

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202193108** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.04.05

(51) Int. Cl. *C12N 15/82* (2006.01)
A01H 6/46 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.07.01

(54) **ГЕН DMP ИНДУКЦИИ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКОГО ГАПЛОИДА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **201910445082.3**

(32) **2019.05.27**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2020/099680**

(87) **WO 2020/239137 2020.12.03**

(71) Заявитель:

**ЧАЙНА АГРИКАЛЧУРАЛ
ЮНИВЕРСИТИ (CN)**

(72) Изобретатель:

**Чэнь Шаоцзянь, Чжун Юй, Лю
Чэньсюй, Ци Сяолун, Ли Мэнжань,
Чэнь Баоцзянь, Цзяо Яньянь, Лю
Цзункай (CN)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Предложены ген DMP индукции партеногенетического гаплоида и его применение. Гены AtDMP8 и AtDMP9 индукции партеногенетического гаплоида клонированы из *Arabidopsis thaliana*. Эксперименты показали то, что мутации AtDMP8 и AtDMP9 могут давать индуцибельность партеногенетического гаплоида с обеспечением индукции двудольных сельскохозяйственных культур к образованию гаплоидов посредством партеногенетических способов. Настоящее изобретение было дополнительно подтверждено на томатах, и у томатов также обнаружили, что мутация SIDMP может давать индуцибельность партеногенетического гаплоида. Данное изобретение служит важной основой для расширения применения технологии селекции гаплоидов на двудольные растения и выявления биологического механизма получения партеногенетических гаплоидов. Принимая во внимание универсальность применения технологии селекции гаплоидов в современном промышленном разведении, данное изобретение имеет очень широкую сферу применения и перспективы на рынке.

A1

202193108

202193108

A1

ГЕН *DMP* ИНДУКЦИИ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКОГО ГАПЛОИДА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области сельскохозяйственной биотехнологии и генетической селекции сельскохозяйственных культур на основе технологии редактирования генома, в частности, к способу получения линии-индуктора материнского гаплоидного растения и ее применению, в частности, к применению мутанта по гену *DMP* индукции партеногенетического гаплоида, полученного с использованием технологии редактирования генома, в качестве линии-индуктора гаплоидного растения в индукции растения к генерации материнского гаплоида.

Предшествующий уровень техники

Селекция элитных самоопыляемых линий является основой и ключом для селекции элитного гибрида с использованием гетерозиса сельскохозяйственных культур. Однако, для получения более стабильной самоопыляемой линии требуется 7-8 поколений при использовании традиционных способов селекции и только 2 поколения при использовании способа гаплоидной селекции (Weber D F, 2014), что значительно сокращает цикл селекции. В настоящее время методика культуры пыльников *in vitro* является наиболее предпочтительной для стимулирования продукции гаплоида у двудольных сельскохозяйственных культур, которая имеет недостатки, заключающиеся в низкой эффективности, высокой зависимости от генотипа материалов и трудности при крупномасштабном применении. Хотя введение генетически модифицированного варианта центромер-специфичного гистона CENH3 в мутант *cenh3 Arabidopsis thaliana* и индуцирует продукцию гаплоидов, данный подход дает большое число зуплоидов во время индукции (Ravi, M, *et al*, 2010).

В настоящее время система технологии редактирования генов достигла высокого уровня и стабильности, однако она не может далее оказывать свой максимальный эффект в виду ограничения генетической трансформации из-за зависимости от материала и генотипа. Хотя редактирование может быть достигнуто посредством введения вектора редактирования генов в какой-либо легко трансформируемый материал-реципиент и его дальнейшей гибридизации с подлежащей редактированию мишенью (Li C *et al.*, 2017), возвратное скрещивание для

восстановления фона занимает длительное время и не может достигать 100%. Индукцию гаплоидов и методики редактирования генов объединяют для достижения редактирования генов целевого гаплоидного материала для получения гомозиготных редактируемых линий, что значительно сокращает по времени и расширяет диапазон применения гаплоидов и методик редактирования генов (Kelliher, T *et al.*, 2019; Wang, B *et al.*, 2019; Hu, N *et al.*, 2019). Однако, у двудольных растений индукция гаплоидов не может быть объединена с методиками редактирования генов из-за отсутствия способа получения гаплоида посредством биологической индукции.

Краткое изложение сущности изобретения

Задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить способ получения линии-индуктора гаплоидного растения.

Способ получения линии-индуктора гаплоидного растения, предложенный в данном изобретении, является следующим из А1) или А2):

А1) сайленсинг или ингибирование экспрессии и/или активности гена *DMP* в геноме растения или нокаутирование гена *DMP* с получением линии-индуктора гаплоидного растения;

А2) ингибирование активности белка *DMP* в растении с получением линии-индуктора гаплоидного растения;

данное растение является двудольным;

белок *DMP* представляет собой белок, представленный следующими из Б1), или Б2), или Б3), или Б4):

Б1) белок с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 6;

Б2) слитый белок, полученный путем присоединения метки к N-концу и/или C-концу белка, показанного в SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 6;

Б3) белок, имеющий такую же функцию, полученный путем замены и/или делеции и/или вставки одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 6;

Б4) белок, имеющий гомологию 75% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 6, и имеющий такую же функцию;

данный белок *DMP* имеет следующие функции: двудольное растение становится линией-индуктором гаплоидного растения при ингибировании в нем активности белка *DMP*. Активность белка *DMP* ингибируется таким образом, что данный белок *DMP* не экспрессируется или является неактивным.

Метка в вышеупомянутом B2) относится к полипептиду или белку, экспрессируемому при слиянии с интересующим белком с использованием генной инженерии ДНК *in vitro*, для облегчения экспрессии, выявления, отслеживания и/или очистки интересующего белка. Белковая метка может представлять собой метку Flag, метку His, метку MBP (основной белок миелина), метку HA, метку Muc, метку GST (глутатион-S-трансфераза) и/или метку SUMO.

Замена и/или делеция и/или вставка одного или нескольких аминокислотных остатков в вышеупомянутом B3) представляет собой замену и/или делецию и/или вставку не более чем 10 аминокислотных остатков.

Гомология 75% или более в вышеупомянутом B4) может составлять 80%, 85%, 90% или 95% или более.

Согласно способу получения линии-индуктора гаплоидного растения, ген *DMP* представляет собой ген, показанный в следующих из B1), или B2), или B3), или B4):

B1) молекула кДНК или молекула геномной ДНК, показанная в SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 5;

B2) молекула кДНК или молекула геномной ДНК, имеющая идентичность 75% или более с нуклеотидной последовательностью, определенной B1);

B3) молекула кДНК или молекула геномной ДНК, происходящая из двудольного растения и имеющая идентичность 75% или более с нуклеотидной последовательностью, определенной в B1);

B4) молекула кДНК или молекула геномной ДНК, которая гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, определенной в B1), или B2), или B3), в жестких условиях.

Ген *DMP* имеет следующие функции: двудольное растение становится линией-индуктором гаплоидного растения, когда ген *DMP* подвергается сайленсингу, или ингибированию, или нокаутированию в нем.

Термин «идентичность», как он использован здесь, относится к сходству последовательности с последовательностью природной нуклеиновой кислоты. «Идентичность» включает нуклеотидные последовательности, имеющие идентичность

75% или более, или 85% или более, или 90% или более, или 95% или более с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок, состоящий из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 6 по настоящему изобретению. Идентичность можно оценивать невооруженным глазом или с помощью компьютерной программы. С использованием компьютерной программы идентичность между двумя или более последовательностями может быть выражена в виде процентной доли (%), которую можно использовать для оценки идентичности между родственными последовательностями.

В способе получения линии-индуктора гаплоидного растения способ сайленсинга или ингибирования экспрессии и/или активности гена *DMP* или нокаутирования гена *DMP* в геноме растения включает уменьшение уровня экспрессии гена *DMP* в геноме растения или подвергание гена *DMP* в геноме растения делеционной мутации, или инсерционной мутации, или замене основания.

Кроме того, когда двудольное растение представляет собой *Arabidopsis thaliana*, ген *DMP* представляет собой ген *AtDMP8* и/или ген *AtDMP9*; белок DMP представляет собой белок AtDMP8 и/или белок AtDMP9;

данный способ включает сайленсинг или ингибирование экспрессии и/или активности гена *AtDMP8* и/или гена *AtDMP9* в геноме *Arabidopsis thaliana*, или нокаутирование гена *AtDMP8* и/или гена *AtDMP9*, или ингибирование активности белка AtDMP8 и/или белка AtDMP9 с получением линии-индуктора гаплоида *Arabidopsis thaliana*.

Когда двудольное растение представляет собой томат, ген *DMP* представляет собой ген *SIDMP*; белок DMP представляет собой белок SIDMP; данный способ включает сайленсинг или ингибирование гена *SIDMP*, или нокаутирование гена *SIDMP*, или ингибирование активности белка SIDMP в геноме томата с получением линии-индуктора гаплоида томата.

Кроме того, сайленсинг или ингибирование экспрессии и/или активности гена *AtDMP8* и/или гена *AtDMP9* в геноме *Arabidopsis thaliana*, или нокаутирование гена *AtDMP8* и/или гена *AtDMP9* включает уменьшение экспрессии гена *AtDMP8* и/или гена *AtDMP9* в геноме *Arabidopsis thaliana* или подвергание гена *AtDMP8* и/или гена *AtDMP9* в геноме *Arabidopsis thaliana* делеционной мутации, или инсерционной мутации, или замене основания.

Сайленсинг или ингибирование экспрессии и/или активности гена *SIDMP* в геноме томата или нокаутирование гена *SIDMP* включает уменьшение уровня экспрессии гена *SIDMP* в геноме томата или подвергание гена *SIDMP* в геноме томата делеционной мутации, или инсерционной мутации, или замене основания.

Способ уменьшения экспрессии гена *DMP* в геноме растения включает РНКи интерференцию. РНКи интерференция включает интерференцию одноцепочечной РНК, такой как миРНК (микроРНК), или интерференцию двухцепочечной РНК, такой как киРНК (короткая интерферирующая РНК), дцРНК (двухцепочечная РНК), кшРНК (короткая шпилечная РНК) и т.д.

Способ подвергания гена *DMP* в геноме растения делеционной мутации, или инсерционной мутации, или замене основания включает CRISPR/Cas9, или TELLEN, или вставку Т-ДНК, или EMS (этилметансульфонат) мутагенез.

Кроме того, способ подвергания гена *DMP* в геноме растения делеционной мутации, или инсерционной мутации, или замене основания включает CRISPR/Cas9. Данный способ подвергания гена *DMP* в геноме растения делеционной мутации, или инсерционной мутации, или замене основания включает следующие стадии: введение вектора CRISPR/Cas9, содержащего целевую последовательность, в растение с получением линии-индуктора гаплоидного растения.

В конкретном примере настоящего изобретения, когда двудольное растение представляет собой *Arabidopsis thaliana*, целевая последовательность CRISPR/Cas9 находится в положениях 98-117 SEQ ID NO: 1, положениях 290-309 SEQ ID NO: 3, положениях 368-387 SEQ ID NO: 3 и положениях 509-528 SEQ ID NO: 1. Вектор CRISPR/Cas9, содержащий целевую последовательность, представляет собой рекомбинантный вектор, полученный соединением молекулы ДНК, представленной в SEQ ID NO: 7 (экспрессионный элемент енРНК (единая направляющая РНК)), молекулы ДНК, представленной в SEQ ID NO: 9 (экспрессионный элемент Cas9) и молекулы ДНК, представленной в SEQ ID NO: 10 (экспрессионный элемент флуоресцентного белка), с вектором pICSL4723 методом «золотых ворот».

В конкретном примере настоящего изобретения, когда двудольное растение представляет собой томат, целевые последовательности CRISPR/Cas9 находятся в положениях 76-95 SEQ ID NO: 5 и положениях 247-266 SEQ ID NO: 5. Вектор CRISPR/Cas9, содержащий целевую последовательность, представляет собой рекомбинантный вектор, полученный соединением молекулы ДНК, представленной в

SEQ ID NO: 8 (экспрессионный элемент енРНК), молекулы ДНК, представленной в SEQ ID NO: 11 (экспрессионный элемент Cas9), молекулы ДНК, представленной в SEQ ID NO: 10 (экспрессионный элемент флуоресцентного белка), и молекулы ДНК, представленной в SEQ ID NO: 12 (экспрессионный элемент NptII), с вектором pICSL4723 методом «золотых ворот».

Другая задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить способ получения линии-индуктора гаплоидного растения, включающего стадию самоопыления линии-индуктора гаплоидного растения по меньшей мере один раз, в частности один раз.

Способ получения линии-индуктора гаплоидного растения дополнительно включает стадию скрининга мутантов по гену *DMP*. Мутант по гену *DMP* представляет собой растение с мутацией гена *DMP*, и мутант по гену *DMP* представляет собой гетерозиготный мутант по гену *DMP* или гомозиготный мутант по гену *DMP*.

Согласно способу получения линии-индуктора гаплоидного растения, линия-индуктор гаплоидного растения конкретно включает мутантную линию T1-34 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию T1-6 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию T1-11 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию T1-19 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию T1-24 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию T1-25 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию T1-28 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию T1-32 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию T2-33 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию T2-38 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию *sldmp-1* томата или мутантную линию *sldmp-2* томата;

различие между геномной ДНК мутантной линии T1-34 *Arabidopsis thaliana* и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 115-512 SEQ ID NO: 1 и имеет место вставка основания (T) в другой хромосоме в положениях 114-115 SEQ ID NO: 1;

различие между геномной ДНК мутантной линии T1-6 *Arabidopsis thaliana* и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 115-512 SEQ ID NO: 1 и имеет место делеция фрагмента в другой хромосоме в положениях 113-114 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место вставка фрагмента в обеих хромосомах в положениях 160-161 SEQ ID NO:

3, где нуклеотидная последовательность вставленного фрагмента показана как SEQ ID NO: 13;

различие между геномной ДНК мутантной линии T1-11 *Arabidopsis thaliana* и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место вставка основания (Т) в положениях 114-115 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место вставка основания (Т) в одной хромосоме в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3 и имеет место вставка фрагмента в другой хромосоме в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3, где нуклеотидная последовательность вставленного фрагмента показана как SEQ ID NO: 13;

различие между геномом мутантной линии T1-19 *Arabidopsis thaliana* и геномом *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место делеция основания (Т) в одной хромосоме в положении 114 SEQ ID NO: 1 и имеет место делеция фрагмента в другой хромосоме в положениях 115-511 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 161-560 SEQ ID NO: 3 и имеет место делеция фрагмента в другой хромосоме в положениях 161-564 SEQ ID NO: 3;

различие между геномной ДНК мутантной линии T1-24 *Arabidopsis thaliana* и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 115-512 SEQ ID NO: 1 и имеет место вставка основания (Т) в другой хромосоме в положениях 114-115 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 161-560 SEQ ID NO: 3 и имеет место делеция фрагмента в другой хромосоме в положениях 159-160 SEQ ID NO: 3;

различие между геномной ДНК мутантной линии T1-25 *Arabidopsis thaliana* и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место делеция основания (Т) в одной хромосоме в положении 114 SEQ ID NO: 1 и имеет место вставка фрагмента CGT в другой хромосоме в положениях 114-115 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 161-162 SEQ ID NO: 3 и имеет место вставка основания (А) в другой хромосоме в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3;

различие между геномной ДНК мутантной линии T1-28 *Arabidopsis thaliana* и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 115-512 SEQ ID NO: 1 и имеет место делеция основания (T) в другой хромосоме в положении 114 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место вставка основания (A) в обеих хромосомах в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3;

различие между геномной ДНК мутантной линии T1-32 *Arabidopsis thaliana* и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 115-511 SEQ ID NO: 1 и имеет место вставка основания (T) в другой хромосоме в положениях 114-115 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место делеция основания (C) в обеих хромосомах в положении 161 SEQ ID NO: 3;

отличие геномной ДНК мутантной линии T2-33 *Arabidopsis thaliana* и *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место вставка основания (T) в обеих хромосомах в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3 и имеет место вставка фрагмента в обеих хромосомах в положениях 561-562 SEQ ID NO: 3, где нуклеотидная последовательность вставленного фрагмента показана как SEQ ID NO: 14;

различие между геномной ДНК мутантной линии T2-38 *Arabidopsis thaliana* и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место делеция фрагмента в обеих хромосомах в положениях 115-127 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место вставка основания (T) и основания (G) в обеих хромосомах в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3 и в положениях 562-563 SEQ ID NO: 3, соответственно;

различие между геномной ДНК мутантной линии томата *sldmp-1* и геномной ДНК томата дикого типа AC заключается только в том, что в гене, кодирующем белок SIDMP, имеет место вставка основания (C) в обеих хромосомах в положениях 92-93 SEQ ID NO: 5;

различие между геномной ДНК мутантной линии томата *sldmp-2* и геномной ДНК томата дикого типа AC заключается только в том, что в гене, кодирующем белок

SIDMP, имеет место делеция фрагмента в обеих хромосомах в положениях 93-249 SEQ ID NO: 5.

Другая задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить способ получения гаплоидного растения.

Способ получения гаплоидного растения, предложенный в изобретении, включает следующие стадии: самоопыление линии-индуктора гаплоидного растения или его потомства, полученного данным способом, или скрещивание линии-индуктора гаплоидного растения или его потомства с другими растительными материалами в качестве родителя мужского пола с получением самоопыленного потомства или межвидового потомства, а именно гаплоидного растения; где данное растение представляет собой двудольное растение.

Кроме того, способ получения гаплоидного растения дополнительно включает следующие стадии: проведение идентификации флуоресцентного мечения, и/или идентификации признаков гаплоида, и/или идентификации пloidии листьев, и/или идентификации молекулярного маркера на самоопыленном потомстве или межвидовом потомстве одного растения и отбор одиночных растений потомства, идентифицированных как гаплоиды по меньшей мере одним способом, в качестве гаплоидных растений.

Кроме того, способ идентификации флуоресцентного мечения может быть осуществлен следующим образом: скрещивание линии-индуктора гаплоидного растения, несущей экспрессионный элемент флуоресцентного белка в качестве родителя мужского пола, с родителем женского пола с получением межвидового потомства и проведение оценки на предмет того, является ли семя, подлежащее анализу, гаплоидом или диплоидом посредством выявления наличия флуоресцентного сигнала у данного семени межвидового потомства; где, если семя, подлежащее анализу, не показывает флуоресценции или показывает слабую флуоресценцию, данное семя является гаплоидом или кандидатом; если семя, подлежащее анализу, показывает сильную флуоресценцию, данное семя является диплоидом или кандидатом. Кроме того, являются ли семена, подлежащие анализу, флуоресцентными или нет, выявляют посредством флуоресцентного излучения. Кроме того, родитель мужского пола несет экспрессионный элемент флуоресцентного белка TagRFP, управляемый промотором *AtOLEO1*, таким образом, что можно оценить, является ли он гаплоидом или

диплоидом, в зависимости от того, имеет ли гибридное потомство красную флуоресценцию.

Способ идентификации признаков гаплоида может быть осуществлен следующим образом: если растение, подлежащее анализу, имеет признаки карлика, узкие листья, растущие вверх, компактный тип растений и мужскую стерильность, данное растения является гаплоидом или кандидатом; если растение, подлежащее анализу, имеет признаки высокого растения, широкие и рассредоточенные листья и нормальную фертильность, данное растения является диплоидом или кандидатом.

Способ идентификации пloidии листьев может быть осуществлен следующим образом: выделение клеточных ядер молодых листьев растения, подлежащего анализу, и взятие листьев диплоидного растения в качестве контроля; выявление сигнала посредством проточного цитометра: сначала выявление сигнала диплоидного ядра и принятие пика сигнала диплоидного ядра за 50 (поскольку генетические материалы в диплоидных клетках находятся в двойном количестве относительно гаплоидных клеток, пик сигнала гаплоидного ядра появляется около 25). Если пик сигнала ядра растения, подлежащего анализу, оказывается около 25, данное растение является гаплоидом или кандидатом; и если пик сигнала растения, подлежащего анализу, оказывается около 50, и положение обогащения интенсивности сигнала растения, подлежащего анализу, является таким же, как и у диплоидного ядра, данное растение является диплоидом или кандидатом.

Идентификация молекулярного маркера может быть осуществлена следующим образом: проведение ПЦР-амплификации посредством применения полиморфного праймера между родителем мужского пола (линией-индуктором гаплоида – родителем женского пола) и родителем женского пола, и проведение оценки на предмет того, является ли растение, подлежащее анализу, гаплоидом или диплоидом согласно продукту ПЦР-амплификации; где, если данный продукт амплификации растения, подлежащего анализу, имеет только картину полос родителя женского пола без картины полос родителя мужского пола, данное растение является гаплоидом или кандидатом; если данный продукт амплификации растения, подлежащего анализу, имеет гетерозиготную картину полос родителя мужского пола и родителя женского пола, данное растение является диплоидом или кандидатом.

Линия-индуктор гаплоидного растения и гаплоидное растение, полученные данным способом, также входят в объем данного изобретения.

Данная линия-индуктор гаплоидного растения и данное гаплоидное растение включают не только клетки, ткани и органы, происходящие от линии-индуктора гаплоидного растения и гаплоидного растения, такие как семена, листья, плоды, стебли, цветки, корни, но также материалы для размножения, полученные от линии-индуктора гаплоидного растения и гаплоидного растения, такие как группа, состоящая из пыльцы, завязей, семязачатков, зародышей, эндоспермов, яйцеклеток, эмбрионов на стадии дробления, корней, кончиков корней, гипокотилей, семядолей, стеблей, листьев, цветков, пыльников, семян, меристематических клеток, протопластов и культур ткани.

Ген *AtDMP8* в мутантной линии *Arabidopsis thaliana*, или ген *AtDMP9* в мутантной линии *Arabidopsis thaliana*, или ген *SIDMP* в мутантной линии томата в приведенном выше способе также входят в объем настоящего изобретения.

Любое из следующих применений Г1) – Г5) также входит в объем настоящего изобретения:

Г1) применение линии-индуктора гаплоидного растения, полученной данным способом, в культивировании гаплоидных растений;

Г2) применение вещества для сайленсинга или ингибирования экспрессии и/или активности гена *AtDMP8* и/или гена *AtDMP9* в геноме растения или нокаутирования гена *AtDMP8* и/или гена *AtDMP9* или вещества для ингибирования активности белка *AtDMP8* и/или белка *AtDMP9* в культивировании линий-индукторов гаплоидного растения или гаплоидных растений;

Г3) применение вещества для сайленсинга или ингибирования экспрессии и/или активности гена *SIDMP* в геноме растения или нокаутирования гена *SIDMP* или вещества для ингибирования активности белка *SIDMP* в культивировании линий-индукторов гаплоидного растения или гаплоидных растений;

Г4) применение белка *AtDMP8* или родственного ему биологического материала и/или белка *AtDMP9* или родственного ему биологического материала в регулировании показателя индукции линий-индукторов гаплоидного растения, или в улучшении показателя индукции линий-индукторов гаплоидного растения, или в культивировании линий-индукторов гаплоидного растения или гаплоидных растений;

Г5) применение белка *SIDMP* или родственных ему биологических материалов в регулировании показателя индукции линий-индукторов гаплоидного растения, или в улучшении показателя индукции линий-индукторов гаплоидного растения, или в культивировании линий-индукторов гаплоидного растения или гаплоидных растений.

В любом из вышеупомянутых применений или способов белок AtDMP8 является белком, представленным в а1), или а2), или а3), или а4):

а1) белок с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 2;

а2) слитый белок, полученный путем присоединения метки к N-концу и/или C-концу белка, показанного в SEQ ID NO: 2;

а3) белок, имеющий такую же функцию, полученный путем замены и/или делеции и/или вставки одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2;

а4) белок, имеющий гомологию 75% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 2, и имеющий такую же функцию;

белок AtDMP9 является белком, представленным в следующих из б1), или б2), или б3), или б4):

б1) белок с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 4;

б2) слитый белок, полученный путем присоединения метки к N-концу и/или C-концу белка, показанного в SEQ ID NO: 4;

б3) белок, имеющий такую же функцию, полученный путем замены и/или делеции и/или вставки одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 4;

б4) белок, имеющий гомологию 75% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 4, и имеющий такую же функцию.

Белок SIDMP является белком, представленным в следующих из в1), или в2), или в3), или в4):

в1) белок с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 6;

в2) слитый белок, полученный путем присоединения метки к N-концу и/или C-концу белка, показанного в SEQ ID NO: 6;

в3) белок, имеющий такую же функцию, полученный путем замены и/или делеции и/или вставки одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 6;

в4) белок, имеющий гомологию 75% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 6, и имеющий такую же функцию.

Биоматериал, родственный белку AtDMP8, или AtDMP9, или SIDMP, представляет собой любое из следующего г1) – г12):

г1) молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок AtDMP8, или AtDMP9, или SIDMP;

г2) экспрессионная кассета, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по г1);

г3) рекомбинантный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по г1);

г4) рекомбинантный вектор, содержащий экспрессионную кассету по г2);

г5) рекомбинантный микроорганизм, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по г1);

г6) рекомбинантный микроорганизм, содержащий экспрессионную кассету по г2);

г7) рекомбинантный микроорганизм, содержащий рекомбинантный вектор по г3);

г8) рекомбинантный микроорганизм, содержащий рекомбинантный вектор по г4);

г9) трансгенная линия растительных клеток, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по г1);

г10) трансгенная линия растительных клеток, содержащая экспрессионную кассету по г2);

г11) трансгенная линия растительных клеток, содержащая рекомбинантный вектор по г3);

г12) трансгенная линия растительных клеток, содержащая рекомбинантный вектор по г4).

Кроме того, молекула нуклеиновой кислоты по г1) представляет собой ген, показанный в следующих из 1), или 2), или 3), или 4):

1) молекула кДНК или молекула геномной ДНК с кодирующей последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 5;

2) молекула кДНК или молекула геномной ДНК, имеющая идентичность 75% или более с нуклеотидной последовательностью, определенной в 1), и кодирующая белок AtDMP8, или AtDMP9, или SIDMP;

3) молекула кДНК или молекула геномной ДНК, происходящая из двудольного растения и имеющая идентичность 75% или более с нуклеотидной последовательностью, определенной в 1), и кодирующая белок AtDMP8, или AtDMP9, или SIDMP;

4) молекула кДНК или молекула геномной ДНК, гибридизующаяся с нуклеотидной последовательностью, определенной в 1), или 2), или 3), в жестких условиях и кодирующая белок AtDMP8, или AtDMP9, или SIDMP;

где SEQ ID NO: 1 представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок AtDMP8; SEQ ID NO: 3 представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок AtDMP9; и SEQ ID NO: 5 представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок SIDMP.

Кроме того, вещество, осуществляющее нокаутирование гена *AtDMP8* и/или гена *AtDMP9*, или вещество, осуществляющее нокаутирование гена *SIDMP*, представляет собой вектор CRISPR/Cas9, содержащий целевую последовательность, как описано выше.

В любом из вышеупомянутых применений, или способов, или растений, где данные растения являются двудольными, в частности, *Arabidopsis thaliana* или томат; в частности, *Arabidopsis thaliana* может представлять собой *Arabidopsis thaliana* дикого типа (Col-0) или ms1; в частности, томат может представлять собой томат дикого типа AC или Micro-Tom или материал поколения F₁, полученный скрещиванием томата AC с Micro-Tom.

Краткое описание графических материалов

На Фиг. 1 представлен график, на котором показано сравнение гаплоидов и диплоидов *Arabidopsis thaliana*. Растения, указанные стрелками, являются гаплоидами.

На Фиг. 2 представлен график, на котором показано сравнение гаплоидов и диплоидов *Arabidopsis thaliana* после стрелкования.

На Фиг. 3 представлен график, на котором показано сравнение результатов проточной цитометрии гаплоидов и диплоидов *Arabidopsis thaliana*.

На Фиг. 4 показан график идентификации флуоресценции гаплоидов *Arabidopsis thaliana*. На панели (а) показан фенотип семян *Arabidopsis thaliana* под белым светом, на панели (б) показан фенотип семян *Arabidopsis thaliana* при флуоресценции, и семена, показанные стрелками, являются гаплоидами.

На Фиг. 5 показано изображение геля подтверждения молекулярного маркера гаплоидов и диплоидов *Arabidopsis thaliana*. М означает молекулярный маркер 2К, I представляет картину полос материала родителя женского пола, II представляет картину полос материала родителя мужского пола, III представляет картину полос гаплоида, и IV представляет картину полос диплоида.

На Фиг. 6 представлен график, на котором показано сравнение растений и плодов томата дикого типа и мутантов *sldmp*. На панелях (а) и (б) показаны растения томата дикого типа и мутанта *sldmp*, соответственно, и на панелях (в) и (г) показаны полученные в результате самоопыления плоды томата дикого типа и мутанта *sldmp*, соответственно.

На Фиг. 7 показано изображение флуоресцентной экспрессии семян томата. На панелях (а) и (б) показаны характеристики непроросших и проросших семян томата, сфотографированных в светлом поле, и на панелях (в) и (г) показаны характеристики непроросших и проросших семян томата, сфотографированных при флуоресценции.

На Фиг. 8 представлен график, на котором показано сравнение результатов проточной цитометрии гаплоидов и диплоидов томата.

На Фиг. 9 показана схематичная диаграмма структуры главных элементов в рекомбинантном векторе. На панелях (а) и (б) показана схематичная диаграмма структуры вектора *Arabidopsis thaliana* и томата, соответственно.

Наилучший способ осуществления изобретения

Следующие примеры способствуют лучшему пониманию настоящего изобретения, но не ограничивают настоящее изобретение. Экспериментальные способы в следующих примерах являются традиционными, если не указано иное. Экспериментальные материалы, используемые в следующих примерах, приобретали у поставщиков стандартных биохимических реагентов, если не указано иное. В количественных экспериментах следующих примеров эксперименты проводят в трех повторностях, и результаты приводят к среднему значению.

Вектор pICSL4723 в следующих примерах описан в документе "Castel, B. and L. Tomlinson, et al. (2019). Optimization of T-DNA architecture for Cas9-mediated mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PloS one*, 14(1).", общедоступном от Китайского сельскохозяйственного университета, данный экспериментальный материал используют только для повторения релевантных экспериментов по настоящему изобретению и не может быть использован в других целях.

Arabidopsis thaliana дикого типа Col-0 и ms1 в следующих примерах описан в литературе "Rosso, M. G. and Y. Li, et al. (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol* 53 (1-2): 247-59.", общедоступной от Китайского сельскохозяйственного университета, данный биологический материал использован только для повторения

релевантных экспериментов по настоящему изобретению и не может быть использован в других целях.

Томат дикого типа AC в следующих примерах описан в литературе "Yuan, G. and C. Jia, et al. (2010). Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress. *Scientia Horticulturae* 126 (2): 103-108.", общедоступной от Китайского сельскохозяйственного университета, данный биологический материал использован только для повторения релевантных экспериментов по настоящему изобретению и не может быть использован в других целях.

Томат дикого типа Micro-Tom в следующих примерах описан в литературе "Sun, H. and S. Uchii, et al. (2006). A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant and Cell Physiology* 47 (3): 426-431.", общедоступной от Китайского сельскохозяйственного университета, данный биологический материал использован только для повторения релевантных экспериментов по настоящему изобретению и не может быть использован в других целях.

CDS (кодирующая) последовательность гена *AtDMP8* в данном изобретении показана в положениях 95-826 SEQ ID NO: 1 в перечне последовательностей, и аминокислотная последовательность белка, кодируемого геном *AtDMP8*, показана в SEQ ID NO: 2.

CDS последовательность гена *AtDMP9* в данном изобретении показана в положениях 141-875 SEQ ID NO: 3 в перечне последовательностей, и аминокислотная последовательность белка, кодируемого геном *AtDMP9*, показана в SEQ ID NO: 4.

CDS последовательность гена *SIDMP* в данном изобретении показана в положениях 1-678 SEQ ID NO: 5 в таблице последовательностей, и аминокислотная последовательность белка, кодируемого геном *SIDMP*, показана в SEQ ID NO: 6.

Пример 1. Получение нокаутированных по гену *AtDMP8* и/или по гену *AtDMP9* мутантов *Arabidopsis thaliana* и их применения

I. Гены *AtDMP8* и/или *AtDMP9* нокаутировали с использованием системы CRISPR/Cas9

Гены *AtDMP8* и/или *AtDMP9* в *Arabidopsis thaliana* нокаутировали посредством системы CRISPR/Cas9 с получением нокаутированных по гену *AtDMP8* и/или по гену *AtDMP9* мутантов *Arabidopsis thaliana*. Конкретные стадии были следующими:

1. Выбор последовательностей енРНК

Последовательности целевого сайта разрабатывали на гене *AtDMP8* и/или гене *AtDMP9*, соответственно, и их длина составляла 20 п.о. (пар оснований).

Целевой сайт 1 находился в положениях 98-117 SEQ ID NO: 1 и 144-163 SEQ ID NO: 3, и последовательность целевого сайта 1 енРНК представляла собой GAGAAAACAGAGGAAAGCGT.

Целевой сайт 2 находился в положениях 290-309 SEQ ID NO: 3 и последовательность целевого сайта 2 енРНК представляла собой AAGAGGTCGAAAACGTCGCA.

Целевой сайт 3 находился в положениях 368-387 SEQ ID NO: 3 и последовательность целевого сайта 3 енРНК представляла собой TCAAGAGTGTTCCGTGTCGGA.

Целевой сайт 4 находился в положениях 509-528 SEQ ID NO: 1 и 558-577 SEQ ID NO: 3, и последовательность целевого сайта 4 енРНК представляла собой ATGACAACCGCGAGTCCACG.

2. Конструирование вектора CRISPR/Cas9

Вектор CRISPR/Cas9 представляет собой рекомбинантный вектор (структурная диаграмма вектора показана на Фиг. 9а), полученный соединением молекулы ДНК, показанной в SEQ ID NO: 7 (экспрессионный элемент енРНК), молекулы ДНК, показанной в SEQ ID NO: 9 (экспрессионный элемент Cas9), и молекулы ДНК, показанной в SEQ ID NO: 10 (экспрессионный элемент флуоресцентного белка) с вектором pICSL4723 с использованием метода «золотых ворот». Молекула ДНК, показанная в SEQ ID NO: 7, последовательно содержит кодирующую последовательность енРНК, нацеленной на целевой сайт 1, кодирующую последовательность енРНК, нацеленной на целевой сайт 2, кодирующую последовательность енРНК, нацеленной на целевой сайт 3, и кодирующую последовательность енРНК, нацеленной на целевой сайт 4, с промотором *AtU6-26*, используемым для инициации экспрессии кодирующей последовательности енРНК, находящейся около начала каждой кодирующей последовательности енРНК.

3. Получение трансгенных растений

Вектор CRISPR/Cas9, полученный на стадии 2, трансформировали в компетентные клетки агробактерии GV3101 посредством теплового шока (компетентные клетки агробактерии GV3101 приобретали у Beijing Aosen Dingxin

Biotechnology Co., Ltd., и они являются общедоступными) с получением рекомбинантного штамма GV3101/CRISPR/Cas9.

Затем цветonos *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 инфицировали рекомбинантным штаммом GV3101/CRISPR/Cas9 посредством применения способа трансформации инфицированием цветonosов *Arabidopsis thaliana* агробактерией (т.е. рекомбинантную агробактерию подвергали расширенному размножению при 28°C, и цветonos *Arabidopsis thaliana* инфицировали раствором размноженной агробактерии), и поколение T1 трансгенного растения *Arabidopsis thaliana* получили после скрининга красной флуоресценции.

4. Идентификация трансгенных растений с мутацией гена *AtDMP8* и/или гена *AtDMP9*

Листья трансгенного растения *Arabidopsis thaliana* поколения T1, полученного на стадии 3, отбирали, выделяли геномную ДНК в качестве матрицы, и проводили ПЦР-амплификацию посредством применения следующих двух пар праймеров, соответственно, с получением продуктов ПЦР-амплификации разных линий.

Последовательности праймеров для выявления мутантной последовательности гена *AtDMP8* были следующими:

DMP8F1: TGCGAAATGAGATTGGTTTTGGG;

DMP8R1: AAACACCCTGTGACTCTCCG.

Последовательности праймеров для выявления мутантной последовательности гена *AtDMP9* были следующими:

DMP9F1: ATAACCGTCAATAACCGCCG;

DMP9R2: CCAGTCATGCAACCAACACC.

Продукты ПЦР-амплификации разных линий подвергали секвенированию по Сэнджеру, и результаты секвенирования сравнивали с *AtDMP8* и *AtDMP9 Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0, соответственно. Генотипы *AtDMP8* и *AtDMP9*, соответственно, идентифицировали согласно следующим принципам.

Если последовательность из последовательности целевого сайта имела характеристику дублета, генотип данной линии был гетерозиготным (т.е. ген *AtDMP8* и/или ген *AtDMP9* мутировал на одной из двух гомологичных хромосом и не мутировал на другой хромосоме), и данная линия представляла собой гетерозиготную мутантную линию трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T1;

Для последовательности с характеристиками специфичного синглета из последовательности целевого сайта, если она была такой же, как последовательность гена *AtDMP8* и *AtDMP9 Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0, генотип данной линии был генотипом дикого типа, то есть, не было мутации на последовательности гена *AtDMP8* и *AtDMP9*; если она отличалась от последовательности гена *AtDMP8* и/или *AtDMP9 Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0, генотип данной линии был гомозиготным (ген *AtDMP8* и/или ген *AtDMP9* мутировал на обеих гомологичных хромосомах), данная линия представляла собой гомозиготную мутантную линию трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T1.

Результаты идентификации показаны в Таблицах 1 и 2 (в Таблицах 1 и 2 описаны мутации генов *AtDMP8* и *AtDMP9* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T1, соответственно): среди 41 трансгенного растения *Arabidopsis thaliana* поколения T1 имелось 33 трансгенных растений поколения T1 с мутацией гена *AtDMP8*, из которых 2 растения имели гомозиготную мутацию в гене *AtDMP8*, и 17 растений имели биаллельную мутацию в гене *AtDMP8*. Имелось 28 трансгенных растений поколения T1 с мутацией гена *AtDMP9*, из которых 5 растений имели гомозиготную мутацию в гене *AtDMP9*, и 7 растений имели биаллельную мутацию в гене *AtDMP9*. Имелось 12 растений с гомозиготными/биаллельными мутациями в *AtDMP8* и *AtDMP9*. Индивиды, которые возникали в результате мутации со сдвигом рамки считывания (делеция, не кратная 3 основаниям), среди гомозиготных/биаллельных мутантных индивидов отбирали далее на идентификацию фенотипа. Имелось три типа гомозиготной мутации/биаллельной мутации *AtDMP8*, гомозиготной мутации/биаллельной мутации *AtDMP9* и гомозиготной мутации/биаллельной мутации *AtDMP8* и *AtDMP9*.

Таблица 1. Типы мутаций гена *AtDMP8* в трансгенном *Arabidopsis thaliana* поколения T1

Серийный номер	<i>AtDMP8</i>	аллель 1	аллель 2
T1-1	Биаллельная мутация	GAAAG-----	GGGGCGTCGGAATCA..GAC TCCACGT
T1-2	Гетерозиготная мутация	-----CTCGC	WT (дикий тип)
T1-3	Биаллельная мутация	GAAAGACGTCGGAATCA..GAC TCCACGT	GGGTCGTCGGAATCA..GAC TCCACGT
T1-4	Дикий тип	WT	WT

T1-5	Дикий тип	WT	WT
T1-6	Биаллельная мутация	GAAAG-----	GGAA-- GTCGGAATCA..GACTCCAC GT
T1-7	Гетерозиготная мутация	GAAAGACGTCGGAATCA..GAC TCCACGT	WT
T1-8	Гетерозиготная мутация	GAAAGGCGTCGGAATCA..GAC TCCACGT	WT
T1-9	Биаллельная мутация	GAAAGTCGTCGGAATCA..GAC TCCACGT	GGGTCTG-- GGAATCA..GACTCCACGT
T1-10	Биаллельная мутация	GAAAG-----	GGGGCGTCGGAATCA..GAC TCCACGT
T1-11	Гомозиготная мутация	GAAAGGCGTCGGAATCA..GAC TCCACGT	GGGGCGTCGGAATCA..GAC TCCACGT
T1-12	Биаллельная мутация	GAAAGGCGTCGGAATCA..GAC TCCACGT	GGG- GTCGGAATCA..GACTCCAC GT
T1-13	Дикий тип	WT	WT
T1-14	Гетерозиготная мутация	GAAAGGCGTCGGAATCA..GAC TCCACGT	WT
T1-15	Биаллельная мутация	GAAAG-----	GGGGCGTCGGAATCA..GAC TCCACGT
T1-16	Гетерозиготная мутация	GAA-----(+49 п.н.)--- TTCATGAA	WT
T1-17	Дикий тип	WT	WT
T1-18	Гетерозиготная мутация	GAAA- CGTCGGAATCA..GACTCCACG T	WT
T1-19	Биаллельная мутация	GAAA-CGTCGGAATCA.. CTCCACGTG-ACTC	GGG-----
T1-20	Гетерозиготная мутация	GAAAG-- TCGGAATCA..GACTCCACGT	WT
T1-21	Гетерозиготная мутация	GAAAG-----GACTCGC	WT
T1-22	Дикий тип	WT	WT
T1-23	Биаллельная мутация	GAAAG-----	GGGTCTGTCGGAATCA
T1-24	Биаллельная мутация	GAAAG-----GACTCGC	GGGTCTGTCGGAATCA
T1-25	Биаллельная мутация	GAAA- CGTCGGAATCA..GACTCCACG T	GGG(+3 п.н.)CGTCGGAATCA

T1-26	Дикий тип	WT	WT
T1-27	Биаллельная мутация	GAAAG-----	GG-CGTCGGAATCA
T1-28	Биаллельная мутация	GAAAG-----GACTCGC	GG-CGTCGGAATCA
T1-29	Дикий тип	WT	WT
T1-30	Биаллельная мутация	GAAAGGCGTCGGAATCA..GAC TCCACGT	GGG-----ACTCGC
T1-31	Гетерозиготная мутация	GAAAGACGTCGGAATCA..GAC TCCACGT	WT
T1-32	Биаллельная мутация	GAAAG-----	GGGTCGTCGGAATCA
T1-33	Гетерозиготная мутация	GAAAG-----(+202 п.н.)----	WT
T1-34	Биаллельная мутация	GAAAG-----GACTCGC	GGGTCGTCGGAATCA
T1-35	Биаллельная мутация	GAAAGACGTCGGAATCA..GAC TCCACGT	GGGGCGTCGGAATCA..GAC TCCACGT
T1-36	Гетерозиготная мутация	GAAAG-----GACTCGC	WT
T1-37	Гетерозиготная мутация	GAAAGTCGTCGGAATCA-- GACTCCACGT	WT
T1-38	Гомозиготная мутация	GAAAG-----GTTTACA-- CCACGTGGACT	GGG----- GTTTACA..CCACGTGG
T1-39	Дикий тип	WT	WT
T1-40	Гетерозиготная мутация	GAAAG-----	WT
T1-41	Гетерозиготная мутация	GAAAGGCGTCGGAATCA..GAC TCCACGT	WT

Примечание: «-» означает наличие делеций оснований, «.» означает опущенные основания.

Таблица 2. Типы мутаций гена *AtDMP9* в трансгенном *Arabidopsis thaliana* поколения T1

Серийный номер	<i>AtDMP9</i>	аллель 1	аллель 2
T1-1	Биаллельная мутация	GGAAAGACGTCGG..GACGCCA	GGAAAG-GTCGG..GACGCCA
T1-2	Дикий тип	WT	WT
T1-3	Гомозиготная мутация	GGAAA-CGTCGG..GACGCCA	GGAAA-CGTCGG..GACGCCA
T1-4	Гетерозиготная мутация	GGAA-GCGTCGG..GACGCCA	WT

	мутация		
T1-5	Дикий тип	WT	WT
T1-6	Гомозиготная мутация	GGAAAG(+16 п.н.)CGTCGGA..GACGCCA	GGAAAG(+16 п.н.)CGTCGG..GACGCCA
T1-7	Гетерозиготная мутация	GGAAAGACGTCGG..GACGCCA	WT
T1-8	Дикий тип	WT	WT
T1-9	Дикий тип	WT	WT
T1-10	Биаллельная мутация	GGAAAGCG----- CAATGTC..GCCA	GGAAAGACGTCGG..GACGCC A
T1-11	Биаллельная мутация	GGAAAGGCGTCGG..GACGCCA	GGAAAG(+16 п.н.)CGTCGG..GACGCCA
T1-12	Гетерозиготная мутация	GGAAAGGCGTCGG..GACGCCA	WT
T1-13	Дикий тип	WT	WT
T1-14	Гетерозиготная мутация	GGAAAGACGTCGG..GACGCCA	WT
T1-15	Гетерозиготная мутация	GGAAAGGCGTCGG..GACGCCA	WT
T1-16	Гетерозиготная мутация	GGAAAG-GTCGG..GACGCCA	WT
T1-17	Дикий тип	WT	WT
T1-18	Дикий тип	WT	WT
T1-19	Биаллельная мутация	GGAAAG-----GGA	GGAAAG----- TCGCGGTGTTC
T1-20	Гетерозиготная мутация	GGA---CGTCGG..GACGCCA	WT
T1-21	Гетерозиготная мутация	GGAAAGACGTCGG..GACGCCA	WT
T1-22	Гетерозиготная мутация	GGAAAG-----GGA	WT
T1-23	Гетерозиготная мутация	GGAAAGACGTCGG..GACGCCA	WT
T1-24	Биаллельная мутация	GGAAAG-----GGA	GGAA--CGTCGG..GACGCCA
T1-25	Биаллельная мутация	GGAAAG--TCGG..GACGCCA	GGAAAGACGTCGG..GACGCC A
T1-26	Гетерозиготная мутация	GGAAAG-GTCGG..GACGCCA	WT
T1-27	Гетерозиготная мутация	GG---CGTCGG..GACGCCA	WT
T1-28	Гомозиготная	GGAAAGACGTCGG..GACGCCA	GGAAAGACGTCGG..GACGCC

	мутация		A
T1-29	Дикий тип	WT	WT
T1-30	Биаллельная мутация	GGAAAG-----GGA	GGAAA-CGTCGG..GACGCCA
T1-31	Гетерозиготная мутация	GGAAA-CGTCGG..GACGCCA	WT
T1-32	Гомозиготная мутация	GGAAAG-GTCGG..GACGCCA	GGAAAG-GTCGG..GACGCCA
T1-33	Гетерозиготная мутация	GGAAAGACG..CCACGTG(+401 п.н.)GA	WT
T1-34	Дикий тип	WT	WT
T1-35	Гетерозиготная мутация	GGAA--CGTCGG..GACGCCA	WT
T1-36	Гетерозиготная мутация	GGAAAGCGTCGG..GACGCCAA	WT
T1-37	Дикий тип	WT	WT
T1-38	Гомозиготная мутация	GGAAAGTCGTCGG..GACGCCA CGTGGGA	GGAAAGTCGTCGG..GACGCC ACGTGGGA
T1-39	Дикий тип	WT	WT
T1-40	Дикий тип	WT	WT
T1-41	Дикий тип	WT	WT

Примечание: «-» означает наличие делеций оснований, «.» означает опущенные основания.

Полученные мутантные линии по гену *AtDMP8* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T1 включали T1-34, и конкретные мутации были следующими:

Идентификация секвенированием показала, что: различие между геномной ДНК мутантных линий T1-34 по гену *AtDMP8* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T1 и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имела место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 115-512 SEQ ID NO: 1 и имела место вставка основания (T) в другой хромосоме в положениях 114-115 SEQ ID NO: 1.

Полученные линии двойных мутантов по генам *AtDMP8* и *AtDMP9* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T1 включали T1-6, T1-11, T1-19, T1-24, T1-25, T1-28 и T1-32, и конкретные мутации были следующими:

Идентификация секвенированием показала, что: различие между геномной ДНК двойных мутантных линий T1-6 по генам *AtDMP8* и *AtDMP9* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T1 и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0

заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имела место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 115-512 SEQ ID NO: 1, и имела место делеция фрагмента в другой хромосоме в положениях 113-114 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имела место вставка фрагмента в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3, где нуклеотидная последовательность вставленного фрагмента показана как GTTTACACGGCGACTC (SEQ ID NO: 13).

Идентификация секвенированием показала, что: различие между геномной ДНК двойных мутантных линий T1-11 по генам *AtDMP8* и *AtDMP9* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T1 и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имела место вставка основания (Т) в положениях 114-115 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имела место вставка основания (Т) в одной хромосоме в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3 и имела место вставка фрагмента в другой хромосоме в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3, где нуклеотидная последовательность вставленного фрагмента показана как GTTTACACGGCGACTC (SEQ ID NO: 13).

Идентификация секвенированием показала, что: различие между геномной ДНК двойных мутантных линий T1-19 по генам *AtDMP8* и *AtDMP9* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T1 и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имела место делеция основания (Т) в одной хромосоме в положении 114 SEQ ID NO: 1 и имела место делеция фрагмента в другой хромосоме в положениях 115-511 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имела место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 161-560 SEQ ID NO: 3 и имела место делеция фрагмента в другой хромосоме в положениях 161-564 SEQ ID NO: 3.

Идентификация секвенированием показала, что: различие между геномной ДНК двойных мутантных линий T1-24 по генам *AtDMP8* и *AtDMP9* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T1 и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имела место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 115-512 SEQ ID NO: 1 и имела место вставка основания (Т) в другой хромосоме в положениях 114-115 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имела место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 161-560 SEQ ID NO: 3 и имела место делеция фрагмента в другой хромосоме в положениях 159-160 SEQ ID NO: 3.

Идентификация секвенированием показала, что: различие между геномной ДНК двойных мутантных линий T1-25 по генам *AtDMP8* и *AtDMP9* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T1 и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имела место делеция основания (T) в одной хромосоме в положении 114 SEQ ID NO: 1 и имела место вставка фрагмента CGT в другой хромосоме в положениях 114-115 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имела место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 161-162 SEQ ID NO: 3 и имела место вставка основания (A) в другой хромосоме в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3.

Идентификация секвенированием показала, что: различие между геномной ДНК двойных мутантных линий T1-28 по генам *AtDMP8* и *AtDMP9* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T1 и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имела место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 115-512 SEQ ID NO: 1 и имела место делеция основания (T) в другой хромосоме в положении 114 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имела место вставка основания (A) в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3.

Идентификация секвенированием показала, что: различие между геномной ДНК двойных мутантных линий T1-32 по генам *AtDMP8* и *AtDMP9* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T1 и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имела место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 115-511 SEQ ID NO: 1 и имела место вставка основания (T) в другой хромосоме в положениях 114-115 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имела место делеция основания (C) в положении 161 SEQ ID NO: 3.

5. Идентификация трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T2 посредством генотипирования

Мутантные линии T1-19, T1-33 и T1-38 по гену *AtDMP8* и/или гену *AtDMP9* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T1, полученные на стадии 4, подвергали самоопылению, после сбора семени высевали с получением трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T2. Конкретный способ идентификации генотипов генов *AtDMP8* и *AtDMP9* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T2 был следующим: с геномной ДНК трансгенного *Arabidopsis thaliana* T2 в качестве матрицы идентифицировали

генотипы генов *AtDMP8* и *AtDMP9* в трансгенном *Arabidopsis thaliana* поколения Т2 посредством использования праймеров для определения мутантной последовательности *AtDMP8* (*DMP8F1* и *DMP8R1*) и *AtDMP9* (*DMP9F1* и *DMP9R2*) согласно способу на стадии 4, соответственно.

Полученные мутантные гомозиготные линии по гену *AtDMP8* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения Т2 включали Т2-33-1, Т2-33-2 и Т2-33-3, которые имеют такие же мутантные последовательности, и конкретные мутации были следующими:

Идентификация секвенированием показала, что: различие между геномной ДНК гомозиготных мутантных линий Т2-33-1, Т2-33-2 и Т2-33-3 по гену *AtDMP8* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения Т2 и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, фрагмент в положениях 115-511 SEQ ID NO: 1 был заменен фрагментом размера 202 п.о. В частности, нуклеотидная последовательность фрагмента размером 202 п.о. была следующей:

GAAATTGACGAGCATTGATGTCTTCGAAACCGTTTTTTGAACTCCTTTCGCCACCA
TGCGACGTTTTCTACCTTTTCCTCCTCCCGCGGCGGCTCCTGCCGGAAGCATAGGC
AGTGAAGAGAGAGGGACAGGTTTGGGCGACCGAGACGATGTTGGTGACGGATTT
TGCCTCGTTGTCGTCGTGTAACCTCTGATTCCGACG.

Полученные гомозиготные линии по гену *AtDMP9* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения Т2 включали Т2-33-4, Т2-33-5 и Т2-33-6, которые имеют такие же мутантные последовательности, и конкретные мутации были следующими:

Идентификация секвенированием показала, что: различие между геномной ДНК гомозиготных мутантных линий Т2-33-1, Т2-33-2 и Т2-33-3 по гену *AtDMP9* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения Т2 и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP9, имела место вставка основания (Т) в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3 и имела место вставка фрагмента в положениях 561-562 SEQ ID NO: 3, где данная нуклеотидная последовательность показана как:

CGTCGGAATCAGAGTTTACACGGCGACTCCGCCGCAAAAACCATCACCATCACCA
CCTTCTCGTTCACCAAAACCCGTCTTAATCTCTTCATTGCCTTCCCTCCCGTCAGG
AGCCGCCGCTGGAGGAGGAAGAGGTCGAAAACGTCGCATGGTGGCGCAAGGAGT
TCAAAAAACGGTTTTCGAAGACATCAATGCTCGTCAACTTCCCTCCGACAGGAACA
CTCTTGATGTTTCGAAATGGTTCTTCCATCAATATACCGTGACGGAGACTGTAACG

GAATCAACACACTCATGATTCATCTCCTCTTGCTTCTTTGCGCAATGTCTTGTTCCT
TCTTCCATTTTACCGACAGTTTCAAAGCATCCGATGGGAAGATCTACTACGGTTTC
GTGACGCCACGTG (SEQ ID NO: 14).

Полученные гомозиготные мутантные линии по генам *AtDMP8* и *AtDMP9* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T2 включали T2-19, T2-38-1 и T2-38-2, причем типы мутаций каждой линии являются следующими:

Идентификация секвенированием показала, что: различие между геномной ДНК гомозиготных мутантных линий T2-19 по генам *AtDMP8* и *AtDMP9* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T2 и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имела место делеция фрагмента в положениях 115-511 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имела место делеция фрагмента в положениях 161-564 SEQ ID NO: 3.

Идентификация секвенированием показала, что: различие между геномной ДНК гомозиготных мутантных линий T2-38-1 и T2-38-2 по генам *AtDMP8* и *AtDMP9* трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T2 и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имела место делеция фрагмента в положениях 115-127 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имела место вставка фрагмента в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3 и в положениях 562-563 SEQ ID NO: 3.

Описанные выше мутантные линии трансгенного *Arabidopsis thaliana* поколения T1 и T2 были отобраны для следующих экспериментов по анализу способности к индукции гаплоида.

II. Применение нокаутированного мутанта *Arabidopsis thaliana* по гену *AtDMP8* и/или гену *AtDMP9* в индукции получения гаплоида

(A) Идентификация способности самоопыления нокаутированных мутантов *Arabidopsis thaliana* по *AtDMP8* и *AtDMP9* индуцировать гаплоид

Три типа мутантов, полученных по генам *AtDMP8* и *AtDMP9*, соответственно, самоопылялись с получением самоопыленного потомства, и идентификацию гаплоидов проводили на самоопыленном потомстве следующим способом (поскольку *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col представлял собой гомозиготную полученную самоопылением линию, мутантное самоопыленное потомство, полученное нокаутированием генов *AtDMP8* и *AtDMP9* на этом фоне, не может идентифицировать гаплоидов посредством молекулярных маркеров):

1. Идентификация фенотипа растения

После посадки семян, образовавшихся в результате самоопыления, наблюдали фенотипы одиночных растений, причем при гаплоидности наблюдались карликовость, узкие листья, растущие вверх, компактный тип растения и мужская стерильность, тогда как при диплоидности наблюдались высокие растения, широкие и рассредоточенные листья и нормальная фертильность (Фиг. 1, Фиг. 2).

2. Идентификация на листьях посредством проточной цитометрии

Проточную цитометрию проводили на растении с характеристиками гаплоидности, полученном на стадии 1, где конкретный способ был следующим: ядра клеток молодых листьев растения, подлежащего анализу, выделяли, и диплоидные листья *Arabidopsis thaliana* использовали в качестве контроля; сигнал затем выявляли проточным цитометром, сперва выявляли сигнал диплоидных ядер, и пиковое положение сигнала диплоидного ядра принимали за 50 (поскольку генетические материалы в диплоидных клетках находятся в двойном количестве относительно гаплоидных клеток, пиковое положение сигнала гаплоидного ядра оказывается около 25). И если пиковое положение сигнала ядра растения, подлежащего анализу, оказывается около 25, данное растение, подлежащее анализу, считается гаплоидным растением. Если пик сигнала растения, подлежащего анализу, оказывается около 50, считали, что положение обогащения интенсивности сигнала растения, подлежащего анализу, является таким же, как и у диплоидного ядра, и растение, подлежащее анализу, было диплоидом (Фиг. 3).

Результаты идентификации подсчитывали, и показатель индукции рассчитывали согласно следующей формуле: показатель индукции (%) = (число гаплоидных растений/общее число растений) × 100. Как видно, после одновременной мутации генов *AtDMP8* и *AtDMP9* в самоопыленном потомстве могут быть получены гаплоиды.

Таблица 3. Статистика по показателю индукции гаплоидов у самоопыленного потомства мутантов *dmp*

Генотип	Номер растений	Общее число растений	Число гаплоидов	Показатель индукции гаплоидов (%)
WT	Col-0	523	0	0
<i>dmp8</i>	T2-33-1	270	0	0
<i>dmp9</i>	T2-33-4	183	0	0
<i>dmp8dmp9</i>	T2-38-1	165	6	3,64

А. Идентификация способности к индукции гибридизации мутантов *Arabidopsis thaliana*, нокаутированных по *AtDMP8* и *AtDMP9*.

Три типа мутантов, полученных по генам *AtDMP8* и *AtDMP9*, скрещивали с материалами *Arabidopsis thaliana ms1* с получением межвидового потомства, и гаплоиды в межвидовом потомстве идентифицировали следующими способами:

1. Идентификация флуоресцентного мечения

Вектор CRISPR/Cas9 несет экспрессионный элемент TagRFP (*Entactmaea quadricolor*), управляемый промотором *AtOLEO1*. Поскольку промотор *AtOLEO1* специфично экспрессировался в зародышах зрелых семян, флуоресцентный сигнал TagRFP можно было наблюдать посредством флуоресцентного излучения. Следовательно, мутант, несущий данный экспрессионный элемент, в качестве родителя мужского пола гибридизовали с другими нефлуоресцентными материалами родителя женского пола с получением семян, где зародыши диплоидных семян демонстрировали сильную красную флуоресценцию из-за наличия генома родителя мужского пола, тогда как зародыши гаплоидных семян не демонстрировали флуоресценции или демонстрировали слабую флуоресценцию из-за происхождения от родителя женского пола (Фиг. 4).

2. Идентификация молекулярного маркера

Семена без флуоресценции и со слабой флуоресценцией, идентифицированные на стадии 1, высаживали далее, выделяли геномную ДНК, и проводили ПЦР-амплификацию с использованием полиморфного праймера мутанта *Arabidopsis thaliana*, нокаутированного по *AtDMP8* и *AtDMP9*, 092B02-F(092B02-F: CAGCTGAGATGAACGAGTTGTCTT), 092B02-R(092B02-R: TCTTTTGAGTCACTCCGTATGTCC) и LB-08474(LB-08474: ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT), и амплифицированный продукт подвергали выявлению картины полос в агарозе, если размер амплифицированного продукта индивидуального растения, подлежащего анализу, составлял 500 п.о., демонстрируя 1 полосу, считали, что полоса индивидуального растения является картиной полос *Arabidopsis thaliana ms1* без картины полос материала родителя мужского пола, данное индивидуальное растение представляло собой родителя гаплоидного женского пола. Если размер амплифицированных продуктов индивидуального растения, подлежащего анализу, составлял 500 п.о. и 1094 п.о., демонстрируя 2 полосы, считали, что полоса индивидуального растения является

гетерозиготной картиной полос *Arabidopsis thaliana ms1* и трансгенной мутантной линии *Arabidopsis thaliana*, данное индивидуальное растение представляло собой потомство нормального гибрида и было диплоидом (Фиг. 5).

3. Идентификация фенотипа зрелых растений

Фенотипы растений, идентифицированные на стадиях 1 и 2, дополнительно осматривали, причем гаплоиды демонстрировали карликовость, узкие листья, растущие вверх, компактный тип растения и мужскую стерильность, тогда как диплоиды были высокими растениями с широкими и рассредоточенными листьями и нормальной фертильностью.

4. Идентификация на листьях посредством проточной цитометрии

Проточную цитометрию проводили на растении с характеристиками гаплоида, полученном на стадии 3, где конкретный способ был следующим: выделяли ядра клеток молодых листьев растения, подлежащего анализу, и листья диплоидного *Arabidopsis thaliana* использовали в качестве контроля; сигнал затем выявляли проточным цитометром, сначала выявляли сигнал диплоидных ядер, и пиковое положение сигнала диплоидного ядра принимали за 50 (поскольку генетические материалы в диплоидных клетках находились в двойном количестве относительно гаплоидных клеток, пиковое положение сигнала гаплоидного ядра оказывается около 25). И если пиковое положение сигнала ядра растения, подлежащего анализу, оказывается около 25, данное растение, подлежащее анализу, считается гаплоидным растением. Если пик сигнала растения, подлежащего анализу, оказывается около 50, считали, что положение обогащения интенсивности сигнала растения, подлежащего анализу, является таким же, как и у диплоидного ядра, и растение, подлежащее анализу, было диплоидом.

Результаты идентификации подсчитывали, и показатель индукции рассчитывали согласно следующей формуле: показатель индукции (%) = (число материнских гаплоидных растений/общее число растений) × 100. Как видно, после мутации гена *AtDMP8*, мутации гена *AtDMP9* и одновременной мутации генов *AtDMP8* и *AtDMP9* они подвергались гибридизации с другими материалами, и в потомстве мог быть получен гаплоидный родитель женского пола.

Таблица 4. Статистика по показателю индукции гаплоидов в межвидовом потомстве мутантов *dpm*

Комбинация гибридизации	Номер растений	Общее число растений	Число гаплоидов	Показатель индукции гаплоидов (%)
<i>ms1</i> × WT	T1-13	1171	0	0,00
	T1-17	1339	0	0,00
	Всего	2510	0	0,00
<i>ms1</i> × <i>dmp8</i>	T1-34	1309	1	0,08
	T2-33-1	1006	0	0,00
	T2-33-2	719	0	0,00
	Всего	3034	1	0,03
<i>ms1</i> × <i>dmp9</i>	T2-33-4	844	3	0,36
	T2-33-5	598	3	0,50
	T2-33-6	589	2	0,34
	Всего	2031	8	0,39
<i>ms1</i> × <i>dmp8dmp9</i>	T1-6	146	2	1,37
	T1-11	169	4	2,37
	T1-19	194	6	3,09
	T1-24	68	3	4,41
	T1-25	361	11	3,05
	T1-28	327	3	0,92
	T1-32	31	1	3,23
	T2-38-1	851	17	2,00
	T2-38-2	559	10	1,79
	Всего	2706	57	2,11

Пример 2. Получение нокаутированных по *SIDMP* мутантов томата и их применение

I. Ген *SIDMP* нокаутировали с использованием системы CRISPR/Cas9

Ген *SIDMP* у томата нокаутировали с использованием системы CRISPR/Cas9 с получением нокаутированного по гену *SIDMP* мутанта томата. Конкретные стадии были следующими:

1. Выбор последовательностей еНПК

Последовательность целевого сайта разрабатывали на гене *SIDMP*, и она имела длину 20 п.о.

Целевой сайт 1 находился в положениях 76-95 SEQ ID NO: 5, и последовательность целевого сайта 1 еНПК представляла собой ТАТСТСАСТААТТАССАСА.

Целевой сайт 2 находился в положениях 247-266 SEQ ID NO: 5, и последовательность целевого сайта 2 енРНК представляла собой ТСТССТТТТАССАААТАСТГА.

2. Конструирование вектора CRISPR/Cas9

Вектор CRISPR/Cas9 представляет собой рекомбинантный вектор (структурная диаграмма вектора показана на Фиг. 9а), полученный соединением молекулы ДНК, представленной в SEQ ID NO: 8 (экспрессионный элемент енРНК), молекулы ДНК, представленной в SEQ ID NO: 11 (экспрессионный элемент Cas9), молекулы ДНК, представленной в SEQ ID NO: 10 (экспрессионный элемент флуоресцентного белка) и молекулы ДНК, представленной в SEQ ID NO: 12 (экспрессионный элемент NptII), с вектором pICSL4723 с использованием метода «золотых ворот». Молекула ДНК, показанная в SEQ ID NO: 8, последовательно содержит кодирующую последовательность енРНК, нацеленной на целевой сайт 1, кодирующую последовательность енРНК, нацеленной на целевой сайт 2, с промотором *AtU6-26*, используемым для инициации экспрессии кодирующей последовательности енРНК, находящейся около начала каждой кодирующей последовательности енРНК.

3. Получение трансгенных растений

Вектор CRISPR/Cas9, полученный на стадии 2, трансформировали в компетентные клетки агробактерии GV3101 посредством теплового шока (компетентные клетки агробактерии GV3101 приобретали у Beijing Aosen Dingxin Biotechnology Co., Ltd., и они являются общедоступными) с получением рекомбинантного штамма GV3101/CRISPR/Cas9.

Затем эксплант семядоли томата дикого типа AC инфицировали рекомбинантным штаммом GV3101/CRISPR/Cas9 посредством применения способа трансформации инфицированием экспланта семядоли томата агробактерией (т.е. рекомбинантную агробактерию подвергали расширенному размножению при 28°C, и эксплант семядоли томата инфицировали раствором размноженной агробактерии), и поколение T0 трансгенного растения томата из экспланта семядоли получали после скрининга на резистентность к канамицину.

4. Идентификация трансгенных растений с мутацией гена *SIDMP*

Листья трансгенного растения томата поколения T0, полученного на стадии 3, отбирали, геномную ДНК выделяли в качестве матрицы, и проводили ПЦР-

амплификацию посредством применения следующих праймеров с получением продуктов ПЦР-амплификации разных линий.

Последовательности праймеров для выявления последовательности мутанта по гену *SIDMP* были следующими:

SIDMPF2: ACTGCTTAGGATATTAАCTGACCC;

SIDMPR1: TTTTGGCACATCGACACCAAG.

Продукты ПЦР-амплификации разных линий подвергали секвенированию по Сэнджеру, и результаты секвенирования сравнивали с геном *SIDMP* томата дикого типа AC. Генотип *SIDMP* идентифицировали согласно следующим принципам.

Если последовательность из последовательности целевого сайта имела характеристику дублета, генотип данной линии был гетерозиготным генотипом (т.е. ген *SIDMP* мутировал на одной из двух гомологичных хромосом и не мутировал на другой хромосоме), и данная линия представляла собой гетерозиготную мутантную линию трансгенного томата поколения T0.

Для последовательности с характеристиками специфичного синглета из последовательности целевого сайта, если она была такой же, как последовательность гена *SIDMP* томата дикого типа AC, генотип данной линии был геотипом дикого типа, то есть, не было мутации на последовательности гена *SIDMP*; если она отличалась от последовательности гена *SIDMP* томата дикого типа AC, генотип данной линии был гомозиготным (гены *SIDMP* мутировали на обеих гомологичных хромосомах), данная линия представляла собой гомозиготную мутантную линию трансгенного томата поколения T0.

Таблица 5. Типы мутаций гена *SIDMP* в трансгенном томате поколения T0

Серийный номер	Генотип	аллель 1	аллель 2
T0-1	Дикий тип	WT	WT
T0-2	Дикий тип	WT	WT
T0-3	Дикий тип	WT	WT
T0-4	Дикий тип	WT	WT
T0-5	Дикий тип	WT	WT
T0-6	Дикий тип	WT	WT
T0-6	Дикий тип	WT	WT
T0-7	Дикий тип	WT	WT
T0-8	Дикий тип	WT	WT
T0-9	Гетерозиготная мутация	TATCCTACTAATTTAC(-3п.н.)AAGGGGAAAAA	WT

T0-10	Биаллельная мутация	TATCCTACTA(-167п.н.)TTTGGTAAAGG	TACTAATTTACC(-158п.н.)TATTTGGTAA
T0-11	Гетерозиготная мутация	WT	TAATTTACC(C)ACAAGGT---ACTTCCC(-3п.н.)GTATTTG
T0-12	Гетерозиготная мутация	WT	TAATTTACC(C)ACAAGGT---TCCCTCAGT(-3п.н.)TGGTAAAG
T0-12	Гетерозиготная мутация	WT	TAATTTACC(C)ACAAGGT---TCCCTCAGT(-3п.н.)TGGTAAAG
T0-13	Дикий тип	WT	WT
T0-14	Гетерозиготная мутация	ACTAATTTACC(-157п.н.)GTATTTGGTAA	WT
T0-15	Дикий тип	WT	WT
T0-16	Дикий тип	WT	WT
T0-16	Дикий тип	WT	WT
T0-17	Дикий тип	WT	WT
T0-17	Дикий тип	WT	WT
T0-18	Дикий тип	WT	WT
T0-18	Дикий тип	WT	WT
T0-19	Дикий тип	WT	WT
T0-20	Дикий тип	WT	WT
T0-21	Дикий тип	WT	WT
T0-21	Дикий тип	WT	WT
T0-22	Дикий тип	WT	WT
T0-22	Дикий тип	WT	WT
T0-24	Дикий тип	WT	WT
T0-24	Дикий тип	WT	WT
T0-25	Дикий тип	WT	WT
T0-26	Дикий тип	WT	WT
T0-27	Дикий тип	WT	WT
T0-28	Дикий тип	WT	WT
T0-29	Дикий тип	WT	WT
T0-31	Дикий тип	WT	WT
T0-32	Дикий тип	WT	WT
T0-33	Дикий тип	WT	WT
T0-34	Биаллельная мутация	TACTAATTTACC(-157п.н.)GTATTTGGTAA	AATTTACC(C)ACAAGGT---CTTCCCTCA(A)GTATT

Примечание: «-» означает делецию основания.

5. Идентификация трансгенного томата поколения T1 генотипированием

Мутантные линии T0-33 и T0-34 по гену *SIDMP* трансгенного томата T0, полученные на стадии 4, самоопыляли, после сбора семени засеивали с получением трансгенного томата поколения T1. Конкретный способ идентификации генотипа гена *SIDMP* трансгенного томата поколения T1 был следующим: с геномной ДНК трансгенного томата T1 в качестве матрицы идентифицировали генотип гена *SIDMP* трансгенного томата T1 посредством применения праймеров для определения мутантной последовательности *SIDMP* (*SIDMPF2* и *SIDMPR1*) согласно способу на стадии 4, соответственно.

Полученные наконец гомозиготные мутантные линии по гену *SIDMP* трансгенного томата поколения T1 включали *sldmp-1* и *sldmp-2* со следующим типом мутации каждой линии:

Идентификация секвенированием показала, что: различие между геномной ДНК гомозиготных мутантных линий *sldmp-1* по генам *SIDMP* трансгенного томата поколения T1 и геномной ДНК томата дикого типа AC заключается только в том, что в гене, кодирующем белок SIDMP, имела место вставка основания (C) в положениях 92-93 SEQ ID NO: 5.

Идентификация секвенированием показала, что: различие между геномной ДНК гомозиготных мутантных линий *sldmp-2* по генам *SIDMP* трансгенного томата поколения T1 и геномной ДНК томата дикого типа AC заключается только в том, что в гене, кодирующем белок SIDMP, имела место делеция фрагмента в положениях 93-249 SEQ ID NO: 5.

II. Применение нокаутированного мутанта томата по гену *SIDMP*, индуцирующего получение гаплоида

(А) Эффективность растения и показатель завязывания семян нокаутированных мутантов томата по гену *SIDMP*

При сравнении эффективности мутантных растений томата с геном *SIDMP*, нокаутированным относительно томата дикого типа AC, и AC обнаружили, что нокаутирование гена *SIDMP* не влияет на рост растения (Фиг. 6). Число семян на плод самоопыленного томата подсчитывали, причем среднее значение составило примерно 79,5 семян на плод самоопыленного для дикого типа, тогда как мутант *sldmp* продуцировал только 17 семян, что значительно меньше, чем продукция дикого типа (Таблица 6). Данные результаты показали то, что мутация гена *SIDMP* приводила к

снижению показателя завязывания семян, свидетельствуя о том, что мутант *sldmp* имеет способность к индукции гаплоида.

Таблица 6. Статистика по числу семян мутантов *sldmp* после самоопыления

Материалы	Статистика по числу соцветий	Среднее число закладываемых семян
WT	12	79,5±24,1
<i>sldmp-1</i>	14	19,7±7,1
<i>sldmp-2</i>	23	15,3±6,6

Примечание: WT представляет собой томат дикого типа AC.

(Б) Идентификация способности к индукции гибридизации нокаутированных мутантов томата по гену *SIDMP*

Мутанты *sldmp* скрещивали с материалом поколения F₁, полученным посредством скрещивания томата AC и Микро-Том, с получением межвидового потомства, и гаплоидов в данном межвидовом потомстве идентифицировали следующими способами:

1. Идентификация флуоресцентного мечения

Вектор CRISPR/Cas9 несет экспрессионный элемент TagRFP (*Entactmaea quadricolor*), управляемый промотором *AtOLEO1*. Поскольку промотор *AtOLEO1* специфично экспрессировался в зародышах зрелых семян, флуоресцентный сигнал TagRFP можно было наблюдать посредством флуоресцентного излучения. Следовательно, мутант, несущий данный экспрессионный элемент в качестве родителя мужского пола, гибридизовали с материалами другого нефлуоресцентного родителя женского пола с получением семян, где зародыши диплоидных семян демонстрировали красную флуоресценцию из-за наличия генома родителя мужского пола, тогда как зародыши гаплоидных семян не демонстрировали флуоресценции или демонстрировали слабую флуоресценцию из-за происхождения от родителя женского пола (Фиг. 7).

2. Идентификация молекулярного маркера

Семена без флуоресценции, идентифицированные на стадии 1, высаживали далее, выделяли геномную ДНК и проводили ПЦР-амплификацию с применением полиморфных праймеров *SIDMPF2*+*SIDMPR1* между поколением F₁, полученным скрещиванием томата AC с Микро-Том, и мутантом томата, нокаутированным по гену *SIDMP*, и амплифицированный продукт подвергали выявлению картины полос в

агарозе или секвенированию. Если амплифицированный продукт одного растения, подлежащего анализу, демонстрировал 1 полосу, или результат секвенирования показывал график с одним пиком, считали, что одна полоса растения представляет собой картину полос родителя женского пола без картины полос материала родителя мужского пола, данное единичное растение представляло собой родителя гаплоидного женского пола. А если амплифицированный продукт одного растения, подлежащего анализу, демонстрировал две полосы, или результат секвенирования показывал график с гетерозиготным пиком, считали, что полоса одного растения является гетерозиготной картиной полос поколения F₁, полученного скрещиванием томата AC и Micro-Tom, и мутантного томата, нокаутированного по гену *SIDMP*, и данное единичное растение было нормальным межвидовым потомством и диплоидом.

3. Идентификация фенотипа зрелых растений

Фенотипы растений, идентифицированных на стадиях 1 и 2, дополнительно осматривали, причем гаплоиды демонстрировали карликовость, узкие листья, растущие вверх, компактный тип растения и мужскую стерильность, тогда как диплоиды были высокими растениями с широкими и рассредоточенными листьями и нормальной фертильностью.

4. Идентификация на листьях посредством проточной цитометрии

Проточную цитометрию проводили на растении с характеристиками гаплоида, полученном на стадии 3, где конкретный способ был следующим: выделяли ядра клеток молодых листьев растения, подлежащего анализу, и листья диплоидного *Arabidopsis thaliana* использовали в качестве контроля; сигнал затем выявляли проточным цитометром, сперва выявляли сигнал диплоидных ядер, и пиковое положение сигнала диплоидного ядра принимали за 100 (поскольку генетические материалы в диплоидных клетках находились в двойном количестве относительно гаплоидных клеток, пиковое положение сигнала гаплоидного ядра оказывалось около 50). И если пиковое положение сигнала ядра растения, подлежащего анализу, оказывается около 50, данное растение, подлежащее анализу, считается гаплоидным растением. Если пик сигнала растения, подлежащего анализу, оказывается около 100, считали, что положение обогащения интенсивности сигнала растения, подлежащего анализу, является таким же, как и у диплоидного ядра, и растение, подлежащее анализу, было диплоидом (Фиг. 8).

Результаты идентификации подсчитывали, и показатель индукции рассчитывали согласно следующей формуле: показатель индукции (%) = (число материнских гаплоидных растений/общее число растений) × 100. После мутации гена *SIDMP* проводили скрещивание с другими материалами, и гаплоидный женский родитель мог быть получен в данном межвидовом потомстве.

Таблица 7. Статистика по показателю индукции гаплоидов в межвидовом потомстве мутантов *sldpm*

Комбинация гибридизации	Общее число растений	Число гаплоидов	Показатель индукции гаплоидов (%)
F ₁ × WT	954	0	0,00
F ₁ × <i>sldmp-1</i>	323	2	0,62
F ₁ × <i>sldmp-2</i>	629	3	0,99

Примечание: F₁ представляет собой межвидовое потомство между томатом AC и Micro-Tom, и WT представляет собой томат дикого типа AC.

Промышленные применения

Гены индукции партеногенетического гаплоида *AtDMP8* и *AtDMP9* клонированы из *Arabidopsis thaliana*. Эксперименты показали то, что мутации *AtDMP8* и *AtDMP9* могут дать индуцибельность партеногенетического гаплоида с обеспечением индукции двудольных сельскохозяйственных культур к продуцированию гаплоидов партеногенетическим способом. Настоящее изобретение было дополнительно подтверждено на томатах, и у томатов также обнаружили то, что мутация *SIDMP* может дать индуцибельность партеногенетического гаплоида. Данное изобретение закладывает важную основу для расширения применения технологии селекции гаплоидов на двудольных растениях и выявления биологического механизма продуцирования партеногенетического гаплоида. Принимая во внимание универсальность применения технологии селекции гаплоидов в современном промышленном разведении, данное изобретение имеет очень широкую сферу применения и перспективы на рынке.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения линии-индуктора гаплоидного растения, заключающийся в следующем из А1) или А2):

А1) сайленсинг или ингибирование экспрессии и/или активности гена DMP в геноме растения или нокаутирование гена DMP с получением линии-индуктора гаплоидного растения;

А2) ингибирование активности белка DMP в растении с получением линии-индуктора гаплоидного растения;

где данное растение является двудольным;

белок DMP представляет собой белок, представленный следующими из В1), или В2), или В3), или В4):

В1) белок с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 6;

В2) слитый белок, полученный путем присоединения метки к N-концу и/или C-концу белка, показанного в SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 6;

В3) белок, имеющий такую же функцию, полученный путем замены и/или делеции и/или вставки одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 6;

В4) белок, имеющий гомологию 75% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 6, и имеющий такую же функцию.

2. Способ по п. 1, в котором, когда двудольное растение представляет собой *Arabidopsis thaliana*, ген DMP представляет собой ген AtDMP8 и/или ген AtDMP9; белок DMP представляет собой белок AtDMP8 и/или белок AtDMP9.

3. Способ по п. 1, в котором, когда двудольное растение представляет собой томат, ген DMP представляет собой ген SlDMP; белок DMP представляет собой белок SlDMP.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором ген DMP представляет собой ген, показанный в следующих из В1), или В2), или В3), или В4):

В1) молекула кДНК или молекула геномной ДНК, показанная в SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 5;

В2) молекула кДНК или молекула геномной ДНК, имеющая идентичность 75% или более с нуклеотидной последовательностью, определенной в В1);

В3) молекула кДНК или молекула геномной ДНК, происходящая из двудольного растения и имеющая идентичность 75% или более с нуклеотидной последовательностью, определенной в В1);

В4) молекула кДНК или молекула геномной ДНК, которая гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, определенной в В1), или В2), или В3), в жестких условиях;

ген DMP имеет следующие функции: двудольное растение становится линией-индуктором гаплоидного растения, когда ген DMP подвергается сайленсингу, или ингибированию, или нокаутированию в нем.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором указанное нокаутирование гена AtDMP8 и/или гена AtDMP9 или указанное нокаутирование гена SIDMP осуществляют посредством CRISPR/Cas9.

6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором, когда двудольное растение представляет собой *Arabidopsis thaliana*, целевой сайт CRISPR/Cas9 находится в положениях 98-117 SEQ ID NO: 1, положениях 290-309 SEQ ID NO: 3, положениях 368-387 SEQ ID NO: 3 и положениях 509-528 SEQ ID NO: 1.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором, когда двудольное растение представляет собой томат, целевой сайт CRISPR/Cas9 находится в положениях 76-95 SEQ ID NO: 5, положениях 247-266 SEQ ID NO: 5.

8. Способ по любому из пп. 1-7, дополнительно включающий стадии скрининга мутантов по гену DMP.

9. Способ по любому из пп. 1-7, в котором линия-индуктор гаплоидного растения, в частности, включает мутантную линию T1-34 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию T1-6 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию T1-11 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию T1-19 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию T1-24 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию T1-25 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию T1-28 *Arabidopsis thaliana* или мутантную линию T1-32 *Arabidopsis thaliana*;

различие между геномной ДНК мутантной линии T1-34 *Arabidopsis thaliana* и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место делеция фрагмента в одной хромосоме

в положениях 115-512 SEQ ID NO: 1 и имеет место вставка основания (Т) в другой хромосоме в положениях 114-115 SEQ ID NO: 1;

различие между геномной ДНК мутантной линии T1-6 *Arabidopsis thaliana* и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 115-512 SEQ ID NO: 1 и имеет место делеция фрагмента в другой хромосоме в положениях 113-114 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место вставка фрагмента в обеих хромосомах в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3, где нуклеотидная последовательность вставленного фрагмента показана как SEQ ID NO: 13;

различие между геномной ДНК мутантной линии T1-11 *Arabidopsis thaliana* и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место вставка основания (Т) в положениях 114-115 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место вставка основания (Т) в одной хромосоме в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3 и имеет место вставка фрагмента в другой хромосоме в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3, где нуклеотидная последовательность вставленного фрагмента показана как SEQ ID NO: 13;

различие между геномом мутантной линии T1-19 *Arabidopsis thaliana* и геномом *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место делеция основания (Т) в одной хромосоме в положении 114 SEQ ID NO: 1 и имеет место делеция фрагмента в другой хромосоме в положениях 115-511 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 161-560 SEQ ID NO: 3 и имеет место делеция фрагмента в другой хромосоме в положениях 161-564 SEQ ID NO: 3;

различие между геномной ДНК мутантной линии T1-24 *Arabidopsis thaliana* и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 115-512 SEQ ID NO: 1 и имеет место вставка основания (Т) в другой хромосоме в положениях 114-115 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 161-560 SEQ ID NO: 3 и имеет место делеция фрагмента в другой хромосоме в положениях 159-160 SEQ ID NO: 3;

различие между геномной ДНК мутантной линии T1-25 *Arabidopsis thaliana* и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место делеция основания (T) в одной хромосоме в положении 114 SEQ ID NO: 1 и имеет место вставка фрагмента CGT в другой хромосоме в положениях 114-115 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 161-162 SEQ ID NO: 3 и имеет место вставка основания (A) в другой хромосоме в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3;

различие между геномной ДНК мутантной линии T1-28 *Arabidopsis thaliana* и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 115-512 SEQ ID NO: 1 и имеет место делеция основания (T) в другой хромосоме в положении 114 SEQ ID NO: 1, и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место вставка основания (A) в обеих хромосомах в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3;

различие между геномной ДНК мутантной линии T1-32 *Arabidopsis thaliana* и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место делеция фрагмента в одной хромосоме в положениях 115-511 SEQ ID NO: 1 и имеет место вставка основания (T) в другой хромосоме в положениях 114-115 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место делеция основания (C) в обеих хромосомах в положении 161 SEQ ID NO: 3.

10. Способ получения гаплоидного растения, включающий стадии самоопыления линии-индуктора гаплоидного растения, как определено в любом из пп. 1-9.

11. Способ по п. 10, дополнительно включающий стадии скрининга мутантов по гену DMP.

12. Способ по п. 10 или 11, в котором линия-индуктор гаплоидного растения представляет собой мутантную линию T2-33 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию T2-38 *Arabidopsis thaliana*, мутантную линию *sldmp-1* томата или мутантную линию *sldmp-2* томата;

различие между геномной ДНК мутантной линии T2-33 *Arabidopsis thaliana* и *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене,

кодирующем белок AtDMP9, имеет место вставка основания (Т) в обеих хромосомах в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3 и имеет место вставка фрагмента в обеих хромосомах в положениях 561-562 SEQ ID NO: 3, где нуклеотидная последовательность вставленного фрагмента показана как SEQ ID NO: 14;

различие между геномной ДНК мутантной линии T2-38 *Arabidopsis thaliana* и геномной ДНК *Arabidopsis thaliana* дикого типа Col-0 заключается только в том, что в гене, кодирующем белок AtDMP8, имеет место делеция фрагмента в обеих хромосомах в положениях 115-127 SEQ ID NO: 1; и в гене, кодирующем белок AtDMP9, имеет место вставка основания (Т) и основания (G) в обеих хромосомах в положениях 160-161 SEQ ID NO: 3 и в положениях 562-563 SEQ ID NO: 3, соответственно;

различие между геномной ДНК мутантной линии томата *sldmp-1* и геномной ДНК томата дикого типа AC заключается только в том, что в гене, кодирующем белок SIDMP, имеет место вставка основания (С) в обеих хромосомах в положениях 92-93 SEQ ID NO: 5;

различие между геномной ДНК мутантной линии томата *sldmp-2* и геномной ДНК томата дикого типа AC заключается только в том, что в гене, кодирующем белок SIDMP, имеет место делеция фрагмента в обеих хромосомах в положениях 93-249 SEQ ID NO: 5.

13. Способ получения гаплоидного растения, включающий следующие стадии: самоопыление линии-индуктора гаплоидного растения или его потомства, полученного любым способом по пп. 1-12, или скрещивание линии-индуктора гаплоидного растения или его потомства с другими растительными материалами в качестве родителя мужского пола с получением самоопыленного потомства или межвидового потомства, а именно гаплоидного растения; где данное растение представляет собой двудольное растение.

14. Способ по п. 13, дополнительно включающий следующие стадии: проведение идентификации флуоресцентного мечения, и/или идентификации признаков гаплоида, и/или идентификации пloidии листьев, и/или идентификации молекулярного маркера на самоопыленном потомстве или межвидовом потомстве одного растения и отбор одиночных растений потомства, идентифицированных как гаплоиды по меньшей мере одним способом, в качестве гаплоидных растений.

15. Линия-индуктор гаплоидного растения, полученная любым способом по пп. 1-12.

16. Линия-индуктор гаплоидного растения по п. 15, включающая клетки, ткани и органы, происходящие от линии-индуктора гаплоидного растения; где данные органы включают семена, листья, плоды, цветки, стебли и корни.

17. Линия-индуктор гаплоидного растения по п. 15 или 16, включающая материалы для размножения, которые включают группу, состоящую из пыльцы, завязей, семязачатков, зародышей, эндоспермов, яйцеклеток, эмбрионов на стадии дробления, корней, кончиков корней, гипокотилей, семядолей, стеблей, листьев, цветков, пыльников, семян, меристематических клеток, протопластов и культур ткани.

18. Гаплоидное растение, полученное способом по п. 13 или 14.

19. Гаплоидное растение по п. 18, включающее клетки, ткани и органы, происходящие от линии-индуктора гаплоидного растения; где данные органы включают семена, листья, плоды, цветки, стебли и корни.

20. Гаплоидное растение по п. 18 или 19, включающее материалы для размножения, которые включают группу, состоящую из пыльцы, завязей, семязачатков, зародышей, эндоспермов, яйцеклеток, эмбрионов на стадии дробления, корней, кончиков корней, гипокотилей, семядолей, стеблей, листьев, цветков, пыльников, семян, меристематических клеток, протопластов и культур ткани.

21. Ген AtDMP8 в мутантной линии *Arabidopsis thaliana* в любом способе по пп. 1-12, или ген AtDMP9 в мутантной линии *Arabidopsis thaliana* в любом способе по пп. 1-12, или ген SIDMP в мутантной линии томата в любом способе по пп. 1-12.

22. Любое из следующих применений Г1)-Г5):

Г1) применение линии-индуктора гаплоидного растения, полученной данным способом, в культивировании гаплоидных растений;

Г2) применение вещества для сайленсинга или ингибирования экспрессии и/или активности гена AtDMP8 и/или гена AtDMP9 в геноме растения или нокаутирования гена AtDMP8 и/или гена AtDMP9 или вещества для ингибирования активности белка AtDMP8 и/или белка AtDMP9 в культивировании линий-индукторов гаплоидного растения или гаплоидных растений;

Г3) применение вещества для сайленсинга или ингибирования экспрессии и/или активности гена SIDMP в геноме растения или нокаутирования гена SIDMP или вещества для ингибирования активности белка SIDMP в культивировании линий-индукторов гаплоидного растения или гаплоидных растений;

Г4) применение белка AtDMP8 или родственного ему биологического материала и/или белка AtDMP9 или родственного ему биологического материала в регулировании показателя индукции линий-индукторов гаплоидного растения, или в улучшении показателя индукции линий-индукторов гаплоидного растения, или в культивировании линий-индукторов гаплоидного растения или гаплоидных растений;

Г5) применение белка SIDMP или родственных ему биологических материалов в регулировании показателя индукции линий-индукторов гаплоидного растения, или в улучшении показателя индукции линий-индукторов гаплоидного растения, или в культивировании линий-индукторов гаплоидного растения или гаплоидных растений;

белок AtDMP8 является белком, представленным в а1), или а2), или а3), или а4):

а1) белок с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 2;

а2) слитый белок, полученный путем присоединения метки к N-концу и/или C-концу белка, показанного в SEQ ID NO: 2;

а3) белок, имеющий такую же функцию, полученный путем замены и/или делеции и/или вставки одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2;

а4) белок, имеющий гомологию 75% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 2, и имеющий такую же функцию;

белок AtDMP9 является белком, представленным в следующих из б1), или б2), или б3), или б4):

б1) белок с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 4;

б2) слитый белок, полученный путем присоединения метки к N-концу и/или C-концу белка, показанного в SEQ ID NO: 4;

б3) белок, имеющий такую же функцию, полученный путем замены и/или делеции и/или вставки одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 4;

б4) белок, имеющий гомологию 75% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 4, и имеющий такую же функцию;

белок SIDMP является белком, представленным в следующих из в1), или в2), или в3), или в4):

в1) белок с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 6;

в2) слитый белок, полученный путем присоединения метки к N-концу и/или C-концу белка, показанного в SEQ ID NO: 6;

в3) белок, имеющий такую же функцию, полученный путем замены и/или делеции и/или вставки одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 6;

в4) белок, имеющий гомологию 75% или более с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 6, и имеющий такую же функцию.

23. Применение по п. 22, в котором, биоматериал, родственной белку AtDMP8, или AtDMP9, или SlDMP, представляет собой любое из следующего г1)-г12):

г1) молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок AtDMP8, или AtDMP9, или SlDMP;

г2) экспрессионная кассета, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по г1);

г3) рекомбинантный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по г1);

г4) рекомбинантный вектор, содержащий экспрессионную кассету по г2);

г5) рекомбинантный микроорганизм, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по г1);

г6) рекомбинантный микроорганизм, содержащий экспрессионную кассету по г2);

г7) рекомбинантный микроорганизм, содержащий рекомбинантный вектор по г3);

г8) рекомбинантный микроорганизм, содержащий рекомбинантный вектор по г4);

г9) трансгенная линия растительных клеток, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по г1);

г10) трансгенная линия растительных клеток, содержащая экспрессионную кассету по г2);

г11) трансгенная линия растительных клеток, содержащая рекомбинантный вектор по г3);

г12) трансгенная линия растительных клеток, содержащая рекомбинантный вектор по г4).

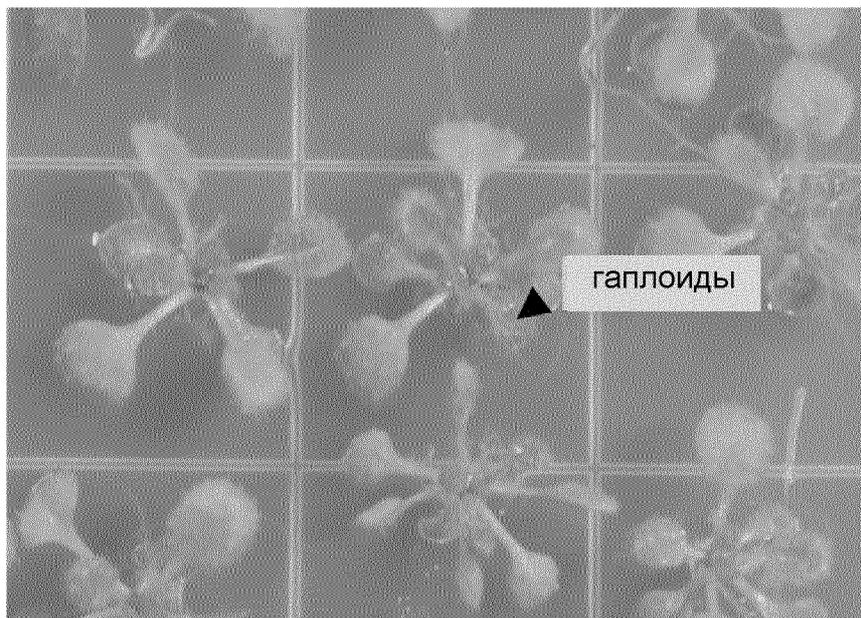
24. Применение по п. 22, в котором молекула нуклеиновой кислоты по г1) представляет собой ген, показанный в следующих из 1), или 2), или 3), или 4):

1) молекула кДНК или молекула геномной ДНК с кодирующей последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 5;

2) молекула кДНК или молекула геномной ДНК, имеющая идентичность 75% или более с нуклеотидной последовательностью, определенной в 1), и кодирующая белок AtDMP8, или AtDMP9, или SIDMP;

3) молекула кДНК или молекула геномной ДНК, происходящая из двудольного растения и имеющая идентичность 75% или более с нуклеотидной последовательностью, определенной в 1), и кодирующая белок AtDMP8, или AtDMP9, или SIDMP;

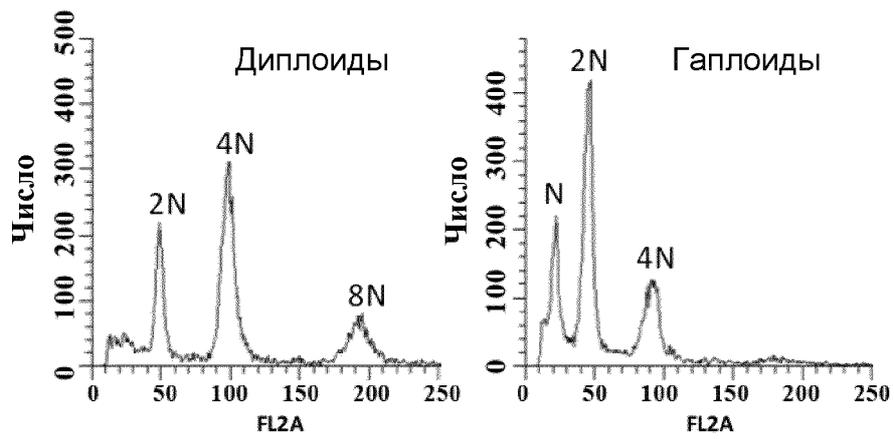
4) молекула кДНК или молекула геномной ДНК, гибридизующаяся с нуклеотидной последовательностью, определенной в 1), или 2), или 3), в жестких условиях и кодирующая белок AtDMP8, или AtDMP9, или SIDMP.



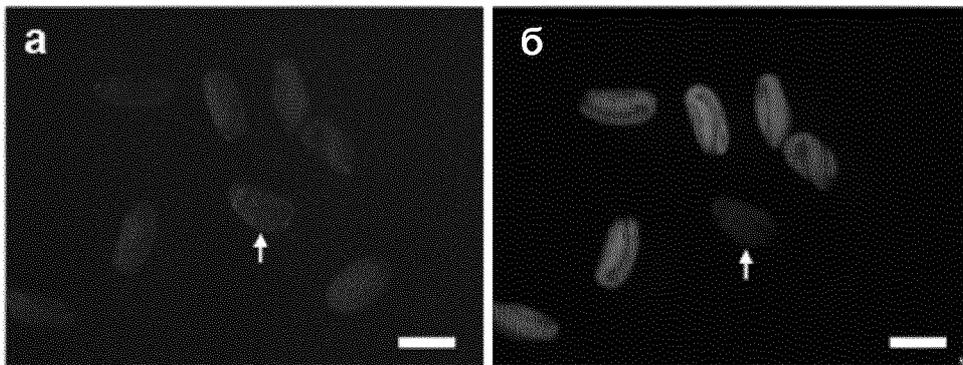
Фиг. 1



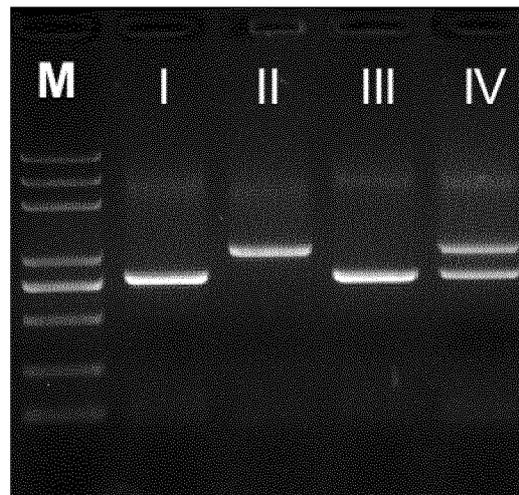
Фиг. 2



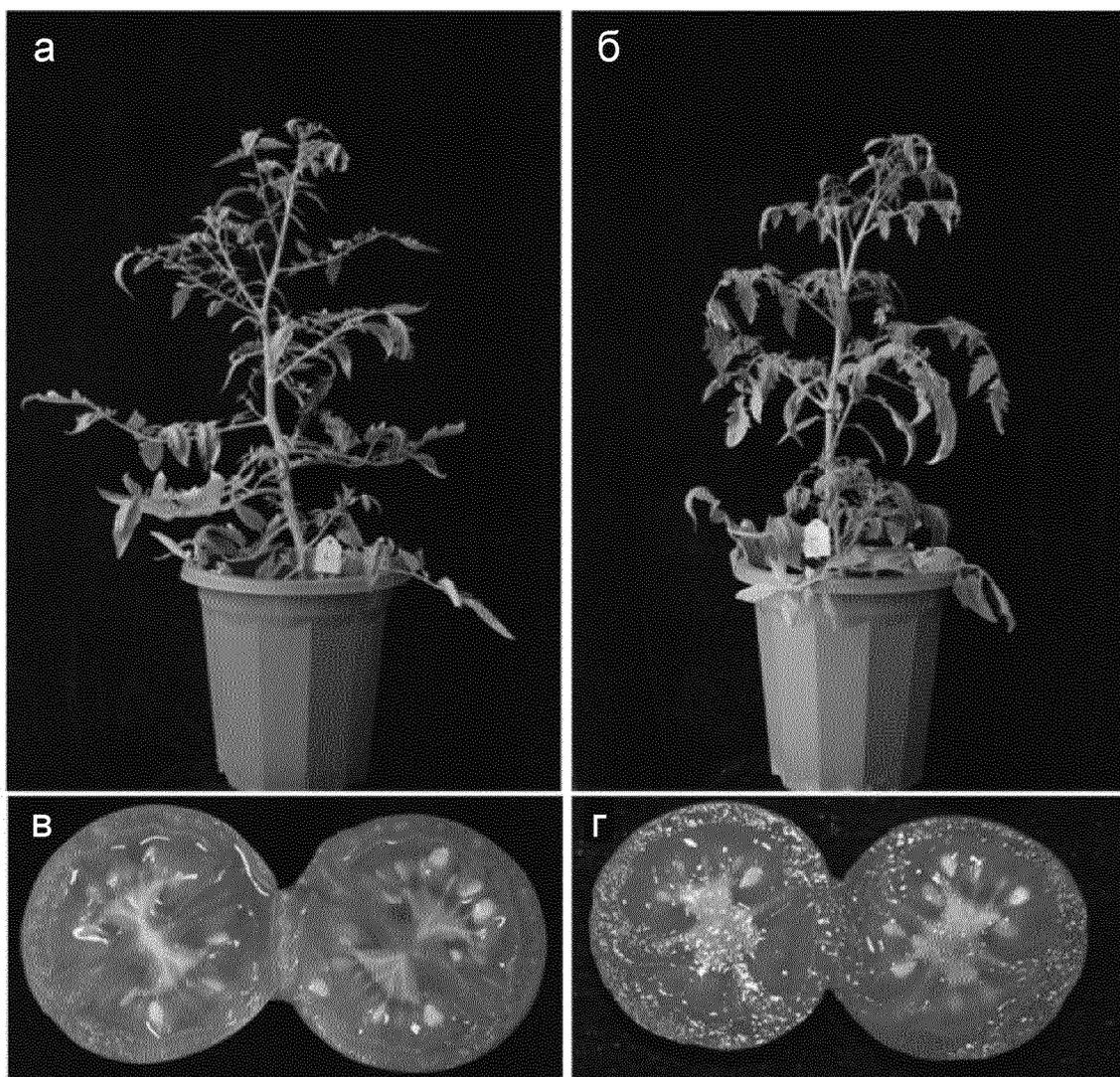
Фиг. 3



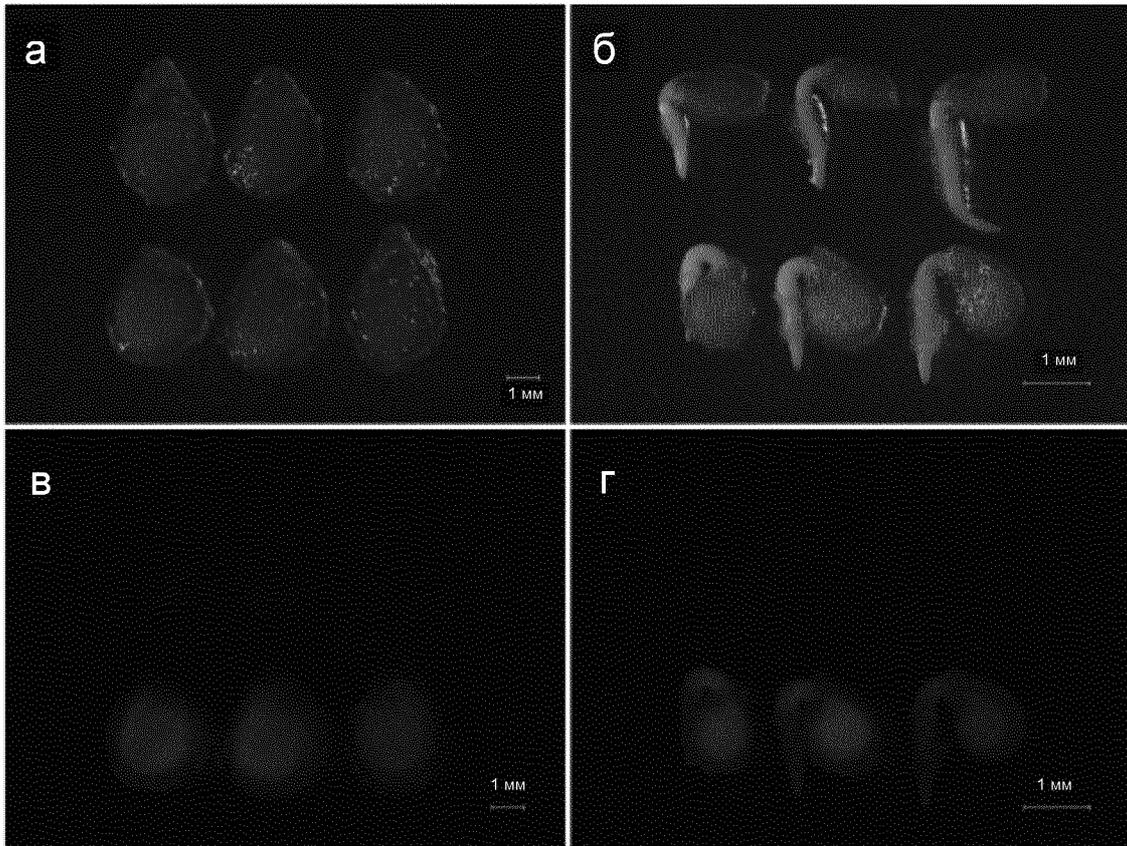
Фиг. 4



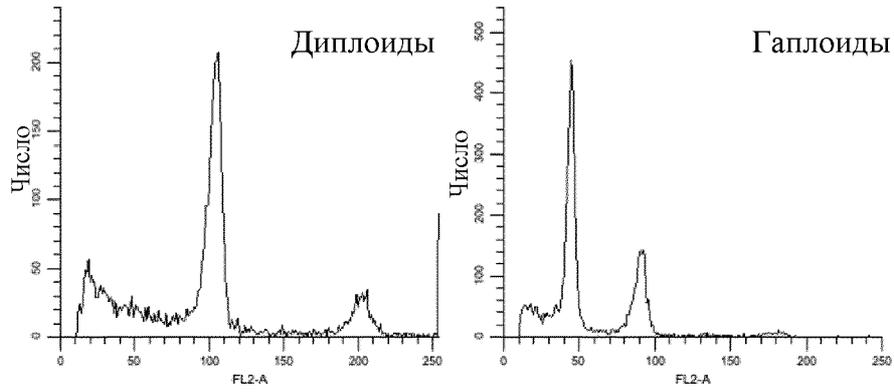
Фиг. 5



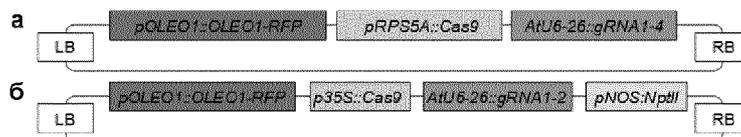
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9