуклеотидной позиции 1 до 1054 включает в себя удлинение не более 6 А, предпочтительно 6 А, между Т, соответствующей нуклеотидной позиции 753 в последовательности SEQ ID №: 1, и С, соответствующей нуклеотидной позиции 760 в последовательности SEQ ID №: 1. В одном воплощении, такая модифицированная или мутированная Rf1_PPR_09 нуклеиновая кислота, кодирует модифицированный белок Rf1_PPR_09 имеющий модифицированную или мутированную аминокислотную последовательность по сравнению с последовательностью, представленную в SEQ ID № 5.

Всякий раз, когда делается ссылка на “растение” или “растения” в соответствии с данным изобретением, подразумевается, что сюда также включаются части растения (клетки, ткани или органы, семенные коробочки, семена, отделенные части, такие как корни, листья, цветы, пыльца и т.д.), потомство растений, которые сохраняют отличительные признаки родителей (особенно способность к восстановлению), такие как семя, полученное путем самоопыления или скрещивания, например, гибридное семя (полученное путем скрещивания двух инбредных родительских линий), гибридные растения и части растений, полученные из них, если не указано иное. В некоторых воплощениях клетки растения по данному изобретению могут быть неразмножающимися клетками.

Полученные растения согласно изобретению могут быть использованы в обычной селекционной схеме для получения большего количества растений с одинаковыми признаками или для введения признака наличия гена-восстановителя согласно изобретению в другие сорта того же или родственного вида растений, либо в гибридные растения. Полученные растения можно в дальнейшем использовать для создания материала для размножения. Растения согласно изобретению могут быть дополнительно использованы для

получения гамет, семян, цветков, эмбрионов, либо зиготных, либо соматических, потомства или гибридов растений, полученных способами по изобретению. Также данным изобретением охватываются семена, полученные из растений согласно данному изобретению.

“Создание материала для размножения”, в контексте данного описания, относится к любым известным в данной области техники средствам для получения дальнейших растений, частей растений или семян и включает, в частности, методы вегетативного размножения (например, воздушная или наземная отводка, деление, прививка (почки), микроразмножение, столоны или стелющиеся побеги, органы накопления запасных питательных веществ, такие как луковицы, клубнелуковицы, клубни и корневища, укоренение или черенкование, двойное масштабирование), половое размножение (скрещивание с другим растением) и бесполое размножение (например, апомиксис, соматическая гибридизация).

Трансформация, используемая в данном описании, означает введение нуклеотидной последовательности в растение таким образом, чтобы вызвать стабильную или преходящую экспрессию этой последовательности. Трансформация и регенерация как однодольных, так и двудольных растительных клеток в настоящее время является плановой, и выбор наиболее подходящего метода трансформации определяется практикующим специалистом. Выбор метода варьируется в зависимости от типа растения, подлежащего трансформации; специалисты в данной области признают пригодность конкретных методов для данных типов растений. Подходящие способы могут включать, но не ограничиваются следующим: электропорация протопластов растения; липосомно-опосредованная трансформация; полиэтиленгликоль (PEG) опосредованная трансформация; трансформация с использованием вирусов; микроинъекция растительных клеток; микро-снарядная бомбардировка клеток растения микрочастицами; вакуумная инфильтрация; и агробактериально-опосредованная трансформация.

Используемый в настоящей заявке термин “гомологичный” или “в значительной степени идентичный” или “по существу аналогичный” может относиться к нуклеотидным последовательностям, которые идентичны более чем на 85%. Например, в значительной степени идентичная нуклеотидная последовательность может быть на 85,5%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99% или на 99,5% идентична

референсной последовательности (например, SEQ ID №: 1 или 4). В одном воплощении последовательность нуклеиновых кислот в значительной степени идентичная или по существу аналогичная с последовательностью SEQ ID №: 4 (или последовательностью SEQ ID №: 4 от нуклеотидной позиции 55 до 2433), более чем на 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99% или более чем на 99,5% идентична последовательности SEQ ID №:4 (или последовательности SEQ ID №: 4 от нуклеотидной позиции 55 до 2433) и имеет G-нуклеотид в нуклеотидной позиции, соответствующей нуклеотидной позиции 2286 в последовательности SEQ ID №: 4. В одном воплощении последовательность нуклеиновых кислот в значительной степени идентичная или по существу аналогичная с последовательностью SEQ ID №: 1 (или последовательностью SEQ ID №: 1 от нуклеотидной позиции 1055 до 3433), более чем на 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99% или более чем на 99,5% идентична последовательности SEQ ID №:1 (или SEQ ID №: 1 от нуклеотидной позиции 1055 до 3433), и имеет нуклеотид G в нуклеотидной позиции, соответствующей нуклеотидной позиции 3286 в последовательности SEQ ID NO: 1, или имеет удлинение не более 6 А, предпочтительно 6 А, между Т, соответствующей нуклеотидной позиции 753 в последовательности SEQ ID №: 1 и С, соответствующей нуклеотидной позиции 760 в последовательности SEQ ID №: 1. В одном воплощении последовательность нуклеиновых кислот в значительной степени идентичная или по существу аналогичная последовательности SEQ ID №: 1 (или последовательности SEQ ID №: 1 от нуклеотидной позиции 1055 до 3433), более чем 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99% или более чем на 99,5% идентична последовательности SEQ ID №:1 (или последовательности SEQ ID №: 1 от нуклеотидной позиции 1055 до 3433), и имеет G-нуклеотид в нуклеотидной позиции, соответствующей нуклеотидной позиции 3286 в последовательности SEQ ID NO: 1, и удлинение не более 6 А между Т, соответствующим нуклеотидной позиции 753 в последовательности SEQ ID №: 1, и С, соответствующей нуклеотидной позиции 760 в последовательности SEQ ID №: 1. В одном воплощении, включенном в данное изобретение, последовательность нуклеиновых кислот в значительной степени идентичная или по существу аналогичная последовательности SEQ ID №: 1 от нуклеотидной позиции 1 до 1054, причем указанная последовательность нуклеиновых кислот более чем на 85%; 86%; 87%; 88%; 89%; 90%; 91%; 92%; 93%; 94%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99% или более чем на 99,5% идентична последовательности SEQ ID №:1 от нуклеотидной позиции 1 до 1054 и имеет удлинение не более 6 А, предпочтительно 6 А, между Т, соответствующим нуклеотидной позиции 753 в последовательности SEQ ID №:

1, и С, соответствующим нуклеотидной позиции 760 в последовательности SEQ ID №: 1. Зондом может быть также молекула нуклеиновой кислоты, которая “специфично гибридизуется” или “специфично комплементарна” точной копии обнаруживаемого маркера (“ДНК-мишени”). “Специфично гибридизуемые” или “специфично комплементарные” - это термины, указывающие на достаточную степень комплементарности, при которой происходит стабильное и специфичное связывание между молекулой нуклеиновой кислоты и ДНК-мишенью. Молекула нуклеиновой кислоты не обязательно должна быть на 100% комплементарна своей последовательности-мишени, чтобы быть специфично гибридизуемой. Молекула нуклеиновой кислоты специфично гибридизуема, когда существует достаточная степень комплементарности, чтобы избежать неспецифичного связывания нуклеиновой кислоты с последовательностями не являющимися мишенями в условиях, где требуется специфичное связывание, например, в жестких условиях гибридизации, предпочтительно в очень жестких условиях.

“Жёсткие условия гибридизации” могут быть использованы для идентификации нуклеотидных последовательностей, которые в значительной степени идентичны данной нуклеотидной последовательности. Жесткие условия зависят от последовательности и будут различными в различных обстоятельствах. Как правило, жесткие условия выбираются на 5°C ниже температуры теплового плавления (T_m) для специфичных последовательностей при определенной ионной силе и pH. T_m - это температура (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% последовательности-мишени гибридизуется с идеально подобранным зондом. Обычно выбираются жесткие условия, при которых концентрация соли составляет 0,02 моль/л при pH равном 7 и температуре минимум 60°C. Снижение концентрации соли и/или повышение температуры повышает жесткость условий. Жесткие условия для гибридизаций РНК-ДНК (нозерн-блоты с использованием зонда, например, 100 nt) - это, например, те, которые включают, по меньшей мере, одну промывку в 0,2 X растворе цитрата и хлорида натрия (SSC) при температуре 63°C в течение 20 мин или в эквивалентных условиях.

“Условия высокой жесткости” могут быть обеспечены, например, гибридизацией при 65°C в водном растворе, содержащем 6х раствора цитрата и хлорида натрия (SSC) (20х SSC содержит 3,0 М NaCl, 0,3 М цитрата натрия, pH 7,0), 5х раствора Денхардта (100X раствора Денхардта содержит 2% раствора Фиколла, 2% поливинилпирролидона, 2% сывороточного

бычьего альбумина), 0,5% додецилсульфата натрия (SDS) и 20 мкг/мл денатурированного ДНК-носителя (одноцепочечная ДНК спермы рыб, со средней длиной 120 - 3000 нуклеотидов) в качестве неспецифичного конкурента. После гибридизации промывку высокой жесткости можно проводить в несколько этапов, с окончательной промывкой (30 мин) при температуре гибридизации в 0,2-0,1× растворе цитрата и хлорида натрия (SSC), 0,1% растворе додецилсульфата натрия (SDS).

“Условия умеренной жесткости” относятся к условиям, эквивалентным гибридизации в вышеописанном растворе, но при температуре в диапазоне 60-62°C. Промывку умеренной жесткости можно проводить при температуре гибридизации в 1x растворе цитрата и хлорида натрия (SSC), 0,1% растворе додецилсульфата натрия (SDS).

“Низкая жесткость” относится к условиям, эквивалентным гибридизации в вышеописанном растворе при температуре 50-52°C. Промывка низкой жесткости может быть выполнена при температуре гибридизации в 2x растворе цитрата и хлорида натрия (SSC), 0,1% растворе додецилсульфата натрия (SDS). См. также Sambrook *et al.* (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) и Sambrook и Russell (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY).

Для целей настоящего изобретения "идентичность последовательности" двух связанных нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, выраженная в процентах, относится к числу позиций в двух оптимально выровненных последовательностях, которые имеют идентичные остатки (x100), деленные на число сравниваемых позиций. Гэп (брешь), то есть положение в выравнивании, где остаток присутствует в одной последовательности, но отсутствует в другой, рассматривается как положение с неидентичными остатками. “Оптимальное выравнивание” двух последовательностей определяется путем выравнивания двух последовательностей по всей длине по алгоритму глобального выравнивания Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, *J Mol Biol* 48(3):443-53) в EMBOSS (The European Molecular Biology Open Software Suite) (пакет программ, который реализует алгоритм глобального выравнивания Нидлмана – Вунша) (EMBOSS, Rice *et al.*, 2000, *Trends in Genetics* 16(6): 276—277; see e.g. <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>) используя стандартные настройки (штраф за открытие гэпа = 10 (для нуклеотидов) / 10 (для белков) и штраф за

продление гэпа = 0,5 (для нуклеотидов) / 0.5 (для белков)). Для нуклеотидов используется стандартная матрица замен EDNAFULL, а для белков-стандартная матрица замен EBLOSUM62. Становится ясно, что всякий раз, когда нуклеотидные последовательности молекул РНК определяются ссылкой на нуклеотидную последовательность соответствующих молекул ДНК, тимин (Т) в нуклеотидной последовательности должен быть заменен урацилом (U). Будет ли ссылка сделана на молекулы РНК или ДНК ясно из контекста приложения.

Используемый в настоящей заявке термин “включающий” следует интерпретировать как указание на наличие указанных признаков, целых чисел, стадий или компонентов, как указано выше, но не исключает наличия или добавления одного или нескольких признаков, целых чисел, шагов или компонентов или их групп. Так, например, нуклеиновая кислота или белок, содержащий последовательность нуклеотидов или аминокислот, может содержать больше нуклеотидов или аминокислот, чем фактически указанные, то есть быть встроенной(-ым) в большую нуклеиновую кислоту или белок. Химерный ген, содержащий функционально или структурно определенную нуклеиновую кислоту, может содержать дополнительные участки ДНК и т. д.

Используемый в настоящей заявке термин “экзогенный” означает имеющий внешнее происхождение или причину, в отличие от термина “эндогенный”. Экзогенная молекула нуклеиновой кислоты - это молекула нуклеиновой кислоты, которая естественным образом не встречается в организме и была (исторически) введена или сконструирована так, чтобы встречаться в организме.

В некоторых юрисдикциях растения согласно данному изобретению, которые, тем не менее, были получены исключительно с помощью по сути биологических процессов, причем процесс производства растений считается по сути биологическим, если он полностью состоит из природных явлений, таких как скрещивание или отбор, могут быть исключены из патентоспособности. Растения согласно данному изобретению, таким образом, также включают в себя те растения, которые не являются исключительно полученными по сути биологическими процессами.

Если в примерах не указано иное, все технологии рекомбинантных ДНК проводятся в соответствии со стандартными протоколами, описанными в книге Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press,

NY и в томах 1 и 2 книги Ausubel et al. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USA. Стандартные материалы и методы молекулярной работы с растениями описаны в книге R. D. D. Croy "Plant Molecular Biology Labfax" (1993), совместно опубликованной издательствами BIOS Scientific Publications Ltd (Великобритания) и Blackwell Scientific Publications, Великобритания. Другие ссылки на стандартные методы молекулярной биологии включают Sambrook и Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, третье издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, тома I и II Brown (1998) Molecular Biology LabFax, восьмое издание, Academic Press (Великобритания). Стандартные материалы и методы проведения полимеразных цепных реакций см. в Dieffenbach и Dveksler (1995) PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, и в McPherson et al. (2000) PCR - Basics: From Background to Bench, первое издание, Springer Verlag, Германия.

Все патенты, патентные заявки и публикации или публичное раскрытие информации (включая публикации в интернете), упомянутые или цитируемые в настоящем описании, включаются путем ссылки в полном объеме.

Перечень последовательностей, содержащийся в файле с именем "BCS18-2006_ST25.txt", объемом 34 килобайта (размер, измеренный в операционной системе "Microsoft Windows®"), содержит 7 последовательностей от SEQ ID №: 1 до SEQ ID №: 7, приобщен к настоящему электронному представлению и включен в настоящую заявку путем ссылки.

Данное изобретение далее описано со ссылкой на примеры, описанные в настоящей заявке; однако следует понимать, что данное изобретение не ограничивается такими примерами.

На протяжении всего описания делаются ссылки на следующие последовательности

SEQ ID №: 1: последовательность геномной области от PI 583676, содержащей ген *Rfl-PPR-09*

Nt 1-1000: геномная область против хода транскрипции от транскрипта кДНК/мРНК *Rfl-PPR-09*

Nt 1001-1054: 5'нетранслируемая область (некодирующий участок мРНК, располагающийся на её 5'-конце после кодирующей области)

Nt 1055-3433: кодирующая последовательность

Nt 3434-3956: 3'нетранслируемая область часть 1

Nt 4827-4919: 3'нетранслируемая область часть 2

Nt 5398-5515: 3' нетранслируемая область часть 3

Nt 5662-5708: 3' нетранслируемая область часть 4

Nt 5854-6466: 3' нетранслируемая область часть 5

Nt 6467-7923: геномная область по ходу транскрипции от транскрипта кДНК/мРНК
RfI-PPR-09

SEQ ID №: 2: нуклеотидная последовательность ORF256

SEQ ID №: 3: спрогнозированная последовательность-мишень в пределах химерного гена
ORF256

SEQ ID №: 4: кДНК/ мРНК *RfI-PPR-09*

Nt 1-54: 5 'нетранслируемая область

Nt 55-2433: кодирующая последовательность

Nt 2434-3827: 3 ' нетранслируемая область

SEQ ID №: 5: аминокислотная последовательность *RfI-PPR-09*

SEQ ID №: 6: прямой праймер (кПЦР)

SEQ ID №: 7: обратный праймер (кПЦР)

Примеры

Пример 1 - растительные материалы и генетическое картирование

Локус количественного признака (QTL) *Rf1* был отображен на хромосоме 1A, как описано подробно в примерах 1 - 3 заявки WO2017158126 (в настоящее описание включены посредством ссылки). Кратко, мужская стерильная линия несущая ЦМС *Triticum timopheevii*, CMS005, и мужская стерильная линия-восстановитель, отвечающая на ЦМС *Triticum timopheevii* (T.timopheevii //2* Iowin //2* Quivira, учётный номер PI 583676, Национальная коллекция зерновых культур Министерства сельского хозяйства США; <http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=21891>, также известная как Dekalb 582M и зарегистрированная как US PVP 7400045, можно найти в Национальной системе зародышевой плазмы растений <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/accessiondetail.aspx?id=1478647>), были использованы в качестве родителей для создания картирующей популяции. Была создана генетическая карта с общим количеством 2080 маркеров однонуклеотидного полиморфизма (SNP), охватывающая все хромосомы генома пшеницы. Хромосома 1A была описана 108 маркерами однонуклеотидного полиморфизма. Анализ локусов количественного признака (QTL) проводился с использованием регрессии Хейли – Нотта для проверки влияния изменчивости в образовании семян по всем маркерам. Был очерчен интервал значительно ассоциированных маркеров, включая левый и правый фланкирующие маркеры (последовательности SEQ ID №. 2 и SEQ ID №. 4 из заявки WO2017158126). Маркер с наибольшей значимостью и наибольшим влиянием на восстановление - это пиковый маркер последовательности SEQ ID № 3 заявки WO2017158126. Это ограничило интервал до 15,6 сМ левым и правым фланкирующими маркерами. Для дальнейшего точного картирования были отобраны 40 индивидуумов F₂, которые были гетерозиготны в области локуса количественного признака (QTL) на основе фенотипа и генотипа. В общей сложности 2560 индивидуумов растений F₃ были выращены в поле в 2 местах. Для каждого растения измеряли образование семян на главном колосе под мешком. Для увеличения плотности маркеров в интервале локуса количественного признака были разработаны дополнительные анализы однонуклеотидного полиморфизма (SNP). В общей сложности для картирования области 1A был использован 361

дополнительный маркер однонуклеотидного полиморфизма. Лocus *Rf1* может быть дополнительно ограничен областью 1,9 сМ (от 30,9 до 32,8 сМ по хромосоме 1А).

Пример 2 – Библиотеки искусственных бактериальных хромосом (BAC) линии-восстановителя

Библиотека искусственных бактериальных хромосом (BAC) была построена для линии-восстановителя пшеницы, называемой *Rf*-линией с учётным номером 'PI 583676', путем расщепления высокомолекулярной гДНК с учётным номером 'PI 583676' с помощью рестриктазы и трансформирования полученных фрагментов (средний размер вставки ~80-130 т.п.н.) в *E. coli*. Последовательности маркеров однонуклеотидного полиморфизма тонкого генетического картирования, или маркеров, разработанных из соответствующей *Rf*-области на референсном геноме 'Chinese Spring', затем использовались для разработки ПЦР-праймеров для скрининга пулированных клонов искусственных бактериальных хромосом. Как только ПЦР-положительные пулы искусственных бактериальных хромосом были идентифицированы, искусственные бактериальные хромосомы из этого пула были индивидуализированы и снова подвергнуты скринингу с тем же маркером. Затем индивидуальные ПЦР-положительные искусственные бактериальные хромосомы подвергались секвенированию концов искусственных бактериальных хромосом для подтверждения целостности и наличия маркерных последовательностей скрининга. И наконец верифицированные положительные искусственные бактериальные хромосомы были подвергнуты глубокому секвенированию с использованием технологии PacBio и прочтения собраны для создания консенсусной последовательности для вставки искусственных бактериальных хромосом. Затем секвенированные положительные искусственные бактериальные хромосомы были выровнены либо путем сборки "*de novo*", либо путем сборки с референсным геномом, либо с использованием маркеров скрининга для создания новой референсной последовательности с учётным номером 'PI 583676' для области локуса количественного признака (QTL) *Rf1*. Далее референсная последовательность локуса количественного признака *Rf1* с учётным номером 'PI 583676' была структурно и функционально аннотирована для выявления любых структурных изменений и/или различий в содержании генов и/или полиморфизмов в гене-кандидате, захваченном в пределах области, относящейся к референсному геному (не восстановителю). Структурная аннотация искусственных бактериальных хромосом, собранных по всей области локуса

количественного признака *Rf1* с использованием программ аннотации генов "*ab initio*", а также путем выравнивания последовательностей EST пшеницы, последовательностей кДНК полной длины пшеницы, моделей генов пшеницы и известных генов-восстановителей из ортологичных видов, которые можно найти в общедоступных базах данных. Функциональную аннотацию генов в области локуса количественного признака (QTL) проводили с использованием программ Blast2GO и PLAZA, а также принимая во внимание данные в опубликованной литературе. Затем эти гены-кандидаты были распределены по приоритетам на основе их спрогнозированной функциональности, наличия полиморфизмов относящихся к ортологичным аллелям в невозобновляемых линиях и их гомологии с известными генами *Rf* (Chen and Liu 2014, *Annu. Rev. Plant Biol.* 65 579–606; Dahan and Mireau 2013, *RNA Biol.* 10, 1469–1476).

Библиотека искусственных бактериальных хромосом "PI 583676" была многократно подвергнута скринингу с использованием ПЦР-маркеров, разработанных из маркеров точного картирования, референсных геномов или выделенных последовательностей искусственных бактериальных хромосом, которые были секвенированы по отдельности. Было обнаружено, что секвенированные искусственные бактериальные хромосомы содержат ген *Rf-Rf1-PPR-09*, описанный в настоящей заявке. Эти искусственные бактериальные хромосомы представляют собой уникальную последовательность генома с учётом номером 'PI 583676' для области локуса количественного признака (QTL) *Rf1*.

В соответствии с недавним представлением Geyer et al. (2017, ранее) о том, что локус *Rf1*, вероятно, имеет происхождение *T. timopheevii*, ген *Rf-PPR-09* не присутствует в эталонном геноме Chinese Spring.

Как показано на Рис. 1 а, структура гена *Rf1-Rf-PPR-09* состоит из одного экзона. Эта относительно простая структура гена, по-видимому, типична для генов *Rf-PPR*.

SEQ ID №: 1 представляет собой последовательность геномной ДНК, содержащую ген *Rf1-PPR-09*.

Пример 3 – Аннотация аминокислотной последовательности RF1-PPR-09

Известные *Rf*-PPR являются элементами белков пентатрикопептидного повтора (PPR) P-класса и содержат до ~30 PPR-мотивов из расчета на белок, причем каждый мотив содержит 35 аминокислот (Gaborieau, Brown, and Mireau 2016, Front. Plant Sci. 7, 1816). Структурно белки пентатрикопептидного повтора состоят из 2 α -спиралей, которые образуют шпильку и супер-бороздку, и именно эта супер-бороздка взаимодействует с молекулой РНК. Аминокислотный состав отдельных мотивов белка пентатрикопептидного повтора определяет РНК, нуклеотид которой распознается, а количество мотивов белка пентатрикопептидного повтора определяет длину последовательности РНК на транскрипте-мишени. В настоящем изобретении ген *Rf1-PPR-09* был аннотирован для идентификации мотивов белка пентатрикопептидного повтора и других признаков последовательности, и результаты отображены на рис.1 В и С.

Ген *Rf1-PPR-09* состоит из 792 аминокислот и содержит 18 последовательных 35 аминокислотных мотивов белка пентатрикопептидного повтора, а также спрогнозированный транзитный пептид, который нацеливает белок на определенную митохондрию (последовательность SEQ ID №: 5)-это было спрогнозировано с помощью инструмента "PredSL" (Evangelia et al.(2006) Geno. Prot. BioInfo том 4, № 1, 48-55), с (сильный) mTP (митохондриально-нацеленный пептид) с количественным показателем 0,999741 в PredSL). Это очень похоже на структуру гена *Rf-1A*, клонированного из риса, который имеет длину 791 аминокислот и содержит 16 *Rf*-PPR повторов (Akagi et al. 2004, Theor. Appl. Genet. 108, 1449–1457; Komori et al. 2004, Plant J. 37, 315–325).

Каждый мотив белка пентатрикопептидного повтора (PPR) состоит из 2-х антипараллельных спиралей, образующих структуру шпильки, которая взаимодействует с молекулой одноцепочечной РНК. Исследования показали существование кода распознавания, связывающего идентичность специфичных аминокислот в пределах повторов и последовательности -мишени РНК исследуемого белка пентатрикопептидного повтора (Barkan et al. 2012, supra; Yagi et al. 2013, supra). (Barkan and Small 2014, supra) В частности, была показана особая важность идентичности 2-й, 5-й и 35-й аминокислот каждого мотива. На основе идентичности аминокислот в позициях 2, 5 и 35 в мотиве белка пентатрикопептидного повтора последовательность целевого транскрипта белка *Rf1-PPR-09* может быть прогнозирована с помощью таблицы вероятностных матриц, описанной Yagi et al 2013, ранее. В соответствии с кодом белка пентатрикопептидного повтора,

спрогнозированная последовательность-мишень РНК на *orf256* является последовательностью АТТТСТСААТААААА (SEQ ID № 3), которая может быть найдена в мРНК *orf256* в составе нуклеотидной последовательности в нуклеотидных позициях от 105 до 121 после иницирующего кодона АТГ химерного гена *orf256* (SEQ ID №:2 от нуклеотида 192 до 207).

Пример 4 - экспрессия генов и связь с восстановлением фертильности в независимой популяции

Связь между экспрессией гена *Rf1-PPR-09* и фертильностью была проверена в почти изогенных линиях, полученных из популяции MAGIC с 16 основателями. Эта популяция была создана путем скрещивания 16 линий-основателей, среди которых была одна линия с цитоплазматической мужской стерильностью, полученная от *T. timopheevii*, и две потенциальные линии-восстановители, названные R1 и R2. Данная популяция MAGIC с 16 основателями скрещивалась в течение 5 поколений и впоследствии фиксировалась методом индивидуального отбора от одного семени поколения F5. На протяжении всего процесса фиксации линии подвергались генотипированию и фенотипированию на фертильность. Это позволило отобрать семьи, сегрегирующие для восстановления, а также провести дополнительное тонкое картирование *Rf*-локусов. В F5 были идентифицированы особи с гетерозиготностью по ранее картированному локусу *Rf1* и использованы для создания множественных пар почти изогенных линий (NIL) с локусом *Rf1* и без него в их потомстве. Шесть таких пар почти изогенных линий были отобраны, выращены и фенотипированы. Эксперименты секвенирования РНК и количественная полимеразная цепная реакция проводились на колосах, связанным с развитием на 3 стадиях из шести пар почти изогенных линий (NIL), а также соответствующих родительских линий с использованием праймеров, представленных в Таблице 1 (SEQ ID №№: 6 и 7). Биоинформатический анализ данных секвенирования РНК позволил идентифицировать дифференциально экспрессируемые транскрипты между генотипами-восстановителями и генотипами-невосстановителями. Идентифицированные транскрипты, отображенные в областях локусов количественного признака (QTL), имели правильную (восстанавливающую) линию основателя.

Таблица 1. Последовательности праймеров используемые для анализа экспрессии генов

Идентификатор гена	Название	Тип	Область-мишень (SEQ ID № 1)	Последовательность 5' --> 3'	SEQ ID №
Rf1-PPR-9	Fw1	Праймер	3843-3862	CTAAGGGTCAGAGTAATCAG	6
	Rev1	Праймер	3924-3943 комплемент	TGATGAGAACAACCGGTCA	7

Как показано на Рис. 2, экспрессия была обнаружена исключительно в линии-донора, содержащей ген *Rf* и в почти изогенных линиях содержащих ген *Rf* при развитии колосов длиной 3,5 см. Ни родитель не содержащий генов восстановления фертильности *Rf*, ни сегреганты дикого типа не показали экспрессии.

Пример 5 – валидация генов

Путем мутагенеза

Мутагенизированная популяция линии-восстановителя конструируется мутагенезом под воздействием этилметансульфоната (EMS). На основе секвенирования области вокруг гена Rf1-PPR-09 идентифицированы мутантные растения с инактивирующей мутацией в гене Rf1-PPR-09. Гомозиготные мутантные растения и их сегреганты дикого типа подвергаются скринингу на способность к восстановлению фертильности. Растения, у которых есть инактивирующий мутантный ген Rf1-PPR-09, больше не обладают восстанавливающей способностью, подтверждая, что идентифицированный ген Rf1-PPR-09 является функциональным геном Rf.

По сверхэкспрессии

Кодирующую последовательность гена Rf1-PPR-09 клонировали под контролем конститутивного промотора убиквитина (pUbiZm) из кукурузы в векторе экспрессии Т-ДНК, содержащем селективируемый маркерный ген *bar*. Полученный вектор был использован для трансформации сорта трансформируемой пшеницы *Fielder*, не имеющего способности к восстановлению, в соответствии с методами, хорошо известными в данной области техники касающихся трансформации пшеницы (см., например, Ishida et al *Methods Mol Biol.*2015;1223:189-98). Число копий трансгена в трансгенном растении определяли способом ПЦР в реальном времени по селективируемому маркерному гену. Трансформированные растения, содержащие единственную копию кассеты гена Rf1-PPR-09, были перенесены в теплицу. Трансгенные растения T0 скрещивали в качестве мужских родителей с линией пшеницы с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа. Для оценки восстановления семенной продуктивности выращивали потомство F1 из 15 событий. Все растения-потомки F1 содержат цитоплазму G-типа и сегрегируют 1:1 (гемизиготные:незиготические) на наличие трансгенного локуса Rf1-PPR-09. Экспрессию трансгена в ткани листьев и в молодых развивающихся колосках растений F1 тестировали количественной ПЦР с детекцией в реальном времени.

Жизнеспособность пыльцы оценивали йодным окрашиванием для 3 незиготических и 3 гемизиготных растений из расчета на событие, а образование семян регистрировали на всех колосках до 5 незиготических и до 5 гемизиготных растений из расчета на событие.

Результаты показывают сильное восстановление фертильности в 5 случаях, умеренное восстановление фертильности в 3 случаях и слабое или очень слабое восстановление фертильности в 2 случаях, в то время как 5 случаев не показали статистически значимого восстановления образования семян. Восстановление образования семян сильно коррелировало с частотой окрашивания пыльцы. В таблице 2 ниже приведены результаты для всех событий, показывающих статистически значимую разницу между образованием семян у азиготных и гемизиготных растений (с использованием t-критерия, двойной выборки, предполагающей неравные варианты). Гемизиготные растения можно разделить на три группы по экспрессии мРНК трансгена Rf1-PPR-09. Все растения в группе с самой низкой экспрессией показали отсутствие или очень низкое образование семян, в то время как все растения в группе с самой высокой экспрессией показали хорошее образование семян. Растения в промежуточной группе экспрессии показали различные уровни образования семян.

Таким образом, экспрессия гена Rf1-PPR-09 восстанавливает фертильность цитоплазматических мужских стерильных растений G-типа пшеницы.

Таблица 2. Восстановление ЦМС G-типа в пшенице путем сверхэкспрессии Rf1-PPR-09

События	Незиготические			Гемизиготные			Способность к восстановлению	Р-значение (двуххвостный)*
	Кол-во растений	Среднее кол-во семян	Стандартное отклонение кол-ва семян	Кол-во растений	Среднее кол-во семян	Стандартное отклонение кол-ва семян		
Событие 1	5	5,20	6,42	5	199,60	61,61	сильная	0,002172185
Событие 2	5	0,00	0,00	5	226,20	34,95	сильная	0,000132577
Событие 3	5	0,20	0,45	5	91,40	51,40	средняя	0,016578945
Событие 4	5	0,20	0,45	5	129,80	26,89	средняя	0,000420738
Событие 5	5	0,00	0,00	5	244,40	38,28	сильная	0,000139825

Событие 6	5	0,60	0,89	5	238,60	27,72	сильная	4,34558 E-05
Событие 7	5	6,00	6,60	5	130,60	22,91	средняя	8,05854 E-05
Событие 8	5	0,00	0,00	5	6,40	3,71	очень слабая	0,018265991
Событие 9	5	2,60	2,41	5	36,60	21,03	слабая	0,022931034
Событие 10	5	1,80	3,49	5	230,80	63,93	сильная	0,001325094

* t-тест: с использованием t-критерия, двойной выборки, предполагающей неравные варианты

Направленным нокаутом

[6] Направляющие РНК для CRISPR (кластерные короткие палиндромные повторы, разделённые регулярными промежутками)-опосредованного редактирования генома, нацеленные на кодирующую последовательность мРНК, предпочтительно белок-кодирующую последовательность гена *Rfl-PPR-09* или непосредственно восходящую промоторную последовательность гена *Rfl-PPR-09*, конструируется с использованием, например, инструмента "CAS-finder". Предпочтительно для каждого гена-мишени конструируются четыре уникальные или почти уникальные направляющие РНК. Направляющие РНК тестируются на эффективность направленного воздействия путем совместной доставки полиэтиленгликоль (PEG) опосредованная трансформацией вектора экспрессии направляющей (гидовой) РНК с вектором экспрессии соответствующей нуклеазы, например, Cas9 или Cpf1, под контролем соответствующих промоторов к протопластам линии-восстановителя пшеницы, содержащей ген *Rfl-PPR-09*, предпочтительно линии, обозначенной как *T. timopheevii* с учётным номером PI 583676 в базе данных Министерства сельского хозяйства США (USDA). Геномная ДНК извлекается из протопластов после доставки направляющей РНК и нуклеазных векторов. После ПЦР-амплификации целостность последовательности - мишени гена *Rfl-PPR-09* оценивают методом секвенирования.

Одна или две наиболее эффективные направляющие РНК используются для стабильного редактирования генома в одной и той же линии-восстановителе пшеницы, также содержащей цитоплазму ЦМС G-типа. Для этого выбранный вектор экспрессии направляющей РНК вместе с модулем экспрессии нуклеазы и селективируемым маркерным геном вводят в

эмбрионы, выделенные из ранее упомянутой линии- восстановителя пшеницы, используя, например, бомбардировку генной пушкой. Трансгенные растения, проявляющие устойчивость к селективному агенту, регенерируют с использованием методов, известных специалистам в данной области. Трансгенные растения T₀, включающие события направленного воздействия на гены, предпочтительно мелкие делеции, приводящие к нефункциональному гену *Rf1-PPR-09*, идентифицируются с помощью ПЦР - амплификации и секвенирования.

Трансгенные растения T₀, содержащие цитоплазму ЦМС G-типа и, вероятно, содержащие функциональный нокаут гена *Rf1-PPR-09*, предпочтительно в гомозиготном состоянии, но в альтернативном варианте - в гетерозиготном состоянии, скрещиваются в качестве женских родителей с линией яровой пшеницы (spring wheat) с нормальной цитоплазмой и не содержащей генов *PPR-Rf*. Потомство F₁ кроссов содержит цитоплазму "ЦМС" G-типа, и 50% (в случае гетерозиготных T₀) или 100% (в случае гомозиготных T₀) потомства F₁ лишается функциональной версии гена -мишени *Rf-PPR*. Растения F₁, лишённые функционального гена-мишени *Rf-PPR*, идентифицируются с помощью геномного ПЦР-анализа. Растения F₁ демонстрируют частичную или полную потерю мужской фертильности из-за нокаута гена *Rf1-PPR-09*.

Уровень мужской фертильности в потомстве F₁, лишённом функциональной версии гена *Rf1-PPR-07*, тестируется с использованием четырех различных анализов. В первом анализе митохондриальный белок *ORF256* количественно определяется вестерн-блоттингом с использованием поликлональных антител, полученных против синтетического белка *ORF256*. Нокаут гена *Rf1-PPR-09* приводит к увеличению аккумуляции белка *ORF256*. Во втором анализе аккумуляцию пыльцы и жизнеспособность пыльцы количественно оценивают с помощью прибора "AmphaZ30". Нокаут гена *Rf1-PPR-09* приводит к снижению количества жизнеспособной пыльцы. В третьем анализе целостность тканей пыльника исследуется при помощи микроскопа. Нокаут гена *Rf1-PPR-09* приводит к раннему разрушению слоя тапетума. В четвертом анализе количественно определяется образование семян в колосе от самоопыления. Нокаут гена *Rf1-PPR-09* приводит к уменьшению количества зерен в колосе. Во всех испытаниях контролем служило потомство F₁ от скрещиваний нередктированных *Rf* растений с той же линией яровой пшеницы.

В качестве альтернативы направляющие РНК для CRISPR-опосредованного редактирования генов, нацеленные на область промотора, включенную в нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 1 от нуклеотидной позиции 1 до 3000, конструируются и тестируются в протопластах интересующей линии пшеницы описанным выше способом. Одна или две наиболее эффективные направляющие РНК используются для стабильного редактирования геномов в той же линии пшеницы, как описано выше, но дополнительно вводится репаративная ДНК, содержащая замену, вставку или делецию интересующего (одного или нескольких нуклеотидов) между фланкирующими последовательностями, гомологичными ДНК-мишеням. Растения, содержащие отредактированную область против хода транскрипции, идентифицируются с помощью ПЦР-амплификации и секвенирования и тестируются на уровень мужской фертильности, как описано выше.

Ссылочные материалы

- [7] Binder, S., Stoll, K. и Stoll, B. (2013). P-class pentatricopeptide repeat proteins are required for efficient 5' end formation of plant mitochondrial transcripts. *RNA Biol.* 10, 1511–1519.
- [8] Chen, J., Zheng, Y., Qin, L., Wang, Y., Chen, L., He, Y., Fei, Z., and Lu, G. (2016). Identification of miRNAs and their targets through high-throughput sequencing and degradome analysis in male and female *Asparagus officinalis*. *BMC Plant Biol.* 16, 80.
- [9] Ding, J., Lu, Q., Ouyang, Y., Mao, H., Zhang, P., Yao, J., Xu, C., Li, X., Xiao, J., and Zhang, Q. (2012). A long noncoding RNA regulates photoperiod-sensitive male sterility, an essential component of hybrid rice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 2654–2659.
- [10] Fang, Y.-N., Zheng, B.-B., Wang, L., Yang, W., Wu, X.-M., Xu, Q., and Guo, W.-W. (2016). High-throughput sequencing and degradome analysis reveal altered expression of miRNAs and their targets in a male-sterile cybrid pummelo (*Citrus grandis*). *BMC Genomics* 17, 591.
- [11] Schmitzlinneweber, C., and Small, I. (2008). Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci.* 13, 663–670.
- [164] Wei, M., Wei, H., Wu, M., Song, M., Zhang, J., Yu, J., Fan, S., and Yu, S. (2013). Comparative expression profiling of miRNA during anther development in genetic male sterile and wild type cotton. *BMC Plant Biol.* 13, 66.
- [165] Wei, X., Zhang, X., Yao, Q., Yuan, Y., Li, X., Wei, F., Zhao, Y., Zhang, Q., Wang, Z., Jiang, W., et al. (2015). The miRNAs and their regulatory networks responsible for pollen abortion in Ogura-CMS Chinese cabbage revealed by high-throughput sequencing of miRNAs, degradomes, and transcriptomes. *Front. Plant Sci.* 6.
- [166] Xia, R., Meyers, B.C., Liu, Z., Beers, E.P., Ye, S., and Liu, Z. (2013). MicroRNA Superfamilies Descended from miR390 and Their Roles in Secondary Small Interfering RNA Biogenesis in Eudicots. *Plant Cell Online* 25, 1555–1572.

Формула изобретения:

1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, причем указанный аллель функционального гена-восстановителя является функциональным аллелем гена Rf-PPR, содержащимся в нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 1.
2. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, при этом указанный аллель функционального гена-восстановителя содержит нуклеотидную последовательность, отобранную из следующего:
 - a. Нуклеотидная последовательность, по меньшей мере, на 85% идентичная последовательности SEQ ID №: 4 от нуклеотида в позиции 55 до 2433; предпочтительно по всей длине последовательности SEQ ID №: 4 от нуклеотида в позиции 55 до нуклеотида в позиции 2433.
 - b. Нуклеотидная последовательность, по меньшей мере, на 85% идентичная последовательности SEQ ID №: 4; предпочтительно по всей длине последовательности SEQ ID №: 4 от нуклеотида в позиции 55 до нуклеотида в позиции 2433, или
 - c. Нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 85% идентичной последовательности SEQ ID №: 5, предпочтительно по всей длине последовательности SEQ ID №: 5.
3. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1 или 2, при этом указанный аллель функционального гена-восстановителя кодирует белок пентатрикопептидного повтора (PPR), способный связываться с мРНК химерного гена ORF256, предпочтительно с нуклеотидной последовательностью, содержащей нуклеотиды 192-207 последовательности SEQ ID №: 2.
4. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1 - 3, при этом указанный аллель функционального гена-восстановителя получен из линии с учетным номером PI 583676 в базе данных Министерства сельского хозяйства США (USDA).

5. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. с 1 по 4, при этом аллель функционального гена-восстановителя состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 4 или кодирует полипептид последовательности SEQ ID №: 5.
6. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1-5, представляющая собой выделенную молекулу нуклеиновой кислоты.
7. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1-5, которая является экзогенной молекулой нуклеиновой кислоты.
8. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-5, представляющая собой химерную или рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты.
9. Полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1-5 или содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 85% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID №: 5, предпочтительно по всей длине последовательности SEQ ID №: 5.
10. Химерный ген, содержащий следующие функционально связанные элементы:
 - a. Экспрессируемый растением промотор;
 - b. Нуклеиновая кислота, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты любого из пп. 1-5 или кодирующая полипептид по п. 9; и, необязательно,
 - c. Функциональная область терминации транскрипции и полиаденилирования в клетках растения,при этом, по меньшей мере, один из указанных функционально связанных элементов является гетерологичным по отношению к одному или нескольким другим элементам.
11. Химерный ген по п. 10, в котором указанный промотор способен направлять экспрессию функционально связанной нуклеиновой кислоты, по меньшей мере, во время (раннего) развития пыльца и мейоза, например, в пыльнике или, более точно, тапетуме, или развивающихся микроспорах.
12. Клетки злаковых растений или злаковые растения или их семена, такие как клетки растения пшеница, или растение пшеница, или его семя содержащие и/или экспрессирующие молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1 и 8, полипептид по п. 9, или химерный ген по п. 10 или п. 11, в которых указанные нуклеиновая кислота, полипептид или химерный ген в каждом случае являются гетерологичными по отношению к указанному клетке растения, растению или семени.

13. Способ получения клетки злакового растения или растения или его семени, такого как клетка растения пшеницы или растения пшеницы или его семя, содержащий функциональный ген-восстановитель для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, или для повышения способности к восстановлению для цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) G-типа пшеницы в злаковом растении, таком как растение пшеницы, включающий стадию обеспечения указанной растительной клетки или растения молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1-8 или химерного гена по п. 10 или п. 11, причем указанная стадия обеспечения включает обеспечение путем трансформации, скрещивания, бэккроссирования, геномного редактирования или мутагенеза.
14. Способ получения клетки злакового растения или растения или его семени, такого как клетка растения пшеницы или растение пшеницы или его семя, со способностью к восстановлению для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, или для увеличения способности к восстановлению для цитоплазматической мужской стерильности пшеницы G-типа (ЦМС) в злаковом растении, таком как растение пшеницы, включающий стадии обеспечения полипептида по п. 9 или увеличения экспрессии полипептида по п. 9 в указанной клетке растения или растении или семени.
15. Способ преобразования невосстанавливаемого злакового растения, такого как растение пшеницы, в восстанавливаемое растение для цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) G-типа пшеницы, или для повышения способности к восстановлению для цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) G-типа пшеницы в злаковом растении, таком как растение пшеницы, включающий стадию модифицирования генома указанного растения для включения и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. от 1 до 8 или химерного гена по п. 10 или п. 11, при котором, данная стадия модифицирования включает в себя модифицирование трансформацией, скрещиванием, бэккроссированием, геномным редактированием и мутагенезом.
16. Способ преобразования невосстанавливаемых злаковых растений, таких как растение пшеницы, в восстанавливаемое растение для цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) G-типа пшеницы или для повышения потенциала восстановления для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы в злаковых растениях, таких как растение пшеницы, включающий в себя следующие стадии

модификации генома указанного растения для обеспечения или увеличения экспрессии полипептида по п. 9 в указанном растении.

17. Клетка злакового растения или злаковое растение или его семя, такое как клетка растения пшеницы или растение пшеницы или его семя, полученное согласно способу по любому из п.п. 13-16, предпочтительно в котором указанное растение обладает повышенной способностью к восстановлению для цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) G-типа пшеницы.
18. Клетка злакового растения, растение или семя по п. 12 или 17, в которой полипептид по п. 9 экспрессируется, по меньшей мере, во время (раннего) развития пыльца и мейоза, например, в пыльнике или, более точно, тапетуме или развивающейся микроспоре.
19. Клетка злакового растения, растение или семя по пп. 12, 17 или 18, представляющая собой гибридную клетку растения, растение или семя.
20. Способ отбора злакового растения, содержащего аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, или получения злакового растения, содержащего аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, включающий стадии:
 - a. Выявление наличия или экспрессии или транскрипции, из нуклеотидной последовательности, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4 от нуклеотидной позиции 55 до 2433 предпочтительно путем измерения уровня РНК транскрибируемых из нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 4 от нуклеотидной позиции 55 до 2433 или путем детектирования, по меньшей мере, части нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 4 от нуклеотидной позиции 55 до 2433 методами ДНК обнаружения; и, необязательно,
 - b. Отбор растения, содержащего и экспрессирующего указанный, по меньшей мере, один маркерный аллель, при котором указанное растение содержит указанный функциональный ген-восстановитель для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, предпочтительно расположенный на хромосоме 1A.
21. Способ восстановления фертильности в потомстве злакового растения с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа или для производства потомства

фертильных растений от родительского злакового растения с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа, включающий в себя следующие стадии:

- а. Обеспечение популяции потомства растений, полученного в результате скрещивания женского родительского злакового растения с мужским родительским злаковым растением, при котором женское родительское растение представляет собой злаковое растение с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа, а мужское родительское растение содержит и/или экспрессирует аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 1 или нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 4.;
 - б. Идентификация в указанной популяции потомства фертильного растения, содержащего и/или экспрессирующего нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 1 или нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 4; и, необязательно,
 - с. Отбор указанного потомства фертильного растения; и, необязательно,
 - д. Размножение потомства фертильного растения.
22. Способ идентификации и/или отбора злакового растения (например, пшеницы), содержащего аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, включающий стадии:
- а. Идентификации или детектирования в указанном растении присутствия, экспрессии или транскрипции нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-5 или полипептида по п. 9, или химерного гена по п. 10 или 11;
 - б. И, необязательно, отбор указанного растения, содержащего или экспрессирующего или транскрибирующего указанную нуклеиновую кислоту, или полипептид, или химерный ген.
23. Способ по п. 22, в котором указанный полипептид экспрессируется, по меньшей мере, во время (раннего) развития пыльца и мейоза, например, в пыльнике или, более точно, в тапетуме или развивающейся микроспоре.
24. Способ получения злакового растения, такого как растение пшеницы, содержащего аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, включающий стадии:

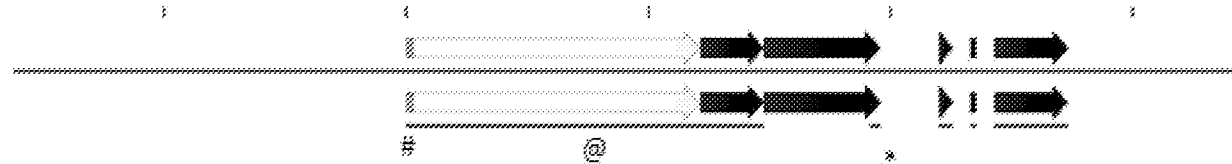
- a. Скрещивание первого злакового растения, такого как растение пшеницы по любому из пп. 12, 17 или 18, со вторым злаковым растением;
 - b. Идентификация и, необязательно, отбор потомства растения, содержащего или экспрессирующего аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 1 или нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4.
25. Способ получения гибридного семени, включающий стадии:
- a. Обеспечение мужского родительского злакового растения, такого как растение пшеницы по пп. 12,17 или 18, при котором указанное растение, содержит или экспрессирует указанный аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, причем указанный аллель функционального гена-восстановителя предпочтительно присутствует в гомозиготной форме;
 - b. Обеспечение женского родительского злакового растения которое является злаковым растением с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа;
 - c. Скрещивание указанного женского родительского злакового растения с указанным мужским родительским злаковым растением; и, необязательно,
 - d. Сбор семян.
26. Использование нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-8 для идентификации одного или нескольких дополнительных аллелей функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы.
27. Использование нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-8, полипептида по п. 9 или химерного гена по п. 10 или п. 11 для идентификации растения, содержащего аллель функционального гена-восстановителя для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы.
28. Использование растения по любому из пп. 12, 17 или 18 или растения, полученного способом по любому из пп. 13-16, при котором указанное растение содержит указанный функциональный ген- восстановитель для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы для восстановления фертильности в потомстве мужского злакового растения с цитоплазматической мужской стерильностью G-типа, такого как растение пшеницы.

29. Использование растения любого из пп. 12, 17 или 18 или растения, полученного способом любого из пп. 13-16, при котором указанное растение содержит указанный функциональный ген-восстановитель для цитоплазматической мужской стерильности G-типа пшеницы, для получения гибридного семени или популяции гибридных злаковых растений, таких как семена или растения пшеницы.
30. Способ повышения в злаковом растении экспрессии полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную последовательности аминокислот SEQ ID №: 5, путем модификации генома, предпочтительно направленной модификации или инженерии генома.
31. Способ по п. 30, в котором экспрессию увеличивают, по меньшей мере, в 2 раза.
32. Способ по п. 30, в котором экспрессию увеличивают, по меньшей мере, в 10 раз.
33. Клетка растения, содержащая химерный ген, кодирующий полипептид, по меньшей мере, на 95% идентичный аминокислотной последовательности SEQ ID №: 5.
34. Клетка растения по п. 33, представляющая собой клетку растения пшеницы

A

Геномная
последовательность

кДНК

**B**

```

1  MPRFSSTTPM SPPRLLLRLG ARHSSSTSHP SRIWDPHAAF AAATQRARSG TLTTEDAHHL
61 FDELLRQGNP VQERPLTNFL AALARAPASA FCSDGPALAV ALFGRLSRGA GRRVAQPNVF
121 TYGVLMDCCC RARRDLAIA FFARLLKTGL EANQVIFCTL LKGLCHAKRS DEALDVVLHR
181 MPELGCTPNV VAYTTVIHGF LKEGQVGKAC NLFHGMAQQG VAPDVVTYNS VIDALCKARA
241 MDKAEYFLRE MVDNGVVPNN VTYNSLIHGY SSLGHQKEAV RVLKEMTRQG IIPDVITCTS
301 LMTFLCKNGK SKEAAEIFDS MATKGLKHDA VSYAILLHGY ATEGCLVDMI NLFNSMDRDC
361 ILPNCHIFNI LIYAYAKSGK LDKAMLIFRD MQKQGVSPDA FTYSTLIHAF CKKGRLLDDAM
421 IKFNQMVDTG VRQGTAVYGS LIQGFCTHGD LVKGKELVTE MMNKGIPPPD IMFFHSIMQN
481 LCTEGRVVEA RDILGLIAHI GMRPNVCTFN ILIGGYCLVR KMEDASKIFH DMMSYGLEPS
541 NVTYGILING YCKNRRIDDG LILFKEMLRK GLKPTTFNN IILDGLFLAG RTVAAKEKFD
601 EMVESGVSMC ISTYSIVLRG LCRNNCSGEA ITLFQTLSAM DVKFNIRIVN IMIDAFFRVQ
661 RKQEAKDLFA AITANGLVAN VFTYSLMMTN LIKEGSVEEA DTLFLSMEMS GCTSNSWMLN
721 LIIRGLLEKG EIVKAGCYMS KVDAKSYSLE AKTVSLLIYL FSGKGKYREH IRLLPKYQF
781 LEEAATVEWF AI

```

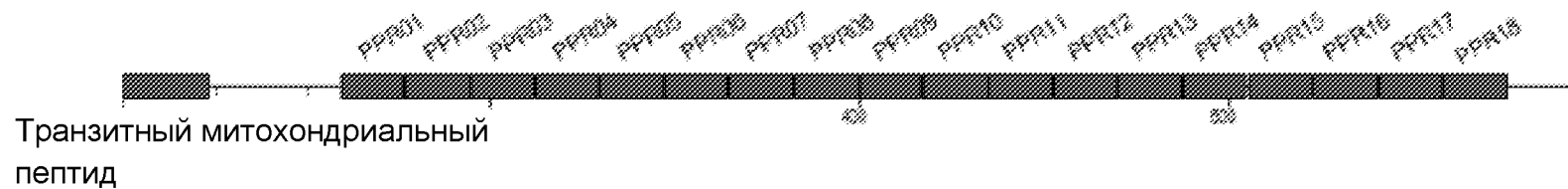
C

Рис. 1

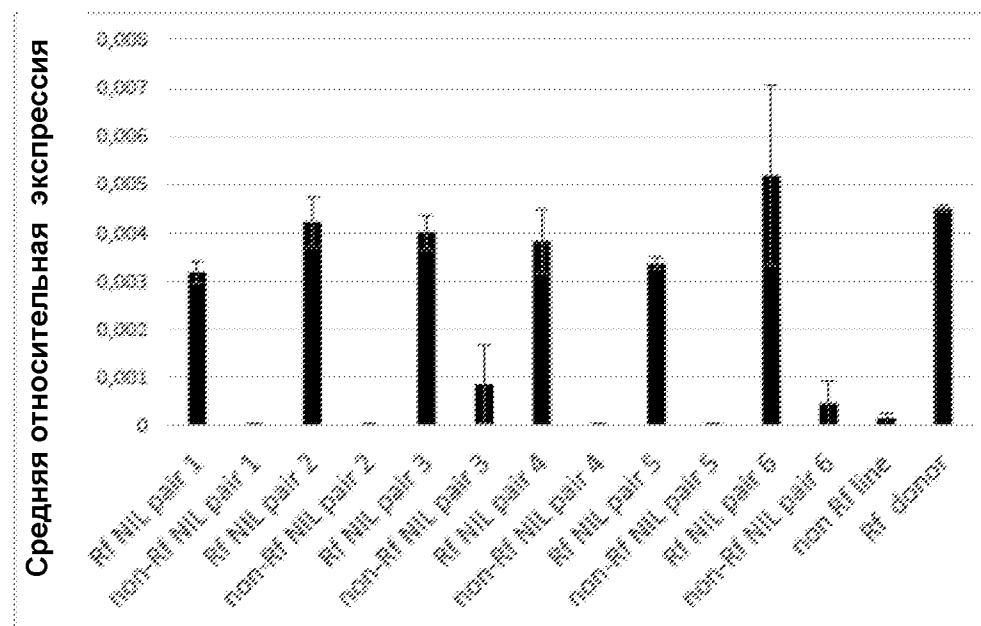


Рис. 2

Rf NIL pair - пара почти изогенных линий, содержащих ген Rf

Non-Rf NIL pair - пара почти изогенных линий, не содержащих ген Rf

Non Rf line – линия не содержащая ген Rf

Rf donor - донор содержащий ген Rf