

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202193164** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.03.01

(22) Дата подачи заявки
2015.12.23

(51) Int. Cl. *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
A01H 1/08 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 5/06 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)

(54) **ГАПЛОИДНЫЙ ИНДУКТОР**

(31) **14004389.4**

(32) **2014.12.23**

(33) **EP**

(62) **201791414; 2015.12.23**

(71) Заявитель:
KVC ZAAT CE (DE)

(72) Изобретатель:

**Болдуан Кристоф, Бройер Франк,
Клойбер-Майтц Моника, Ниссен
Маркус, Оузунова Милена, Шульц
Бригга, Викхорст Силке (DE)**

(74) Представитель:

**Вашук Т.В., Емельянова В.А.,
Королева С.В. (BY)**

(57) Изобретение относится к нетрансгенным и трансгенным растениям, предпочтительно зерновым культурам, обладающим биологической активностью гаплоидного индуктора и содержащим полинуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую центромерный гистоновый Н3 (CENH3) белок, при этом полинуклеотид содержит по меньшей мере одну мутацию, вызывающую изменение аминокислотной последовательности белка CENH3, а также какой-либо аминокислоты, входящей в его состав. Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способы создания растений-индукторов, способы создания гаплоидных растений и удвоенных гаплоидов на основании использования растений-индукторов, а также способы облегчения цитоплазматического обмена.

A1

202193164

202193164

A1

ГАПЛОИДНЫЙ ИНДУКТОР

Настоящее изобретение относится к нетрансгенным и трансгенным растениям, предпочтительно к зерновым культурам, которые обладают биологической активностью гаплоидных индукторов и которые содержат по меньшей мере одну мутацию, вызывающую изменение аминокислотной последовательности белка CENH3, при этом изменение придает биологическую активность гаплоидного индуктора. Кроме того, изобретение касается методов создания растений по данному изобретению, гаплоидных растений и удвоенных гаплоидов, получаемых путем скрещивания растений по данному изобретению с растениями дикого типа, а также методов облегчения цитоплазматического обмена.

Создание и использование гаплоидов является одним из важнейших биотехнологических средств улучшения культивируемых растений. Преимущество гаплоидов для селекционеров заключается в том, что гомозиготность может достигаться уже в первом поколении после дигаплоидизации с образованием удвоенных гаплоидов без необходимости возвратного скрещивания на протяжении нескольких поколений с целью достижения высокой степени гетерозиготности. Кроме того, ценность гаплоидов в исследованиях и селекции растений состоит в том, что клетки-основатели удвоенных гаплоидов являются продуктами мейоза, поэтому получаемые в результате поколения представляют собой пулы различных рекомбинантных и одновременно генетически устойчивых индивидуумов. Таким образом, создание удвоенных гаплоидов обеспечивает не только весьма полезную генетическую вариабельность при отборе с целью улучшения культур, но также является ценным средством для получения картирующихся популяций, рекомбинантных инбредных линий, а также быстрого получения гомозиготных мутантов и трансгенных линий.

Гаплоиды можно получать, используя подходы *in vitro* или *in vivo*. Однако многие виды и генотипы трудно поддаются применению таких подходов. Как альтернатива, существенные изменения центромер-специфического варианта гистона H3 (CENH3, также называемого CENP-A) путем замены его N-терминальных участков и его слияния с зеленым флуоресцентным белком GFP (“GFP-tailswap” CENH3) приводит к образованию линий-индукторов гаплоидов у модельного растения *Arabidopsis thaliana* (Ravi и Chan, Nature, 464 (2010), 615-618; Comai, L,

“Элиминация генома: преобразование фундаментальных исследований в инструмент для будущей селекции растений”, PLoS biology, 12.6 (2014)). Белки CENH3 представляют собой варианты H3 гистоновых белков, входящих в состав кинетохорного комплекса активных центромер. С участием “GFP-tailswap” линий-индукторов гаплоидов в потомстве происходит гаплоидизация при скрещивании растения гаплоиндуктора с растением дикого типа. Интересно, что линия-индуктор гаплоидов остается стабильной при самовоспроизводстве, из чего можно предположить, что конкуренция между модифицированной центромерой и центромерой дикого типа в развитии гибридного зародыша приводит к инактивации центромеры родителя-индуктора и, как следствие, элиминации хромосом одного из родителей. В результате хромосомы, содержащие измененный белок CENH3, утрачиваются на ранней стадии развития зародыша и образуется гаплоидное потомство, содержащее хромосомы только родителя дикого типа.

Таким образом, гаплоидные растения можно получать путем скрещивания “GFP-tailswap” трансгенных растений как индуктора гаплоидов с дикорастущими растениями. Однако, как показано выше, эта технология требует значительных изменений белка CENH3, при этом в растения включается гетерологичный трансген, что экономически проблематично ввиду растущего общественного нерасположения к сельскохозяйственным культурам, создаваемым на основе генной инженерии.

В связи с этим одной из целей настоящего изобретения является преодоление вышеупомянутых проблем и, в частности, обеспечение альтернативных растений в качестве индуктора гаплоидов, которые не содержат значительных модификаций белка CENH3 и/или не созданы на основе генной инженерии.

Эта проблема решается при помощи объекта, раскрытого в независимых пунктах формулы изобретения, в частности, при помощи растения, обладающего биологической активностью гаплоиндуктора и содержащего полинуклеотид, который включает нуклеотидную последовательность, кодирующую центромерный гистоновый H3 (CENH3) белок, включающий домен CATD, при этом полинуклеотид содержит по меньшей мере одну мутацию, вызывающую изменение аминокислотной последовательности белка CENH3, которое придает биологическую активность гаплоидного индуктора. В контексте настоящего изобретения термин “изменение” означает любую модификацию аминокислотной последовательности белка CENH3 (включая множественные модификации),

вызываемую по меньшей мере одной мутацией полинуклеотида, включающего нуклеотидную последовательность, кодирующую центромерный гистоновый H3 (CENH3) белок. Полинуклеотид может быть геномной ДНК гена CENH3 или кДНК CENH3, либо 5'- или 3'-нетранслируемыми областями гена CENH3, или их смесью, содержащей, например, часть геномной ДНК и часть кДНК. Изменение может представлять собой замену одной или нескольких аминокислот, инсерцию одной или нескольких аминокислот, либо делецию одной или нескольких аминокислот. Мутации на уровне ДНК, способные привести к изменению аминокислотной последовательности белка CENH3, могут быть точечными мутациями, приводящими к замене аминокислоты или стоп-кодона, инсерциями или делециями, которые сдвигают рамку считывания гена CENH3, либо мутациями в сайтах сплайсинга.

В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену аминокислотной последовательности белка CENH3, которая придает биологическую активность гаплоидного индуктора, в по меньшей мере одном сегменте аминокислотной последовательности белка CENH3. Сегмент последовательности выбирают из группы, включающей N-терминальный хвостовой домен, CATD домен, α N-спираль, α 1-спираль, петлю1, α 2-спираль, петлю2, α 3-спираль, а также C-терминальный домен. N-терминальный хвостовой домен соответствует аминокислотной последовательности в положении 1-82, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, и/или N-терминальный хвостовой домен белка CENH3 кодируется нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 1-246, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*. Домен CATD белка CENH3 соответствует аминокислотной последовательности в положении 113-155, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, и/или домен CATD белка CENH3 кодируется нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 337-465, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*. α N-спираль белка CENH3 соответствует аминокислотной последовательности в положении 83-97, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, и/или α N-спираль белка CENH3 кодируется нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 247-291, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*. α 1-спираль белка CENH3 соответствует аминокислотной последовательности в положении 103-113, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, и/или α 1-спираль белка CENH3 кодируется нуклеотидной последовательностью с

нуклеотидами в положении 307-339, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*. Петля1 белка CENH3 соответствует аминокислотной последовательности в положении 114-126, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, и/или петля1 белка CENH3 кодируется нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 340-378, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*. α 2-спираль белка CENH3 соответствует аминокислотной последовательности в положении 127-155, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, и/или α 2-спираль белка CENH3 кодируется нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 379-465, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*. Петля2 белка CENH3 соответствует аминокислотной последовательности в положении 156-162, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, и/или петля2 белка CENH3 кодируется нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 466-486, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*. α 3-спираль белка CENH3 соответствует аминокислотной последовательности в положении 163-172, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, и/или α 3-спираль белка CENH3 кодируется нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 487-516, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*. С-терминальный домен белка CENH3 соответствует аминокислотной последовательности в положении 173-178, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, и/или С-терминальный домен белка CENH3 кодируется нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 517-534, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*. Последовательности *A. thaliana* используются только в качестве эталонных и не ограничивают изобретение определенными последовательностями *A. thaliana*. Вследствие высокой степени консервативности последовательностей, специалист в данной области техники может выявить нуклеотидную последовательность и аминокислотную последовательность, соответствующую последовательностям *A. thaliana*, в любом другом растительном материале или виде растения.

Белки CENH3 представляют собой варианты гистоновых белков H3, входящих в состав кинетохорного комплекса активных центромер, т.е. белковой структуры на хромосомах, к которой прикрепляются волокна веретена во время клеточного деления. В основном белки CENH3 характеризуются вариабельным N-терминальным хвостовым доменом и не образуют жесткую вторичную структуру, а также для них характерен консервативный домен гистоновой складки, состоящий из трех α -спиральных

участков, называемых $\alpha 1$ - $\alpha 3$, которые соединяются двумя петельными сегментами. N-терминальный хвостовой домен в первую очередь подвергается посттрансляционной модификации ферментами. Такие модификации включают метилирование, цитруллинирование, фосфорилирование, сумоилирование, убиквитинирование и АДФ-рибозилирование и воздействуют на функцию регуляции гена CENH3. Внутри домена гистоновой складки локализуется высококонсервативный домен CATD (CENP-A targeting domain), образуемый частями $\alpha 1$ -спирали, целой $\alpha 2$ -спиралью и соединительной петлей1. Консервативный домен CATD необходим для загрузки CENH3 при участии шаперонов и поэтому жизненно важен для локализации его кинетохора и функционирования центромеры. N-терминальный хвостовой домен и домен гистоновой складки соединены между собой $\alpha 2$ -спиралью.

Авторы настоящего изобретения с удивлением обнаружили, что растение, обладающее способностью продуцировать гаплоидное потомство, т.е. гаплоидный индуктор, можно получать не только путем изменения аминокислотной последовательности консервативного белка CENH3, но также путем изменения аминокислотной последовательности любого другого домена и структурных участков гена CENH3 и белка CENH3. Более того, способность продуцировать гаплоидное потомство может еще более усиливаться путем комбинирования двух или более изменений аминокислотной последовательности белка CENH3 в различных доменах, сегментах или структурных участках белка CENH3. В результате эффективность продуцирования гаплоидов значительно возрастает. Предпочтительно, чтобы это достигалось с помощью трансгенных, а также нетрансгенных методов. Предпочтительными являются нетрансгенные методы, так как дерегулирование генетически модифицированных организмов (ГМО) требует больших затрат, а также в связи с растущим общественным неприятием генетически модифицированных организмов (ГМО) или растений, созданных с помощью ГМО, в частности сельскохозяйственных культур для потребления человеком, и необходимостью решения широкого круга вопросов, связанных с допуском на рынок, включая жесткую оценку на безопасность ГМО-продуктов.

Настоящее изобретение обеспечивает растение, включающее и экспрессирующее белок CENH3, характеризующееся тем, что растение содержит полинуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность гена, кодирующего белок CENH3, при этом полинуклеотид содержит по меньшей мере одну мутацию, вызывающую изменение аминокислотной

последовательности белка CENH3 в по меньшей мере одном сегменте аминокислотной последовательности белка CENH3, где сегмент выбирают из группы, включающей N-терминальный хвостовой домен, наиболее предпочтительно N-терминальный хвостовой домен, имеющий консенсусную последовательность SEQ ID NO. 1 и SEQ ID NO. 2, соответственно, α N-спираль, наиболее предпочтительно α N-спираль, имеющую консенсусную последовательность SEQ ID NO. 3, α 1-спираль, наиболее предпочтительно α 1-спираль, имеющую консенсусную последовательность SEQ ID NO. 4, петлю1, наиболее предпочтительно петлю1, имеющую консенсусную последовательность SEQ ID NO. 5, α 2-спираль, наиболее предпочтительно α 2-спираль, имеющую консенсусную последовательность SEQ ID NO. 6, петлю2, наиболее предпочтительно петлю2, имеющую консенсусную последовательность SEQ ID NO. 7, α 3-спираль, наиболее предпочтительно α 3-спираль, имеющую консенсусную последовательность SEQ ID NO. 8 и C-терминальный домен, наиболее предпочтительно C-терминальный домен, имеющий консенсусную последовательность SEQ ID NO. 9. Изменение аминокислотной последовательности белка CENH3 может придавать биологическую активность гаплоидного индуктора растению. В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение касается растения, содержащего полинуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность, которая кодирует центромерный гистоновый H3 (CENH3) белок, при этом полинуклеотид содержит по меньшей мере одну мутацию и по меньшей мере одна мутация вызывает изменение аминокислотной последовательности белка CENH3 в по меньшей мере одном сегменте аминокислотной последовательности белка CENH3. Сегмент может быть а) N-терминальным хвостовым доменом, кодируемым нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 1-246, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*, и соответствующим аминокислотной последовательности в положении 1-82, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, либо кодируемым нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 1-177, приведенной в SEQ ID NO. 22 из *Beta vulgaris*, и соответствующим аминокислотной последовательности в положении 1-59, приведенной в SEQ ID NO. 23 из *Beta vulgaris*, либо кодируемым нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 1-252, приведенной в SEQ ID NO. 13 из *Brassica napus*, и соответствующим аминокислотной последовательности в положении 1-84, приведенной в SEQ ID NO. 14 из *Brassica napus*, либо кодируемым нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 1-186,

приведенной в SEQ ID NO. 19 из *Zea mays*, и соответствующим аминокислотной последовательности в положении 1-62, приведенной в SEQ ID NO. 20 из *Zea mays*, либо кодируемым нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 1-186, приведенной в SEQ ID NO. 16 из *Sorghum bicolor*, и соответствующим аминокислотной последовательности в положении 1-62, приведенной в SEQ ID NO. 17 из *Sorghum bicolor*, либо имеющим консенсусную последовательность SEQ ID NO. 1 и SEQ ID NO. 2, б) α N-спиралью, кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 247-291, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 83-97, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 178-222, приведенной в SEQ ID NO. 22 из *Beta vulgaris*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 60-74, приведенной в SEQ ID NO. 23 из *Beta vulgaris*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 253-297, приведенной в SEQ ID NO. 13 из *Brassica napus*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 85-99, приведенной в SEQ ID NO. 14 из *Brassica napus*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 187-231, приведенной в SEQ ID NO. 19 из *Zea mays*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 63-77, приведенной в SEQ ID NO. 20 из *Zea mays*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 187-231, приведенной в SEQ ID NO. 16 из *Sorghum bicolor*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 63-77, приведенной в SEQ ID NO. 17 из *Sorghum bicolor*, либо имеющей консенсусную последовательность SEQ ID NO. 3, в) α 1-спиралью, кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 307-339, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 103-113, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 238-270, приведенной в SEQ ID NO. 22 из *Beta vulgaris*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 80-90, приведенной в SEQ ID NO. 23 из *Beta vulgaris*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 313-345, приведенной в SEQ ID NO. 13 из *Brassica napus*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 105-115, приведенной в SEQ ID NO. 14 из *Brassica napus*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с

нуклеотидами в положении 247-279, приведенной в SEQ ID NO. 19 из *Zea mays*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 83-93, приведенной в SEQ ID NO. 20 из *Zea mays*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 247-279, приведенной в SEQ ID NO. 16 из *Sorghum bicolor*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 83-93, приведенной в SEQ ID NO. 17 из *Sorghum bicolor*, либо имеющей консенсусную последовательность SEQ ID NO. 4, d) петель1, кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 340-378, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 114-126, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 271-306, приведенной в SEQ ID NO. 22 из *Beta vulgaris*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 91-102, приведенной в SEQ ID NO. 23 из *Beta vulgaris*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 346-384, приведенной в SEQ ID NO. 13 из *Brassica napus*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 116-128, приведенной в SEQ ID NO. 14 из *Brassica napus*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 280-318, приведенной в SEQ ID NO. 19 из *Zea mays*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 94-106, приведенной в SEQ ID NO. 20 из *Zea mays*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 280-318, приведенной в SEQ ID NO. 16 из *Sorghum bicolor*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 94-106, приведенной в SEQ ID NO. 17 из *Sorghum bicolor*, либо имеющей консенсусную последовательность SEQ ID NO. 5, e) α 2-спиралью, кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 379-465, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 127-155, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 307-393, приведенной в SEQ ID NO. 22 из *Beta vulgaris*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 103-131, приведенной в SEQ ID NO. 23 из *Beta vulgaris*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 385-471, приведенной в SEQ ID NO. 13 из *Brassica napus*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 129-157, приведенной в SEQ ID NO. 14 из *Brassica napus*, либо кодируемой

нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 319-405, приведенной в SEQ ID NO. 19 из *Zea mays*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 107-135, приведенной в SEQ ID NO. 20 из *Zea mays*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 319-405, приведенной в SEQ ID NO. 16 из *Sorghum bicolor*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 107-135, приведенной в SEQ ID NO. 17 из *Sorghum bicolor*, либо имеющей консенсусную последовательность SEQ ID NO. 6, f) петлей², кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 466-486, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 156-162, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 394-414, приведенной в SEQ ID NO. 22 из *Beta vulgaris*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 132-138, приведенной в SEQ ID NO. 23 из *Beta vulgaris*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 472-492, приведенной в SEQ ID NO. 13 из *Brassica napus*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 158-164, приведенной в SEQ ID NO. 14 из *Brassica napus*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 406-426, приведенной в SEQ ID NO. 19 из *Zea mays*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 136-142, приведенной в SEQ ID NO. 20 из *Zea mays*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 406-426, приведенной в SEQ ID NO. 16 из *Sorghum bicolor*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 136-142, приведенной в SEQ ID NO. 17 из *Sorghum bicolor*, либо имеющей консенсусную последовательность SEQ ID NO. 7, g) α 3-спиралью, кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 487-516, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 163-172, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 415-444, приведенной в SEQ ID NO. 22 из *Beta vulgaris*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 139-148, приведенной в SEQ ID NO. 23 из *Beta vulgaris*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 493-522, приведенной в SEQ ID NO. 13 из *Brassica napus*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 165-

174, приведенной в SEQ ID NO. 14 из *Brassica napus*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 427-456, приведенной в SEQ ID NO. 19 из *Zea mays*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 143-152, приведенной в SEQ ID NO. 20 из *Zea mays*, либо кодируемой нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 427-456, приведенной в SEQ ID NO. 16 из *Sorghum bicolor*, и соответствующей аминокислотной последовательности в положении 143-152, приведенной в SEQ ID NO. 17 из *Sorghum bicolor*, либо имеющей консенсусную последовательность SEQ ID NO. 8, либо h) С-терминальным доменом, кодируемым нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 517-534, приведенной в SEQ ID NO. 10 из *Arabidopsis thaliana*, и соответствующим аминокислотной последовательности в положении 173-178, приведенной в SEQ ID NO. 11 из *Arabidopsis thaliana*, либо кодируемым нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 445-462, приведенной в SEQ ID NO. 22 из *Beta vulgaris*, и соответствующим аминокислотной последовательности в положении 149-154, приведенной в SEQ ID NO. 23 из *Beta vulgaris*, либо кодируемым нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 523-540, приведенной в SEQ ID NO. 13 из *Brassica napus*, и соответствующим аминокислотной последовательности в положении 175-180, приведенной в SEQ ID NO. 14 из *Brassica napus*, либо кодируемым нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 457-471, приведенной в SEQ ID NO. 19 из *Zea mays*, и соответствующим аминокислотной последовательности в положении 153-157, приведенной в SEQ ID NO. 20 из *Zea mays*, либо кодируемым нуклеотидной последовательностью с нуклеотидами в положении 457-471, приведенной в SEQ ID NO. 16 из *Sorghum bicolor*, и соответствующим аминокислотной последовательности в положении 153-157, приведенной в SEQ ID NO. 17 из *Sorghum bicolor*, либо имеющим консенсусную последовательность SEQ ID NO. 9. Часть α 1-спирали, полная петля1 и полная α 2-спираль локализуются внутри домена CATD белка CENH3, как показано выше.

Немутированный N-терминальный хвостовой домен белка CENH3 является частично консервативным у видов растений (см. Рис.1). В настоящем изобретении любое положение аминокислоты, касающееся этих двух консервативных частей N-терминального хвостового домена (часть А и часть В) или нижеописываемой консенсусной последовательности, соответствует следующей системе нумерации. Консервативные часть А и часть В могут разделяться одной или несколькими аминокислотами.

Конкретный номер изменяется в зависимости от вида растения. Для этого в консенсусной последовательности введена метка “*” в качестве указателя месторасположения. Предпочтительно, чтобы немутированный N-терминальный хвостовой домен демонстрировал аминокислотную последовательность, как показано в Таблице 1.

Таблица 1. Специфические аминокислоты, входящие в состав N-терминального хвостового домена белка CENH3

Консервативная часть - положение в N-конце	Аминокислота(ы)
A / 1	M
A / 2	A
A / 3	R
A / 4	T, V, I или A
A / 5	K или R
A / 6	H, T, Q или K
A / 7	X
A / 8	X
A / 9	V, A, P, G, N, P, R, S или H
A / 10	T, R, S, L, K, H, N, A или P
A / 11	R, K, A, N или T
A / 12	S, A, T, L, K, R, D, N или E
A / 13	Q, T, R, A, P, S, G, N, V, K или R
A / 14	P, T, D, E, Q, S, N, G, A, R или R
A / 15	R, N, H, V, G, K, S, A, T, E или P
B / 1	R, D, K, V, G, P, S, Q, T или A
B / 2	G, A, S, K, R, V, T, P или Q
B / 3	S, T, K, V, R, Q, A, E, G, P или D
B / 4	Q, P, N, T, E, K, G, S, R, A или D
B / 5	K, Q, P, G, N, T, H или R
B / 6	X
B / 7	K, R, Q или H
B / 8	K, Q или R
B / 9	S, A, T, K, P или R
B / 10	Y, F, H, T, K, R, F или Q
B / 11	R
B / 12	Y, R, W, F, L, N или S
B / 13	R или K
B / 14	P, A или S

Наиболее предпочтительно, чтобы N-терминальный хвостовой домен содержал консенсусные последовательности SEQ ID NO. 1 (часть А, до *) и SEQ ID NO. 2 (часть В, за пределами *), а именно:

MARTK HXXAR RSRKR * QSQTQ ХКККН RYRP.

5 10 15 5 10 14

Как показано выше, N-терминальный хвостовой домен содержит в своем составе неспецифические [обозначенные символом Х] и специфические аминокислоты [обозначенные однобуквенным символом]. Вместо неспецифической аминокислоты "Х" может быть выпадение по меньшей мере одной аминокислоты.

Немутированная α N-спираль белка CENH3 является высококонсервативной у видов растений и состоит из 15 аминокислот, начиная с аминокислоты в положении 1 и заканчивая аминокислотой в положении 15. В настоящем изобретении любая ссылка на положение аминокислоты, касающееся α N-спирали или нижеописываемой консенсусной последовательности SEQ ID NO. 3, следует этой системе нумерации. Предпочтительно, чтобы немутированная α N-спираль демонстрировала аминокислотную последовательность, как показано в Таблице 2.

Таблица 2. Специфические аминокислоты, входящие в состав α N-спирали белка CENH3

Положение в α N-спирали	Аминокислота(ы)
1	G
2	T
3	V
4	A
5	L
6	K, W или R
7	E или Q
8	I
9	R
10	X
11	F, Y или L
12	Q или R
13	K
14	Q, S или T
15	T, F, W, V, C или A

Наиболее предпочтительно, чтобы α N-спираль содержала консенсусную последовательность SEQ ID NO. 3, а именно:

GTVAL REIRX FQKTT.

5 10 15

Как показано выше, α N-спираль содержит в своем составе неспецифические [обозначенные символом X] и специфические аминокислоты [обозначенные однобуквенным символом].

Немутированная α 1-спираль белка CENH3 является консервативной у видов растений и состоит из 11 аминокислот, начиная с аминокислоты в положении 1 и заканчивая аминокислотой в положении 11. В настоящем изобретении любая ссылка на положение аминокислоты, касающееся α 1-спирали или нижеописываемой консенсусной последовательности SEQ ID NO. 4, следует этой системе нумерации. Предпочтительно, чтобы немутированная α 1-спираль демонстрировала аминокислотную последовательность, как показано в Таблице 3.

Таблица 3. Специфические аминокислоты, входящие в состав α 1-спирали белка CENH3

Положение в α 1-спирали	Аминокислота(ы)
1	A, F, R или S
2	A, M или S
3	S, P, T, A или C
4	F
5	I, V, M, L, S или A
6	R
7	E, T, V, L, C, Q или A
8	V или I
9	R или K
10	S, E, M, T, E, Q, G или D
11	I, V, L или 7

Наиболее предпочтительно, чтобы α 1-спираль содержала консенсусную последовательность SEQ ID NO. 4, а именно:

AAPFI RLVRE I.

5 10

Как показано выше, α 1-спираль содержит в своем составе специфические аминокислоты [обозначенные однобуквенным символом].

Немутированная петля1 белка CENH3 является высококонсервативной у видов растений и состоит из 13 аминокислот, начиная с аминокислоты в положении 1 и заканчивая аминокислотой в положении 13. В настоящем изобретении любая ссылка на положение аминокислоты, касающееся петли1 или нижеописываемой консенсусной последовательности SEQ ID NO. 5, следует этой системе нумерации. Предпочтительно, чтобы немутированная петля1 демонстрировала аминокислотную последовательность, как показано в Таблице 4.

Таблица 4. Специфические аминокислоты, входящие в состав петли1 белка CENH3

Положение в петле1	Аминокислота(ы)
1	T, S или A
2	H, Q, N, A, Y, F, G, D или E
3	M, Q, I, F, Y, A, E, N, R, L, H или G
4	L, F, V, I или Y
5	A, T, S, C или M
6	P, N, D, R, A, T, F, R, H, S или K
7	X
8	Q, Y, D, K, R, E, G, S, P, H, N или A
9	I, V или P
10	N, G, T, E или S
11	R или P
12	W или Y
13	T, Q или S

Наиболее предпочтительно, чтобы петля1 содержала консенсусную последовательность SEQ ID NO. 5, а именно:

TNFLA PXEVT RWT.

5 10 13

Как показано выше, петля1 содержит в своем составе неспецифические [обозначенные символом X] и специфические аминокислоты [обозначенные однобуквенным символом].

Немутированная α 2-спираль белка CENH3 является высококонсервативной у видов растений и состоит из 29 аминокислот,

начиная с аминокислоты в положении 1 и заканчивая аминокислотой в положении 29. В настоящем изобретении любая ссылка на положение аминокислоты, касающееся α 2-спирали или нижеописываемой консенсусной последовательности SEQ ID NO. 6, следует этой системе нумерации. Предпочтительно, чтобы немутированная α 2-спираль демонстрировала аминокислотную последовательность, как показано в Таблице 5.

Таблица 5. Специфические аминокислоты, входящие в состав α 2-спирали белка CENH3

Положение в α 2-спирали	Аминокислота(ы)
1	A, P, V или L
2	E, D, Q, H или L
3	A
4	L или V
5	V, L, M, I, R, Y или T
6	S или A
7	I или L
8	Q
9	E
10	A или S
11	A или T
12	E
13	D, N, F, I или Y
14	Y, F или H
15	L, I или V
16	V или I
17	G, R, E, H, N, T, E, D или Q
18	L, M или I
19	F, M или L
20	S, E, D или G
21	D, M, V, N, E, A, R или K
22	S, G, A или T
23	M, W, N или H
24	L или H
25	C или L
26	A или T
27	L или I
28	H
29	A или S

Наиболее предпочтительно, чтобы α 2-спираль содержала консенсусную последовательность SEQ ID NO. 6, а именно:

AEALL ALQEA AEDFL VHLFE DAMLC AINA.

5 10 15 20 25 29

Как показано выше, α 2-спираль содержит в своем составе специфические аминокислоты [обозначенные однобуквенным символом].

Немутированная петля2 белка CENH3 является высококонсервативной у видов растений и состоит из 7 аминокислот, начиная с аминокислоты в положении 1 и заканчивая аминокислотой в положении 7. В настоящем изобретении любая ссылка на положение аминокислоты, касающееся петли2 или нижеописываемой консенсусной последовательности SEQ ID NO. 7, следует этой системе нумерации. Предпочтительно, чтобы немутированная петля2 демонстрировала аминокислотную последовательность, как показано в Таблице 6.

Таблица 6. Специфические аминокислоты, входящие в состав петли2 белка CENH3

Положение в петле2	Аминокислота(ы)
1	R, K или H
2	R
3	V или I
4	T
5	L, I или V
6	M или L
7	R, K, Q, L или T

Наиболее предпочтительно, чтобы петля2 содержала консенсусную последовательность SEQ ID NO. 7, а именно:

KRVTL MK.

5 7

Как показано выше, петля2 содержит в своем составе специфические аминокислоты [обозначенные однобуквенным символом].

Немутированная α 3-спираль белка CENH3 является высококонсервативной у видов растений и состоит из 10 аминокислот, начиная с аминокислоты в положении 1 и заканчивая аминокислотой в

положении 10. В настоящем изобретении любая ссылка на положение аминокислоты, касающееся α 3-спирали или нижеописываемой консенсусной последовательности SEQ ID NO. 8, следует этой системе нумерации. Предпочтительно, чтобы немутированная α 3-спираль демонстрировала аминокислотную последовательность, как показано в Таблице 7.

Таблица 7. Специфические аминокислоты, входящие в состав α 3-спирали белка CENH3

Положение в α 3-спирали	Аминокислота(ы)
1	К или R
2	D
3	F, L, I, M или W
4	E, Q или R
5	L
6	A или T
7	R
8	R
9	L или I
10	G, R или T

Наиболее предпочтительно, чтобы α 2-спираль содержала консенсусную последовательность SEQ ID NO. 8, а именно:

KDFEL ARRLG.

5 10

Как показано выше, α 3-спираль содержит в своем составе специфические аминокислоты [обозначенные однобуквенным символом].

Немутированный С-терминальный домен белка CENH3 имеет разную длину. На основании изучения многочисленных видов растений (см. ниже) изобретатели определили его длину до 7 аминокислот. В настоящем изобретении любое положение аминокислоты, касающееся С-терминального домена или нижеописываемой консенсусной последовательности SEQ ID NO. 9, соответствует следующей системе нумерации. Предпочтительно, чтобы немутированный С-терминальный домен демонстрировал аминокислотную последовательность, как показано в Таблице 8.

Таблица 8. Специфические аминокислоты, входящие в состав С-терминального домена белка CENH3

Положение в С-терминальном домене	Аминокислота(ы)
1	G, K, A, S или T
2	K, R, I или A
3	G, E или A
4	R, Q или V
5	P, G, I, Q, L, S или H
6	W, L, F или V
7	X

Наиболее предпочтительно, чтобы С-терминальный домен содержал консенсусную последовательность SEQ ID NO. 9, а именно:

GKGRP W.

5 6

Как показано выше, С-терминальный домен содержит в своем составе специфические аминокислоты [обозначенные однобуквенным символом].

Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения мутация, вызывающая изменение любой из неспецифических или специфических аминокислот, представленных в Таблице 1 или в SEQ ID NO.1 или 2, либо в Таблице 2 или в SEQ ID NO. 3, либо в Таблице 3 или в SEQ ID NO. 4, либо в Таблице 4 или в SEQ ID NO. 5, либо в Таблице 5 или в SEQ ID NO. 6, либо в Таблице 6 или в SEQ ID NO. 7, либо в Таблице 7 или в SEQ ID NO. 8, либо в Таблице 8 или в SEQ ID NO. 9, предпочтительно замену или делецию аминокислоты (аминокислот), может приводить к получению желаемого растения, обладающего способностью образовывать гаплоидное потомство.

Неспецифическая аминокислота, указанная в Таблице 1 или в SEQ ID NO. 1 или 2, либо в Таблице 2 или в SEQ ID NO. 3, либо в Таблице 3 или в SEQ ID NO. 4, либо в Таблице 4 или в SEQ ID NO. 5, либо в Таблице 5 или в SEQ ID NO. 6, либо в Таблице 6 или в SEQ ID NO. 7, либо в Таблице 7 или в SEQ ID NO. 8, либо в Таблице 8 или в SEQ ID NO. 9, представляет собой аминокислоту, которая хотя и будучи специфической в группе определенного вида растений, тем не менее в отдельном конкретном роде растения или отдельном конкретном виде растения не является консервативной у большинства видов растений. Таким образом, неспецифическая аминокислота, указанная в SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 или в Таблице 1, Таблице 2, Таблице 3, Таблице 4, Таблице 5, Таблице

6, Таблице 7 или Таблице 8 принадлежит к группе определенного вида растений, определенного рода растений или к отдельному конкретному виду растения - хорошо определенная специфическая аминокислота, которая, по-видимому, не обнаруживается в том же месте у другого вида растения. Аминокислотная замена неспецифической аминокислоты, показанной в SEQ ID NO. 1 или в Таблице 1, означает, что в растении, а именно в определенном виде растения, специфическая, но не консервативная, аминокислота заменяется аминокислотой, отличной от аминокислоты, встречающейся в природе в том же месте данной группы определенного вида растений, определенного рода растений или в отдельном конкретном виде растения в эндогенно закодированном нативном белке CENH3 такого вида растений. Кроме того, неспецифическая аминокислота, а также специфическая аминокислота, может играть важную роль в процессах, касающихся фолдинга или стабильности белков. Изменение такой аминокислоты может приводить к мутации CENH3, заключающейся в утрате стабильности или нарушении правильного фолдинга.

Специфические аминокислоты, приведенные в Таблице 1, Таблице 2, Таблице 3, Таблице 4, Таблице 5, Таблице 6, Таблице 7 или Таблице 8, и, в частности, специфические аминокислоты SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 представляют собой аминокислоты, которые встречаются у большинства видов растений, предпочтительно таких, что перечислены ниже, и которые поэтому весьма консервативны.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения консенсусная последовательность SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 собрана из последовательностей белковых сегментов видов растений, выбираемых из группы, включающей *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinarum*, *Zea mays*, *Setaria italica*, *Oryza minuta*, *Oriza sativa*, *Oriza australiensis*, *Oryza alta*, *Triticum aestivum*, *Secale cereale*, *Malus domestica*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum marinum*, *Aegilops tauschii*, *Daucus glochidiatus*, *Beta vulgaris*, *Daucus pusillus*, *Daucus muricatus*, *Daucus carota*, *Eucalyptus grandis*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Coffea canephora*, *Vitis vinifera*, *Erythrante guttata*, *Genlisea aurea*, *Cucumis sativus*, *Morus notabilis*, *Arabidopsis arenosa*, *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis thaliana*, *Crucihimalaya himalaica*, *Crucihimalaya wallichii*, *Cardamine flexuosa*, *Lepidium virginicum*, *Capsella bursa pastoris*, *Olmrabidopsis pumila*, *Arabis hirsute*, *Brassica napus*, *Brassica oeleracia*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Eruca vesicaria subsp. sativa*, *Citrus sinensis*,

Jatropha curcas, Populus trichocarpa, Medicago truncatula, Cicer yamashitae, Cicer bijugum, Cicer arietinum, Cicer reticulatum, Cicer judaicum, Cajanus cajanifolius, Cajanus scarabaeoides, Phaseolus vulgaris, Glycine max, Astragalus sinicus, Lotus japonicas, Torenia fournieri, Allium cepa, Allium fistulosum, Allium sativum и *Allium tuberosum*.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты, приведенной в Таблице 1, Таблице 2, Таблице 3, Таблице 4, Таблице 5, Таблице 6, Таблице 7 или Таблице 8. Таким образом, растение по данному изобретению содержит по меньшей мере одну замену одной из специфических аминокислот, приведенных в Таблице 1, Таблице 2, Таблице 3, Таблице 4, Таблице 5, Таблице 6, Таблице 7 или Таблице 8, т.е. тех аминокислот, которые являются консервативными и указаны в Таблице 1, Таблице 2, Таблице 3, Таблице 4, Таблице 5, Таблице 6, Таблице 7 или Таблице 8.

Замена специфической аминокислоты, приведенной в Таблице 1, означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

- a) метионин в положении 1 части A,
- b) аланин в положении 2 части A,
- c) аргинин в положении 3 части A,
- d) треонин, валин, изолейцин или аланин в положении 4 части A,
- e) лизин или аргинин в положении 5 части A,
- f) гистидин, треонин, глутамин или лизин в положении 6 части A,
- g) валин, аланин, пролин, глицин, аспарагин, пролин, аргинин, серин или гистидин в положении 9 части A,
- h) треонин, аргинин, серин, лейцин, лизин, гистидин, аспарагин, аланин или пролин в положении 10 части A,
- i) аргинин, лизин, аланин, аспарагин или треонин в положении 11 части A,
- j) серин, аланин, треонин, лейцин, лизин, аргинин, аспарагиновую кислоту, аспарагин или глутаминовую кислоту в положении 12 части A,
- k) глутамин, треонин, аргинин, аланин, пролин, серин, глицин, аспарагин, валин, лизин или аргинин в положении 13 части A,

- l) пролин, треонин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, глутамин, серин, аспарагин, глицин, аланин, лизин, аргинин в положении 14 части А, а также
- m) аргинин, аспарагин, гистидин, валин, глицин, лизин, серин, аланин, треонин, глутаминовую кислоту, пролин в положении 15 части А;
- n) аргинин, аспарагиновую кислоту, лизин, валин, глицин, пролин, серин, глутамин, треонин или аланин в положении 1 части В,
- o) глицин, аланин, серин, лизин, аргинин, валин, треонин, пролин или глутамин в положении 2 части В,
- p) серин, треонин, лизин, валин, аргинин, глутамин, аланин, глутаминовую кислоту, глицин, пролин или аспарагиновую кислоту в положении 3 части В,
- q) глутамин, пролин, аспарагин, треонин, глутаминовую кислоту, лизин, глицин, серин, аргинин, аланин или аспарагиновую кислоту в положении 4 части В,
- r) лизин, глутамин, пролин, глицин, аспарагин, треонин, гистидин или аргинин в положении 5 части В,
- s) лизин, аргинин, глутамин или гистидин в положении 7 части В,
- t) лизин, глутамин или аргинин в положении 8 части В,
- u) серин, аланин, треонин, лизин, пролин или аргинин в положении 9 части В,
- v) тирозин, фенилаланин, гистидин, треонин, лизин, аргинин, фенилаланин или глутамин в положении 10 части В,
- w) аргинин в положении 11 части В,
- x) тирозин, аргинин, триптофан, фенилаланин, лейцин, аспарагин или серин в положении 12 части В,
- y) аргинин или лизин в положении 13 части В, а также
- z) пролин, аланин или серин в положении 14 части В.

Замена специфической аминокислоты, приведенной в Таблице 2, означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

- a) глицин в положении 1,

- b) треонин в положении 2,
- c) валин в положении 3,
- d) аланин в положении 4,
- e) лейцин в положении 5,
- f) лизин, триптофан или аргинин в положении 6,
- g) глутаминовую кислоту или глутамин в положении 7,
- h) изолейцин в положении 8,
- i) аргинин в положении 9,
- j) фенилаланин, тирозин или лейцин в положении 11,
- k) глутамин или аргинин в положении 12,
- l) лизин в положении 13,
- m) глутамин, серин или треонин в положении 14, а также
- n) треонин, фенилаланин, триптофан, валин, цистеин или аланин в положении 15.

Замена специфической аминокислоты, приведенной в Таблице 3, означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

- a) аланин, фенилаланин, аргинин или серин в положении 1,
- b) аланин, метионин или серин в положении 2,
- c) серин, пролин, треонин, аланин или цистеин в положении 3,
- d) фенилаланин в положении 4,
- e) изолейцин, валин, метионин, лейцин, серин или аланин в положении 5,
- f) аргинин в положении 6,
- g) глутаминовую кислоту, треонин, валин, лейцин, цистеин, глутамин или аланин в положении 7,
- h) валин или изолейцин в положении 8,
- i) аргинин или лизин в положении 9,

ж) серин, глутаминовую кислоту, метионин, треонин, глутаминовую кислоту, глутамин, глицин или аспарагиновую кислоту в положении 10, а также

к) изолейцин, валин, лейцин или треонин в положении 11.

Замена специфической аминокислоты, приведенной в Таблице 4, означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

а) треонин, серин или аланин в положении 1,

б) гистидин, глутамин, аспарагин, аланин, тирозин, фенилаланин, глицин, аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту в положении 2,

в) метионин, глутамин, изолейцин, фенилаланин, тирозин, аланин, глутаминовую кислоту, аспарагин, аргинин, лейцин, гистидин или глицин в положении 3,

г) лейцин, фенилаланин, валин, изолейцин или тирозин в положении 4,

д) аланин, треонин, серин, цистеин или метионин в положении 5,

е) пролин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, аргинин, аланин, треонин, фенилаланин, аргинин, гистидин, серин или лизин в положении 6,

ж) глутамин, тирозин, аспарагиновую кислоту, лизин, аргинин, глутаминовую кислоту, глицин, серин, пролин, гистидин, аспарагин или аланин в положении 8,

з) изолейцин, валин или пролин в положении 9,

и) аспарагин, глицин, треонин, глутаминовую кислоту или серин в положении 10,

к) аргинин или пролин в положении 11,

л) триптофан, изолейцин или тирозин в положении 12, а также

м) треонин, глутамин или серин в положении 13.

Замена специфической аминокислоты, приведенной в Таблице 5, означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

а) аланин, пролин, валин или лейцин в положении 1,

б) глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, глутамин, гистидин или лейцин в положении 2,

- с) аланин в положении 3,
- d) лейцин или валин в положении 4,
- е) валин, лейцин, метионин, изолейцин, аргинин, тирозин или треонин в положении 5,
- f) серин или аланин в положении 6,
- g) изолейцин или лейцин в положении 7,
- h) глутамин в положении 8,
- i) глутаминовую кислоту в положении 9,
- j) аланин или серин в положении 10,
- к) аланин или треонин в положении 11,
- l) глутаминовую кислоту в положении 12,
- m) аспарагиновую кислоту, аспарагин, фенилаланин, изолейцин или тирозин в положении 13,
- n) тирозин, фенилаланин или гистидин в положении 14,
- о) лейцин, изолейцин или валин в положении 15,
- р) валин или изолейцин в положении 16,
- q) глицин, аргинин, глутаминовую кислоту, гистидин, аспарагин, треонин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту или глутамин в положении 17,
- г) лейцин, метионин или изолейцин в положении 18,
- s) фенилаланин, метионин или лейцин в положении 19,
- t) серин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту или глицин в положении 20,
- u) аспарагиновую кислоту, метионин, валин, аспарагин, глутаминовую кислоту, аланин, аргинин, лизин в положении 21,
- v) серин, глицин, аланин или треонин в положении 22,
- w) метионин, триптофан, аспарагин или гистидин в положении 23,
- x) лейцин или гистидин в положении 24,

- y) цистеин или лейцин в положении 25,
- z) аланин или треонин в положении 26,
- aa) лейцин или изолейцин в положении 27,
- bb) гистидин в положении 28, а также
- cc) аланин или серин в положении 29.

Замена специфической аминокислоты, приведенной в Таблице 5, означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

- a) аргинин, лизин или гистидин в положении 1,
- b) аргинин в положении 2,
- c) валин или изолейцин в положении 3,
- d) треонин в положении 4,
- e) лейцин, изолейцин или валин в положении 5,
- f) метионин или лейцин в положении 6, а также
- g) аргинин, лизин, глутамин, лейцин или треонин в положении 7.

Замена специфической аминокислоты, приведенной в Таблице 7, означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

- a) лизин или аргинин в положении 1,
- b) аспарагиновую кислоту в положении 2,
- c) фенилаланин, лейцин, изолейцин метионин или триптофан в положении 3,
- d) глутаминовую кислоту, глутамин или аргинин в положении 4,
- e) лейцин в положении 5,
- f) аланин или треонин в положении 6,
- g) аргинин в положении 7,
- h) аргинин в положении 8,
- i) лейцин или изолейцин в положении 9, а также
- j) глицин, аргинин или треонин в положении 10.

Замена специфической аминокислоты, приведенной в Таблице 8, означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

- a) глицин, лизин, аланин, серин или треонин в положении 1,
- b) лизин, аргинин, изолейцин или аланин в положении 2,
- c) глицин, глутаминовую кислоту или аланин в положении 3,
- d) аргинин, глутамин или валин в положении 4,
- e) пролин, глицин, изолейцин, глутамин, лейцин, серин или гистидин в положении 5, а также
- f) триптофан, лейцин, фенилаланин или валин аланин в положении 6.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 1. Таким образом, растение по данному изобретению содержит по меньшей мере одну замену одной из специфических аминокислот SEQ ID NO. 1, т.е. аминокислот, которые являются высококонсервативными и названы в консенсусной последовательности SEQ ID NO. 1. Замена специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 1 означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

- a) метионин в положении 1,
- b) аланин в положении 2,
- c) аргинин в положении 3,
- d) треонин в положении 4,
- e) лизин в положении 5,
- f) гистидин в положении 6,
- g) аланин в положении 9,
- h) аргинин в положении 10,
- i) аргинин в положении 11,
- j) серин в положении 12,
- k) аргинин в положении 13,

l) лизин в положении 14, а также

m) аргинин в положении 15.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 2. Таким образом, растение по данному изобретению содержит по меньшей мере одну замену одной из специфических аминокислот SEQ ID NO. 2, т.е. аминокислот, которые являются высококонсервативными и названы в консенсусной последовательности SEQ ID NO. 2. Замена специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 2 означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

a) глутамин в положении 1,

b) серин в положении 2,

c) глутамин в положении 3,

d) треонин в положении 4,

e) глутамин в положении 5,

f) лизин в положении 7,

g) лизин в положении 8,

h) лизин в положении 9,

i) гистидин в положении 10,

j) аргинин в положении 11,

k) тирозин в положении 12,

l) аргинин в положении 13, а также

m) пролин в положении 14.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 3. Таким образом, растение по данному изобретению содержит по меньшей мере одну замену одной из специфических аминокислот SEQ ID NO. 3, т.е. аминокислот, которые являются высококонсервативными и названы в консенсусной

последовательности SEQ ID NO. 3. Замена специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 3 означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

- a) глицин в положении 1,
- b) треонин в положении 2,
- c) валин в положении 3,
- d) аланин в положении 4,
- e) лейцин в положении 5,
- f) аргинин в положении 6,
- g) глутаминовую кислоту в положении 7,
- h) изолейцин в положении 8,
- i) аргинин в положении 9,
- j) фенилаланин в положении 11,
- k) глутамин или аргинин в положении 12,
- l) лизин в положении 13,
- m) треонин в положении 14, а также
- n) треонин в положении 15.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 4. Таким образом, растение по данному изобретению содержит по меньшей мере одну замену одной из специфических аминокислот SEQ ID NO. 4, т.е. аминокислот, которые являются высококонсервативными и названы в консенсусной последовательности SEQ ID NO. 4. Замена специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 4 означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

- a) аланин в положении 1,
- b) аланин в положении 2,
- c) пролин в положении 3,

- d) фенилаланин в положении 4,
- e) изолейцин в положении 5,
- f) аргинин в положении 6,
- g) аминокислоту в положении 7,
- h) валин в положении 8,
- i) аргинин в положении 9,
- j) глутаминовую кислоту в положении 10, а также
- k) изолейцин в положении 11.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 5. Таким образом, растение по данному изобретению содержит по меньшей мере одну замену одной из специфических аминокислот SEQ ID NO. 5, т.е. аминокислот, которые являются высококонсервативными и названы в консенсусной последовательности SEQ ID NO. 5. Замена специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 5 означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

- a) треонин в положении 1,
- b) аспарагин в положении 2,
- c) фенилаланин в положении 3,
- d) лейцин в положении 4,
- e) аланин в положении 5,
- f) пролин в положении 6,
- g) глутаминовую кислоту в положении 8,
- h) валин в положении 9,
- i) треонин в положении 10,
- j) аргинин в положении 11,
- k) триптофан в положении 12, а также

l) треонин в положении 13.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 6. Таким образом, растение по данному изобретению содержит по меньшей мере одну замену одной из специфических аминокислот SEQ ID NO. 6, т.е. аминокислот, которые являются высококонсервативными и названы в консенсусной последовательности SEQ ID NO. 6. Замена специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 6 означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

- a) аланин в положении 1,
- b) глутаминовую кислоту в положении 2,
- c) аланин в положении 3,
- d) лейцин в положении 4,
- e) лейцин в положении 5,
- f) аланин в положении 6,
- g) лейцин в положении 7,
- h) глутамин в положении 8,
- i) глутаминовую кислоту в положении 9,
- j) аланин в положении 10,
- k) аланин в положении 11,
- l) глутаминовую кислоту в положении 12,
- m) аспарагиновую кислоту в положении 13,
- n) фенилаланин в положении 14,
- o) лейцин в положении 15,
- p) валин в положении 16,
- q) гистидин в положении 17,
- r) лейцин в положении 18,

- s) фенилаланин в положении 19,
- t) глутаминовую кислоту в положении 20
- u) аспарагиновую кислоту в положении 21,
- v) аланин в положении 22,
- w) метионин в положении 23,
- x) лейцин в положении 24,
- y) цистеин в положении 25,
- z) аланин в положении 26,
- aa) изолейцин в положении 27,
- bb) гистидин в положении 28, а также
- cc) аланин в положении 29.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 7. Таким образом, растение по данному изобретению содержит по меньшей мере одну замену одной из специфических аминокислот SEQ ID NO. 7, т.е. аминокислот, которые являются высококонсервативными и названы в консенсусной последовательности SEQ ID NO. 7. Замена специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 7 означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

- a) лизин в положении 1,
- b) аргинин в положении 2,
- c) валин в положении 3,
- d) треонин в положении 4,
- e) лейцин в положении 5,
- f) метионин в положении 6, а также
- g) лизин в положении 7.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты

последовательности SEQ ID NO. 8. Таким образом, растение по данному изобретению содержит по меньшей мере одну замену одной из специфических аминокислот SEQ ID NO. 8, т.е. аминокислот, которые являются высококонсервативными и названы в консенсусной последовательности SEQ ID NO. 8. Замена специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 8 означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

- a) лизин в положении 1,
- b) аспарагиновую кислоту в положении 2,
- c) фенилаланин в положении 3,
- d) глутаминовую кислоту в положении 4,
- e) лейцин в положении 5,
- f) аланин в положении 6,
- g) аргинин в положении 7,
- h) аргинин в положении 8,
- i) лейцин в положении 9, а также
- j) глицин в положении 10.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 9. Таким образом, растение по данному изобретению содержит по меньшей мере одну замену одной из специфических аминокислот SEQ ID NO. 9, т.е. аминокислот, которые являются высококонсервативными и названы в консенсусной последовательности SEQ ID NO. 9. Замена специфической аминокислоты последовательности SEQ ID NO. 9 означает замену аминокислоты, выбираемой из группы, включающей:

- a) глицин в положении 1,
- b) лизин в положении 2,
- c) глицин в положении 3,
- d) гуанидинон-аминовалериановую кислоту в положении 4,

e) пролин в положении 5, а также

f) триптофан в положении 6.

Еще в одном наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты в N-терминальном хвостовом домене, где аминокислотный аргинин в положении 3 последовательности SEQ ID NO. 1 заменен предпочтительно на лизин, либо аминокислотный аргинин в положении 2 последовательности SEQ ID NO. 23 заменен предпочтительно на лизин, либо аминокислотный аргинин в положении 10 последовательности SEQ ID NO. 1 заменен предпочтительно на фенилаланин, либо аминокислотный серин в положении 9 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на фенилаланин, либо аминокислотный аргинин в положении 16 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на глутамин, либо аминокислотный серин в положении 24 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на лейцин, либо аминокислотный аланин в положении 25 последовательности SEQ ID NO. 17 заменен предпочтительно на треонин, либо аминокислотная глутаминовая кислота в положении 29 последовательности SEQ ID NO. 14 заменена предпочтительно на лизин, либо аминокислотный глицин в положении 30 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на аспарагиновую кислоту, либо аминокислотный аланин в положении 33 последовательности SEQ ID NO. 14 или положении 32 последовательности SEQ ID NO. 20 заменен предпочтительно на треонин, либо аминокислотный пролин в положении 35 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на лейцин, либо аминокислотная глутаминовая кислота в положении 35 последовательности SEQ ID NO. 20 заменена предпочтительно на лизин, либо аминокислотный серин в положении 41 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на аспарагин, либо аминокислотный глицин в положении 43 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на глутаминовую кислоту, либо аминокислотный пролин в положении 50 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на серин, либо аминокислотный пролин в положении 55 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на лейцин, либо аминокислотный глицин в положении 57 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на аспарагиновую кислоту, либо аминокислотный глицин в положении 61 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на глутаминовую кислоту, либо аминокислотный аргинин в положении 65 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на глутамин,

либо аминокислотный аргинин в положении 65 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на стоп-сигнал, либо аминокислотный пролин в положении 71 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на серин, либо аминокислотная аспарагиновая кислота в положении 46 последовательности SEQ ID NO. 23 заменена предпочтительно на аспарагин или глицин, либо аминокислотный лизин в положении 7 последовательности SEQ ID NO. 2 заменен предпочтительно на серин, либо аминокислотный пролин в положении 56 последовательности SEQ ID NO. 20 заменен предпочтительно на серин, либо аминокислотный пролин в положении 14 последовательности SEQ ID NO. 2 заменен предпочтительно на валин, либо аминокислотный аланин в положении 62 последовательности SEQ ID NO. 17 заменен предпочтительно на валин.

Еще в одном наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты в α N-спирали, где аминокислотный треонин в положении 2 последовательности SEQ ID NO. 3 заменен предпочтительно на серин, либо аминокислотный треонин в положении 64 последовательности SEQ ID NO. 17 заменен предпочтительно на серин.

Еще в одном наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты в α 1-спирали, где аминокислотный аланин в положении 1 последовательности SEQ ID NO. 4 заменен предпочтительно на треонин, либо аминокислотный аланин в положении 105 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на треонин, либо аминокислотный аргинин в положении 6 последовательности SEQ ID NO. 4 заменен предпочтительно на глутамин, либо аминокислотный аргинин в положении 110 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на глутамин, либо аминокислотный валин в положении 89 последовательности SEQ ID NO. 20 заменен предпочтительно на метионин, либо аминокислотная глутаминовая кислота в положении 10 последовательности SEQ ID NO. 4 заменена предпочтительно на аспарагин, либо аминокислотный серин в положении 114 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на аспарагин.

Еще в одном наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты в петле1, где аминокислотный аспарагин в положении 2 последовательности SEQ ID NO. 5 заменен предпочтительно на валин, либо

аминокислотный аланин в положении 95 последовательности SEQ ID NO. 17 заменен предпочтительно на валин, либо аминокислотный пролин в положении 6 последовательности SEQ ID NO. 5 заменен предпочтительно на серин, либо аминокислотный пролин в положении 121 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на серин, либо аминокислотный триптофан в положении 12 последовательности SEQ ID NO. 5 заменен предпочтительно на стоп-сигнал, либо аминокислотный триптофан в положении 127 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на стоп-сигнал.

Еще в одном наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты в α 2-спирали, где аминокислотный аланин в положении 1 последовательности SEQ ID NO. 6 заменен предпочтительно на треонин, либо аминокислотный аланин в положении 107 последовательности SEQ ID NO. 20 заменен предпочтительно на треонин, либо аминокислотный лейцин в положении 4 последовательности SEQ ID NO. 6 заменен предпочтительно на фенилаланин или глутамин, либо аминокислотный лейцин в положении 132 последовательности SEQ ID NO. 14 или в положении 106 последовательности SEQ ID NO. 23 заменен предпочтительно на фенилаланин или глутамин, либо аминокислотный лейцин в положении 7 последовательности SEQ ID NO. 6 заменен предпочтительно на пролин, либо аминокислотный лейцин в положении 109 последовательности SEQ ID NO. 23 заменен предпочтительно на пролин, либо аминокислотный глутамин в положении 8 последовательности SEQ ID NO. 6 заменен предпочтительно на стоп-сигнал или лейцин, либо аминокислотный глутамин в положении 114 последовательности SEQ ID NO. 20 или в положении 110 последовательности SEQ ID NO. 23 заменен предпочтительно на стоп-сигнал или лейцин, либо аминокислотный аланин в положении 10 последовательности SEQ ID NO. 6 заменен предпочтительно на треонин, либо аминокислотный аланин в положении 138 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на треонин, либо аминокислотный цистеин в положении 25 последовательности SEQ ID NO. 6 заменен предпочтительно на тирозин, либо аминокислотный цистеин в положении 153 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на тирозин, либо аминокислотный аланин в положении 26 последовательности SEQ ID NO. 6 заменен предпочтительно на валин, либо аминокислотный аланин в положении 154 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на валин.

Еще в одном наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты в петле², где аминокислотный аргинин в положении 2 последовательности SEQ ID NO. 7 заменен предпочтительно на гистидин, либо аминокислотный аргинин в положении 159 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на гистидин, либо аминокислотный валин в положении 3 последовательности SEQ ID NO. 7 заменен предпочтительно на изолейцин, либо аминокислотный валин в положении 160 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на изолейцин, либо аминокислотный треонин в положении 4 последовательности SEQ ID NO. 7 заменен предпочтительно на изолейцин, либо аминокислотный треонин в положении 139 последовательности SEQ ID NO. 20 заменен предпочтительно на изолейцин.

Еще в одном наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты в α 3-спирали, где аминокислотная аспарагиновая кислота в положении 2 последовательности SEQ ID NO. 8 заменена предпочтительно на аспарагин, либо аминокислотная аспарагиновая кислота в положении 166 последовательности SEQ ID NO. 14 заменена предпочтительно на аспарагин, либо аминокислотная глутаминовая кислота в положении 4 последовательности SEQ ID NO. 8 заменена предпочтительно на лизин, либо аминокислотная глутаминовая кислота в положении 168 последовательности SEQ ID NO. 14 заменена предпочтительно на лизин, либо аминокислотный аргинин в положении 8 последовательности SEQ ID NO. 8 заменен предпочтительно на гистидин, либо аминокислотный аргинин в положении 172 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на гистидин, либо аминокислотный лейцин в положении 9 последовательности SEQ ID NO. 8 заменен предпочтительно на фенилаланин, либо аминокислотный лейцин в положении 173 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на фенилаланин, либо аминокислотный глицин в положении 10 последовательности SEQ ID NO. 8 заменен предпочтительно на глутаминовую кислоту, либо аминокислотный глицин в положении 174 последовательности SEQ ID NO. 14 или в положении 152 последовательности SEQ ID NO. 20 заменен предпочтительно на глутаминовую кислоту.

Еще в одном наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает замену специфической аминокислоты в С-терминальном домене, где аминокислотный глицин в

положении 3 последовательности SEQ ID NO. 9 заменен предпочтительно на гистидин, либо аминокислотный аргинин в положении 155 последовательности SEQ ID NO. 20 заменен предпочтительно на гистидин, либо аминокислотный аргинин в положении 4 последовательности SEQ ID NO. 9 заменен предпочтительно на лизин, либо аминокислотный аргинин в положении 178 последовательности SEQ ID NO. 14 заменен предпочтительно на лизин, либо аминокислотный серин в положении 157 последовательности SEQ ID NO. 17 заменен предпочтительно на лейцин.

В предпочтительном альтернативном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация локализуется в сайте сплайсинга геномной нуклеотидной последовательности, кодирующей белок CENH3, и/или по меньшей мере одна мутация создает новый сайт сплайсинга внутри экзона. Предпочтительно, чтобы растение, являющееся гетерозиготным в отношении такой мутации(ий), было жизнеспособным. Такая мутация(и) вызывает нарушение в сплайсинге (ошибка сплайсинга), что приводит к увеличению трансляционной клеточной продукции не полностью функционирующих белков CENH3, т.е. белков с нарушенной стабильностью, уменьшенной способностью связываться с ДНК, измененной геометрической формой, предпочтительно измененной вторичной или третичной структурой, либо с беспорядочным фолдингом, по сравнению полностью функционирующим белком CENH3 дикого типа.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация приводит к ошибке сплайсинга, предпочтительно в интроне 1 SEQ ID NO. 12, вызывающей изменение аминокислотной последовательности белка CENH3 *Brassica napus* после аминокислоты в положении 18 SEQ ID NO. 14, ошибке сплайсинга, предпочтительно в интроне 2 SEQ ID NO. 12, вызывающей изменение аминокислотной последовательности белка CENH3 *Brassica napus* после аминокислоты в положении 33 SEQ ID NO. 14, ошибке сплайсинга, предпочтительно в экзоне 3 SEQ ID NO. 12, вызывающей изменение аминокислотной последовательности белка CENH3 *Brassica napus* после аминокислоты в положении 37 SEQ ID NO. 14, либо ошибке сплайсинга, предпочтительно в интроне 8 SEQ ID NO. 12, вызывающей изменение аминокислотной последовательности белка CENH3 *Brassica napus* после аминокислоты в положении 163 SEQ ID NO. 14, либо по меньшей мере одна мутация приводит к ошибке сплайсинга, предпочтительно в интроне 4 SEQ ID NO. 18, вызывающей изменение аминокислотной последовательности белка CENH3 *Zea mays* после аминокислоты в положении 89 SEQ ID NO. 20,

ошибке сплайсинга, предпочтительно в интроне 5 SEQ ID BO. 18, вызывающей изменение аминокислотной последовательности белка CENH3 *Zea mays* после аминокислоты в положении 115 SEQ ID BO. 20, либо ошибке сплайсинга, предпочтительно в интроне 6 SEQ ID BO. 18, вызывающей изменение аминокислотной последовательности белка CENH3 *Zea mays* после аминокислоты в положении 141 SEQ ID BO. 20, либо по меньшей мере одна мутация приводит к ошибке сплайсинга, предпочтительно в интроне 1 SEQ ID BO. 15, вызывающей изменение аминокислотной последовательности белка CENH3 *Sorghum bicolor* после аминокислоты в положении 26 SEQ ID BO. 17.

В еще одном предпочтительном альтернативном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мутация вызывает изменение аминокислотной последовательности белка CENH3, и это изменение придает биологическую активность гаплоидного индуктора, при этом изменение представляет собой инсерцию или делецию одной или нескольких аминокислот. В частности, инсерция может осуществляться путем мутагенеза транспозоном, а делеция – путем геномного инжиниринга. Инсерция и делеция могут происходить в любой нуклеотидной последовательности, кодирующей один из вышеупомянутых сегментов, в нуклеотидной последовательности интрона, либо в нуклеотидной последовательности 5'-нетранслируемой области (НТО) или 3'-НТО гена CENH3, при этом 5'-НТО локализуется вверх по течению от нуклеотидной последовательности, кодирующей N-терминальный хвостовой домен, и 3'-НТО локализуется вниз по течению от нуклеотидной последовательности, кодирующей C-терминальный домен. В любом случае инсерция или делеция приводит к изменению аминокислотной последовательности белка CENH3, и это изменение придает биологическую активность гаплоидного индуктора. Инсерция может иметь длину по меньшей мере 1 нуклеотид, по меньшей мере 2 нуклеотида, по меньшей мере 3 нуклеотида, по меньшей мере 4 нуклеотида, по меньшей мере 5 нуклеотидов, по меньшей мере 6 нуклеотидов, по меньшей мере 7 нуклеотидов, по меньшей мере 8 нуклеотидов, по меньшей мере 9 нуклеотидов, по меньшей мере 10 нуклеотидов, по меньшей мере 12 нуклеотидов, по меньшей мере 14 нуклеотидов, по меньшей мере 16 нуклеотидов, по меньшей мере 18 нуклеотидов, по меньшей мере 20 нуклеотидов, по меньшей мере 25 нуклеотидов, по меньшей мере 30 нуклеотидов, по меньшей мере 40 нуклеотидов, по меньшей мере 50 нуклеотидов, по меньшей мере 75 нуклеотидов, по меньшей мере 100 нуклеотидов, по меньшей мере 200

нуклеотидов, по меньшей мере 300 нуклеотидов, либо по меньшей мере 500 нуклеотидов.

В контексте настоящего изобретения термин “по меньшей мере одна мутация” означает предпочтительно одну мутацию, в частности только одну мутацию. В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения термин “по меньшей мере одна мутация” означает две мутации, в частности только две мутации. Еще в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения термин “по меньшей мере одна мутация” означает три мутации, в частности только три мутации. В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения термин “по меньшей мере одна мутация” означает четыре мутации, в частности только четыре мутации. Еще в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения термин “по меньшей мере одна мутация” означает пять мутаций, в частности только пять мутаций. Если мутаций несколько, они могут также происходить в различных полинуклеотидах и вызывать изменение аминокислотных последовательностей разных белков SENH3, если они имеются у конкретного вида растений. Например, у *Hordeum vulgare* имеются два разных белка SENH3.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одна мутация представляет собой по меньшей мере одну мутацию, по меньшей мере две мутации, по меньшей мере три мутации, по меньшей мере четыре мутации или по меньшей мере пять мутаций.

Еще в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения в одном сегменте белка SENH3 имеется замена одной аминокислоты, в частности замена только одной аминокислоты.

Еще в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения в одном сегменте белка SENH3 имеется замена двух аминокислот, в частности замена только двух аминокислот.

Еще в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения в одном сегменте белка SENH3 имеется замена трех аминокислот, в частности замена только трех аминокислот.

Еще в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения в одном сегменте белка SENH3 имеется замена четырех аминокислот, в частности замена только четырех аминокислот.

Еще в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения в одном сегменте белка CENH3 имеется замена пяти аминокислот, в частности замена только пяти аминокислот.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения в одном сегменте белка CENH3 имеется замена 1, 1 или 2, 1-3, 1-4, 1-5, предпочтительно 1-6, наиболее предпочтительно 1-7 аминокислот.

В частности, настоящее изобретение касается мутаций, которые вызывают или приводят к замене аминокислоты внутри сегмента белка CENH3. Таким образом, в контексте настоящего изобретения мутация предпочтительно представляет собой несинонимичную точечную мутацию или замену в последовательности ДНК, кодирующей белок CENH3, в результате чего происходит изменение аминокислоты. Она также называется миссенс-мутацией. Кроме того, изменение аминокислоты или замена аминокислоты может быть консервативной, т.е. заменой аминокислоты аминокислотой со сходными физико-химическими свойствами, полуконсервативной, т.е. заменой отрицательно заряженной аминокислоты положительно заряженной аминокислотой, либо радикальной, т.е. заменой одной аминокислоты на совершенно другую.

В предпочтительном варианте осуществления растение по настоящему изобретению, обладающее биологической активностью гаплоидного индуктора, является гомозиготным в отношении по меньшей мере одной мутации. В еще одном варианте осуществления растение по настоящему изобретению, обладающее биологической активностью гаплоидного индуктора, является гетерозиготным в отношении по меньшей мере одной мутации.

Растение по настоящему изобретению обладает биологической активностью гаплоидного индуктора. Это означает, что скрещивание растения по изобретению с растением дикого типа или с растением, экспрессирующим белок CENH3 дикого типа, дает по меньшей мере 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, предпочтительно по меньшей мере 1%, предпочтительно по меньшей мере 2%, предпочтительно по меньшей мере 3%, предпочтительно по меньшей мере 4%, предпочтительно по меньшей мере 5%, предпочтительно по меньшей мере 6%, предпочтительно по меньшей мере 7%, предпочтительно по меньшей мере 8%, предпочтительно по меньшей мере 9%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20% или более процентов гаплоидного потомства. При этом растение дикого типа

предпочтительно является растением того же вида, которое не содержит по меньшей мере одну мутацию растения по данному изобретению в соответствующем эндогенном гене *СЕНН3*, т.е. растение способно экспрессировать нативный белок *СЕНН3*, а растение, экспрессирующее *СЕНН3* дикого типа, предпочтительно является растением того же вида, которое содержит i) полинуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую белок *СЕНН3* без по меньшей мере одной мутации растения по данному изобретению и способно экспрессировать такой нативный белок *СЕНН3*, либо ii) полинуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую белок *СЕНН3* из другого вида растения, проявляющего сравнительную функциональность нативного *СЕНН3*, например, белок *СЕНН3* из другого вида растения может быть интродуцирован в качестве трансгена.

Таким образом, настоящее изобретение наилучшим образом обеспечивает средства и методы для создания линий-индукторов гаплоидов в обширном диапазоне настоящих двудольных (эвдикотов), двудольных и однодольных видов растений. Настоящее изобретение также позволяет осуществлять замену материнской цитоплазмы и, например, создавать растения с цитоплазматической мужской стерильностью желаемого генотипа за один этап. К преимуществам настоящего изобретения также относится то, что посредством мутагенеза или любого иного подхода, не связанного с использованием ГМО, можно вызывать мутацию единственной аминокислоты.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления изобретения весь процесс гаплоидизации посредством применения линии-индуктора гаплоидов, характеризующейся точно мутированным эндогенным геном *СЕНН3*, с заменой аминокислоты по меньшей мере в одном из положений, обеспечиваемой настоящим изобретением, не является трансгенным.

В контексте настоящего изобретения “эндогенный” ген, аллель или белок относится к нерекомбинантной последовательности в растении, поскольку эта последовательность встречается в соответствующем растении, в частности в дикорастущем растении. Термин “мутированный” относится к последовательности, измененной человеком. Примером нетрансгенной мутации, вызываемой человеком, является воздействие на растение большой дозой химических, радиологических агентов или иных мутагенов с целью отбора мутантов. В противоположность этому трансгенные мутации,

вызываемые человеком, т.е. рекомбинантные изменения или технологии генной инженерии, например, посредством TALE-нуклеаз, нуклеаз “цинковые пальцы” или системы CRISPR/Cas, включают слияния, инсерции, делеции и/или изменения ДНК или аминокислотной последовательности.

Полинуклеотидная или полипептидная последовательность является “гетерологичной или экзогенной по отношению к” организму, если она происходит из чужеродного вида, либо, если она происходит из того же вида, изменена ее исходная форма. “Рекомбинантная” означает измененная человеком, т.е. трансгенная полинуклеотидная или полипептидная последовательность. Термин “трансген” имеет то значение, в каком он используется специалистами в данной области, и относится к предпочтительно гетерологичной нуклеиновой кислоте, интродуцируемой в клетку посредством молекулярного манипулирования клеточным геномом, осуществляемого человеком, т.е. посредством молекулярной трансформации. Таким образом, “трансгенное растение” представляет собой растение, содержащее трансген, т.е. генетически модифицированное растение. Трансгенное растение может представлять собой исходное растение, в которое трансген был введен, а также его потомство, в геноме которого также содержится трансген.

Термин “нуклеотидная последовательность, кодирующая ” относится к нуклеиновой кислоте, которая направляет экспрессию специфического белка, в частности белка CENH3 или его частей. Нуклеотидные последовательности включают как последовательность цепи ДНК, транскрибируемую в РНК, так и последовательность РНК, транслируемую в белок. Нуклеотидные последовательности включают полноразмерные последовательности нуклеиновой кислоты, а также последовательности неполной длины, получаемые из полноразмерных последовательностей.

Термин “ген” относится к кодирующей нуклеотидной последовательности и связанным регуляторным нуклеотидным последовательностям, интрон(ам), 5' -НТО и/или 3'-НТО.

Термин “регуляторный элемент” касается последовательности, предпочтительно нуклеотидной последовательности, расположенной вверх по течению (5'), внутри, и/или вниз по течению (3') от нуклеотидной последовательности, предпочтительно кодирующей последовательности, транскрипция и экспрессия которой контролируется регуляторными элементами потенциально во взаимосвязи с биосинтетическим аппаратом клетки белка. Термины “регуляция” или “регулировать” касаются модуляции

экспрессии генов, индуцируемой элементами последовательности ДНК, располагающимися прежде всего, но не исключительно, вверх по течению (5') от начала транскрипции интересующих генов. Результатом регуляции может быть проявление экспрессии или отсутствие проявления экспрессии генов в ответ на стимуляцию, а также изменение уровня экспрессии генов.

Регуляторный элемент, в частности последовательность ДНК, такой как промотор, считается “оперативно присоединенным к” или “оперативно связанным с” последовательностью ДНК, которая кодирует РНК или белок, если обе последовательности расположены и ориентированы таким образом, что регуляторная последовательность ДНК вызывает экспрессию кодирующей последовательности ДНК.

“Промотор” представляет собой последовательность ДНК, инициирующую транскрипцию связанной последовательности ДНК, в частности последовательности, которая располагается вверх по течению (5') от начала транскрипции, вовлечена в распознавание и представляет собой РНК-полимеразу. В зависимости от конкретного участка промотор может также включать элементы, которые действуют как регуляторы экспрессии генов, такие как активаторы, энхансеры и/или репрессоры.

“3' регуляторный элемент” (или 3'-конец) относится к части гена, содержащей сегмент ДНК, за исключением 5'-последовательности, обеспечивающей инициацию транскрипции, и структурной части гена, правильно определяющей сайт терминации и содержащей сигнал полиаденилирования и любые другие регуляторные сигналы, способные осуществлять процессинг матричной РНК (мРНК) или экспрессию генов. Сигнал полиаденилирования обычно характеризуется как процесс присоединения трактов полиадениловой кислоты к 3'-концу предшественника мРНК. Сигналы полиаденилирования обычно распознаются по наличию гомологии в канонической форме 5'-ААТAAA-3'.

Термин “кодирующая последовательность” относится к области гена, кодирующей белок, полипептид, либо его части, за исключением регуляторных последовательностей, обеспечивающих инициацию или терминацию транскрипции.

Обычно в клетках могут находиться гены, кодирующие последовательности или регуляторные элементы и в таком случае они называются “аутологичными” или “эндогенными”. Также обычно в

клеточном содержимом они могут отсутствовать и в таком случае клетки называются “гетерологичными”, “трансгенными” или “трансгенами”.

“Гетерологичные” гены, кодирующие последовательности или регуляторные элементы могут также быть аутологичными по отношению к клеткам, однако располагаться в порядке и/или ориентации, либо находиться в геноме или условиях, которые обычно отсутствуют или не встречаются в клетках, в которые они перенесены.

Термин “вектор” относится к конструкции на основе рекомбинантной ДНК, которая может представлять собой плазмиду, вирус, автономно реплицирующуюся последовательность, искусственную хромосому, такую как искусственная бактериальная хромосома ВАС, фаг или иную нуклеотидную последовательность, где соединены или рекомбинированы по меньшей мере две последовательности нуклеотидов, из которых по меньшей мере одна – это молекула нуклеиновой кислоты по данному изобретению. Вектор может быть линейным или круговым. Вектор может состоять из одно- или двухцепочечной ДНК или РНК.

Термин “экспрессия” относится к транскрипции и/или трансляции эндогенного гена или трансгена в растениях.

Термины “трансформация”, “трансформирование” и “перенос” касаются методов переноса молекул нуклеиновой кислоты, в частности ДНК, в клетки, включая, но не ограничиваясь, биолистические подходы, такие как бомбардировка частицами, микроинъекцию, пермеабиллизацию клеточной мембраны под действием различных физических, например электропорации, или химических факторов, например, обработки полиэтиленгликолем (ПЭГ); слияние протопластов или трансформацию, опосредованную *Agrobacterium tumefaciens* или *rhizogenes*. Что касается инъекции и электропорации ДНК в растительные клетки, то к используемым плазмидам не предъявляются какие-либо определенные требования. Могут применяться такие плазмиды, как производные рUC. Если регенерации из трансформированных таким образом клеток подлежат целые растения, то предпочтительно использовать селективный маркер. В зависимости от применяемого метода введения желаемых генов в клетки растений могут понадобиться дополнительные последовательности ДНК; если для трансформации растительных клеток применяются Ti- или Ri-плазмиды, то по меньшей мере правая граница, однако часто правая и левая границы, T-ДНК Ti- и Ri-плазмид должна соединяться в качестве фланкирующей области с подлежащими интродукции генами. Предпочтительно, чтобы переносимые молекулы нуклеиновой

кислоты стабильно интегрировались в геном или пластом растения-реципиента.

В контексте настоящего изобретения термины “биологическая активность гаплоидного индуктора”, “гаплоиндуктор” или “линия-индуктор гаплоидов” касаются растения или линии растений, обладающих способностью продуцировать гаплоидное потомство по меньшей мере в 0,1%, по меньшей мере в 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, предпочтительно по меньшей мере в 1%, предпочтительно по меньшей мере в 2%, предпочтительно по меньшей мере в 3%, предпочтительно по меньшей мере в 4%, предпочтительно по меньшей мере в 5%, предпочтительно по меньшей мере в 6%, предпочтительно по меньшей мере в 7%, предпочтительно по меньшей мере в 8%, предпочтительно по меньшей мере в 9%, наиболее предпочтительно по меньшей мере в 10%, наиболее предпочтительно по меньшей мере в 15%, наиболее предпочтительно по меньшей мере в 20% случаев при скрещивании с растением дикого типа или с растением, которое по меньшей мере экспрессирует белок CENH3 дикого типа. Так как в процессе мейоза хромосомы гаплоиндуктора элиминируются, то в результате в гаплоидном потомстве содержатся хромосомы только растения дикого типа. Однако если при скрещивании гаплоиндуктор являлся материнским родителем, то гаплоидное потомство будет содержать цитоплазму индуктора и хромосомы родителя дикого типа.

Термин “растение” согласно настоящему изобретению включает целые растения или части целого растения.

Предпочтительно, чтобы целые растения являлись семенными растениями, либо зерновой культурой. Части растения представляют собой, например, вегетативные органы/структуры побега, например, листья, стебли и клубни; корни, цветки и цветковые органы/структуры, например, прицветники, чашелистики, лепестки, тычинки, плодолистики, пыльники и семяпочки; семя, включая зародыш, эндосперм и семенную оболочку; соплодие и зрелую завязь; растительную ткань, например, проводящую ткань, основную паренхиму и тому подобное; и клетки, например, замыкающие клетки, яйцеклетки, трихомы и тому подобное; а также их потомство.

В любом случае растение по данному изобретению содержит по меньшей мере одну клетку, содержащую полинуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую центромерный гистоновый H3 (CENH3) белок, при этом полинуклеотид содержит по меньшей мере одну

мутацию, вызывающую изменение аминокислотной последовательности белка SENH3, которое придает биологическую активность гаплоидного индуктора растению, предпочтительно такому, как здесь описано более подробно. Наиболее предпочтительно, чтобы большая часть или, в частности, все растительные клетки по данному изобретению имели мутацию(и), как здесь описано.

Предпочтительно, чтобы вид растений, которые могут использоваться в методах по данному изобретению, принадлежал к настоящим двудольным, двудольным и однодольным растениям.

Термин “растение” в предпочтительном варианте осуществления изобретения относится исключительно к целому растению, т.е. растению, представляющему собой фенотип полностью развитого растения и способного к размножению, растению в ранней стадии развития, например, растительному зародышу, либо к тому и другому.

В варианте осуществления настоящего изобретения термин “растение” относится к части целого растения, в частности к растительному материалу, растительным клеткам или культурам растительных клеток.

Термин “растительная клетка” обозначает структурную и физиологическую единицу растения и состоит из протопласта и клеточной стенки. Растительная клетка может быть в форме изолированной единственной клетки, такой как замыкающая клетка (в устьице) или культивируемая клетка, либо как часть более высокоорганизованной единицы, например, такой как растительная ткань или растительный орган.

Термин “растительный материал” включает части растения, в частности растительные клетки, растительную ткань, в частности материал для размножения растений, предпочтительно листья, стебли, корни, появившиеся зародышевые корни, цветки или цветковые части, лепестки, соплодия, пыльцу, пыльцевые трубки, тычиночные нити, семязачатки, зародышевые мешки, яйцеклетки, завязи, зиготы, зародыши, зиготные зародыши как таковые, соматические зародыши, сегменты гипокотилия, апикальные меристемы, сосудистые пучки, перициклы, семена, корни, культуры клеток или тканей, либо любую иную часть или продукт растения.

Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает материал для размножения растений по данному изобретению. Указанный “материал для размножения растений” следует понимать как означающий любой растительный материал, который можно размножить как половым, так и

вегетативным путем в культуре *in vitro* или *in vivo*. В объеме настоящего изобретения наиболее предпочтительны протопласты, клетки, каллусы, ткани, органы, семена, зародыши, пыльца, яйцеклетки, зиготы наряду с любым иным материалом для размножения, полученным из трансгенных растений. Целью настоящего изобретения также являются части растений, например, такие как цветки, стебли, плоды, листья, корни, происходящие из мутированных растений или их ранее мутированных потомков, предпочтительно трансформированных с помощью методов по настоящему изобретению и поэтому состоящих по меньшей мере частично из мутированных клеток.

Предпочтительно растение по данному изобретению выбирают из группы, включающей ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare*), сорго двуцветное (*Sorghum bicolor*), рожь (*Secale cereale*), тритикале, сахарный тростник (*Saccharum officinarum*), кукурузу (*Zea mays*), могопар (*Setaria italica*), рис посевной (*Oryza sativa*), *Oryza minuta*, *Oryza australiensis*, *Oryza alta*, пшеницу мягкую (*Triticum aestivum*), *Triticum durum*, *Hordeum bulbosum*, трахину двуколосковую (*Brachypodium distachyon*), морской ячмень (*Hordeum marinum*), эгилопс Тауша (*Aegilops tauschii*), яблоню домашнюю (*Malus domestica*), *Beta vulgaris*, подсолнечник однолетний (*Helianthus annuus*), австралийскую морковь (*Daucus glochidiatus*), американскую дикую морковь (*Daucus pusillus*), *Daucus muricatus*, морковь обыкновенную (*Daucus carota*), эвкалипт большой (*Eucalyptus grandis*), *Erythrante guttata*, *Genlisea aurea*, табак лесной (*Nicotiana sylvestris*), *Nicotiana tomentosiformis*, табак обыкновенный (*Nicotiana tabacum*), томат (*Solanum lycopersicum*), картофель (*Solanum tuberosum*), кофе конголезский (*Coffea canephora*), виноград культурный (*Vitis vinifera*), огурец обыкновенный (*Cucumis sativus*), шелковицу (*Morus notabilis*), резуховидку песчаную (*Arabidopsis arenosa*), *Arabidopsis lyrata*, резуховидку Таля (*Arabidopsis thaliana*), *Crucihimalaya himalaica*, *Crucihimalaya wallichii*, сердечник извилистый (*Cardamine flexuosa*), клоповник виргинский (*Lepidium virginicum*), пастушью сумку обыкновенную (*Capsella bursa-pastoris*), *Olmarabidopsis pumila*, резуху волосистую (*Arabis hirsuta*), рапс (*Brassica napus*), капусту огородную (*Brassica oleracea*), *Brassica rapa*, редьку посевную (*Raphanus sativus*), *Brassica juncea*, горчицу черную (*Brassica nigra*), *Eruca vesicaria sativa*, апельсин (*Citrus sinensis*), *Jatropha curcas*, *Glycine max* и тополь волосистоплодный (*Populus trichocarpa*).

Наиболее предпочтительно растение выбирают из группы, включающей ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare*), сорго двуцветное

(*Sorghum bicolor*), рожь (*Secale cereale*), тритикале, сахарный тростник (*Saccharum officinarium*), кукурузу (*Zea mays*), рис посевной (*Oryza sativa*), пшеницу мягкую (*Triticum aestivum*), *Triticum durum*, *Avena sativa*, *Hordeum bulbosum*, *Beta vulgaris*, подсолнечник однолетний (*Helianthus annuus*), морковь обыкновенную (*Daucus carota*), табак обыкновенный (*Nicotiana tabacum*), томат (*Solanum lycopersicum*), картофель (*Solanum tuberosum*), кофе конголезский (*Coffea canephora*), виноград культурный (*Vitis vinifera*), огурец обыкновенный (*Cucumis sativus*), резуховидку Таля (*Arabidopsis thaliana*), рапс (*Brassica napus*), капусту огородную (*Brassica oleracea*), *Brassica rapa*, *Brassica juncea*, горчицу черную (*Brassica nigra*), редьку посевную (*Raphanus sativus*) и *Glycine max*.

В предпочтительном варианте осуществления растение по данному изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую СЕННЗ, являющийся либо эндогенным геном, либо трансгеном.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение касается растения, получаемого с использованием принципов по данному изобретению, где по меньшей мере одна замена аминокислоты интродуцируется в нуклеотидную последовательность, кодирующую СЕННЗ, нетрансгенно или трансгенно.

Предпочтителен вариант осуществления изобретения, где по меньшей мере одной мутации подвергается эндогенный ген СЕННЗ, при этом получаемое растение не является трансгенным. Предпочтительно, чтобы мутация осуществлялась посредством нетрансгенного мутагенеза, мутагенеза транспозоном, в частности химического мутагенеза, предпочтительно с применением ЭМС (этилметансульфонат)-индуцированного TILLING или целевого редактирования генома.

Таким образом, настоящее изобретение относится к растению, в котором нетрансгенное введение по меньшей мере одной мутации, вызывающее изменение аминокислотной последовательности белка СЕННЗ, которое придает биологическую активность гаплоидного индуктора, осуществляется с применением химического мутагенеза, в частности с применением методики TILLING.

Еще в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения введение по меньшей мере одной мутации в растение осуществляется в форме трансгена. Предпочтительно, чтобы это происходило посредством трансформации вектора, содержащего полинуклеотид, включающий

нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере сегмент CENH3, содержащий по меньшей мере одно изменение аминокислотной последовательности, предпочтительно такое, как здесь описано. Методы трансформации растения и методы встраивания трансгена в геном растения хорошо известны специалисту в данной области техники.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения обеспечивается растение, в котором трансгенное внесение изменения в аминокислотную последовательность белка CENH3 происходят посредством трансформации вектора, содержащего полинуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере сегмент белка CENH3 или домена CATD белка CENH3, имеющего замену по меньшей мере одной аминокислотной последовательности, предпочтительно имеющего замену по меньшей мере одной аминокислотной последовательности одной из специфических аминокислот консенсусной последовательности SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, либо приведенных в Таблице 1, Таблице 2, Таблице 3, Таблице 4, Таблице 5, Таблице 6, Таблице 7 или Таблице 8.

Предпочтительно, чтобы трансформация проводилась с применением *Agrobacterium*-опосредованного метода, методов погружения цветочных почек или бомбардировки частицами.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения трансформация полинуклеотида, включающего нуклеотидную последовательность, кодирующую измененный белок CENH3 по данному изобретению, происходит в растении в форме введения трансгена, при этом один или оба аллеля эндогенного гена CENH3 предпочтительно инактивируются, либо нокаутируются. В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения трансформация полинуклеотида, включающего нуклеотидную последовательность, кодирующую измененный белок CENH3 по данному изобретению, происходит в растении в форме введения трансгена, при этом имеет место сверхэкспрессия трансгена, чтобы он мог быть более компетентным, чем эндогенный белок CENH3, и предпочтительным в процессе формирования кинетохорного комплекса.

Настоящее изобретение также обеспечивает растение, получаемое, в частности полученное, с использованием метода по данному изобретению и характеризующееся тем, что оно обладает биологической активностью гаплоидного индуктора.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения метод получения растения, обладающего биологической активностью гаплоидного индуктора по данному изобретению, не является по существу биологическим методом.

Настоящее изобретение также обеспечивает метод создания растения, обладающего биологической активностью гаплоидного индуктора по данному изобретению, состоящий из следующих стадий:

- i) обработка семян растения достаточным количеством мутагенного этилметансульфоната (ЭМС) для получения растений M1,
- ii) обеспечение производства достаточного количества фертильных растений M2,
- iii) выделение геномной ДНК из растений M2 и
- iv) отбор индивидуумов, обладающих по меньшей мере мутацией, вызывающей изменение аминокислотной последовательности CENH3.

Настоящее изобретение также касается предпочтительного варианта метода создания растения, обладающего биологической активностью гаплоидного индуктора по данному изобретению, состоящего из следующих стадий:

- xx) обеспечение вектора, содержащего полинуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один сегмент аминокислотной последовательности белка CENH3, при этом полинуклеотид содержит по меньшей мере одну мутацию, вызывающую аминокислотной последовательности белка CENH3,
- yy) трансформация растительной клетки вектором, при этом растительная клетка предпочтительно содержит один или оба эндогенных аллеля гена CENH3, которые инактивированы или нокаутированы, и
- zz) регенерация растения, обладающего биологической активностью гаплоидного индуктора, из растительной клетки.

Настоящее изобретение касается еще одного предпочтительного варианта метода создания растения, обладающего биологической активностью гаплоидного индуктора по данному изобретению, состоящего из следующих стадий:

yy) трансформация растительной клетки посредством полинуклеотида, включающего нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один сегмент белка CENH3, при этом полинуклеотид содержит по меньшей мере одну мутацию, вызывающую изменение аминокислотной последовательности белка CENH3, либо вектора, содержащего полинуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один сегмент белка CENH3, при этом полинуклеотид содержит по меньшей мере одну мутацию, вызывающую изменение аминокислотной последовательности белка CENH3, и

zz) регенерация растения, обладающего биологической активностью гаплоидного индуктора, из растительной клетки.

В частности, настоящее изобретение относится к гаплоидному растению, получаемому, в частности полученному, путем:

а) скрещивания растения, обладающего биологической активностью гаплоидного индуктора по данному изобретению с растением, экспрессирующим белок CENH3 дикого типа, и, как вариант,

б) идентификации гаплоидного потомства, создаваемого на стадии скрещивания.

Предпочтительно, чтобы идентифицированное гаплоидное растение можно было переводить в удвоенный гаплоид, предпочтительно в результате обработки колхицином, что также является частью настоящего изобретения. Таким образом, настоящее изобретение также касается удвоенного гаплоида, получаемого, в частности полученного, путем перевода гаплоидного растения по данному изобретению в удвоенный гаплоид в результате обработки колхицином или спонтанного удвоения хромосом.

Настоящее изобретение также обеспечивает метод создания гаплоидного растения, состоящий из следующих стадий:

а) скрещивание растения, обладающего биологической активностью гаплоидного индуктора по данному изобретению с растением, экспрессирующим белок CENH3 дикого типа, и

б) идентификация гаплоидного потомства, создаваемого на стадии скрещивания.

На следующей стадии с) отобранное гаплоидное растение предпочтительно переводят в удвоенный гаплоид, предпочтительно в

результате обработки колхицином. Таким образом, настоящее изобретение также касается метода создания удвоенного гаплоида.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения обеспечиваемый способ не является по существу биологическим способом.

В частности, способы, о которых идет речь, не основываются только на, в частности не заключаются в, таких естественных факторах, как скрещивание или селекция, а фактически на технических принципах получения специфически мутированной нуклеотидной последовательности, осуществляемого с участием человека. В соответствии с настоящим изобретением в нуклеотидную последовательность и растение по изобретению вводится специфический структурный признак, а именно мутация, которая не вызвана посредством или не связана с каким-нибудь естественным фактором, таким как скрещивание или селекция.

Как частный случай осуществления настоящего изобретения обеспечивается способ, включающий стадию скрещивания, при этом указанная стадия скрещивания не дает (что обычно бывает при скрещивании) гетерозиготное потомство, а по существу гомозиготное потомство. Кроме того, гаплоидия у потомства не является результатом смешения генов растений, использованных для полового скрещивания. Более того, заявляемый в настоящем изобретении процесс создания удвоенного гаплоида не встречается в природе.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ облегчения цитоплазматического обмена, состоящий из следующих стадий:

х) скрещивание растения по данному изобретению в качестве материнского родителя с растением, экспрессирующим белок СЕНН3 дикого типа в качестве отцовского родителя, и

у) получение потомства гаплоидного растения, содержащего хромосомы отцовского родителя и цитоплазму материнского родителя.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения обеспечиваемый способ не является по существу биологическим способом. Указанный способ не является по существу биологическим способом по тем же причинам, которые были указаны выше, в частности потому, что он не основывается на таких естественных факторах, как скрещивание и селекция, а, в основном, в значительной степени на технических принципах получения конкретной мутации в нуклеотидной последовательности и растении по

данному изобретению. Кроме того, гаплоидия у потомства не является результатом смешения генов растений, использованных для полового скрещивания.

Способ может с успехом применяться для формирования цитоплазмической мужской стерильности (ЦМС). ЦМС вызывается внеядерным геномом (митохондрией или хлоропластов) и наследуется по материнской линии. Таким образом, растение по данному изобретению должно проявлять ЦМС и быть материнским родителем скрещивания. Подобным образом ЦМС можно вводить в партнера по скрещиванию, предпочтительно представляющего собой элитную линию культуры.

В предпочтительном варианте осуществления растение по данному изобретению можно также использовать в способ восстановления мужской фертильности путем введения нормальной цитоплазмы в партнера по скрещиванию, проявляющего ЦМС. В результате такого скрещивания хромосомы растения, проявляющего ЦМС, вводятся в нормальную цитоплазму гаплоидного индуктора по данному изобретению, который не проявляет ЦМС. Однако при этом образование пыльцы у растения, проявляющего ЦМС, необходимо индуцировать посредством температуры, освещенности, продолжительности дня и т.п.

Не ограничиваясь только теорией, возможная модель того, как способы по данному изобретению работают и, в частности, способ элиминации хромосомы одного из родителей в *индукторе CENH3 x дикий тип CENH3* межвидовых гибридных зародышей, выглядит следующим образом: (A) Предположительно полученные из гаплоидного индуктора яйцеклетки содержат либо меньшее количество CENH3, либо по сравнению с диким типом уменьшенное количество неизвестной “сигнатуры, требуемой для CENH3-трансгенерации”. Уменьшенное количество материнского CENH3 менее возможно, так как исследования, проведенные с репортерным геном CENH3-GFP, показывают, что ядра спермиев, а не яйцеклетки, маркируются CENH3. Однако все еще возможно, что остаточные материнские CENH3, генерирующие “центромерный импринтинг”, передаются потомству. (B) В течение нескольких часов после оплодотворения отцовский CENH3 дикого типа также активно удаляется из зиготного ядра и (C) центромерная повторная загрузка CENH3-GFP в зиготу происходит на стадии 16-ядерного развития эндосперма у *A. thaliana*. (D) В зародышах, подвергающихся гаплоидизации, центромерная повторная загрузка материнских хромосом нарушается или замедляется, что приводит к расхождению хромосом

вследствие неактивности центромеры в анафазе. Как следствие, микроядерные хромосомы *гаплоидного индуктора* деградируют и (E) развивается гаплоидный зародыш. Гаплоидные зародыши содержат хромосомы, полученные от отцовской формы, на фоне цитоплазмы, полученной от материнской формы.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, включающему нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один сегмент аминокислотной последовательности белка CENH3 или белок CENH3, при этом полинуклеотид содержит по меньшей мере одну мутацию, вызывающую изменение аминокислотной последовательности белка CENH3.

Настоящее изобретение также относится к вектору, в частности вирусному вектору, конструкции или плазмиде, которые содержат указанный полинуклеотид, а также, если имеются, связанные последовательности, предпочтительно такие, как здесь описано.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения полинуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую сегмент белка CENH3, предпочтительно содержит по меньшей мере полную кодирующую область CENH3, в частности ген CENH3.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения полинуклеотид или кодирующая последовательность CENH3 может связываться с регуляторными элементами, такими как 5'- и/или 3'-регуляторные элементы, наиболее предпочтительно с промотором, предпочтительно конститутивным или индуцируемым промотором.

Растительная клетка, содержащая указанный полинуклеотид или вектор в качестве трансгена, является клеткой по данному изобретению.

В контексте настоящего изобретения под используемым здесь термином “содержащий” следует понимать “включающий” или “имеющий”, что означает, что кроме явно указанного элемента возможно присутствуют и другие элементы.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения под используемым здесь термином “включающий” следует также понимать “состоящий из”, что исключает присутствие других элементов, кроме явно указанного элемента.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения под используемым здесь термином “включающий” следует также понимать “состоящий по существу из”, что исключает присутствие других элементов, подчеркивающих значимость раскрываемого принципа, кроме явно указанного элемента.

Другие предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения являются предметом зависимых пунктов формулы изобретения.

Изобретение далее будет раскрыто более подробно посредством не ограничивающих примеров и рисунка.

Протокол последовательностей включает:

SEQ ID NO. 1: консенсусная аминокислотная последовательность N-терминального хвостового домена CENH3 (часть A),

SEQ ID NO. 2: консенсусная аминокислотная последовательность N-терминального хвостового домена CENH3 (часть B),

SEQ ID NO. 3: консенсусная аминокислотная последовательность α N-спирали CENH3,

SEQ ID NO. 4: консенсусная аминокислотная последовательность α 1-спирали CENH3,

SEQ ID NO. 5: консенсусная аминокислотная последовательность петли1 CENH3,

SEQ ID NO. 6: консенсусная аминокислотная последовательность α 2-спирали CENH3,

SEQ ID NO. 7: консенсусная аминокислотная последовательность петли2 CENH3,

SEQ ID NO. 8: : консенсусная аминокислотная последовательность α 3-спирали CENH3,

SEQ ID NO. 9: консенсусная аминокислотная последовательность C-терминального домена CENH3,

SEQ ID NO. 10: нуклеотидная последовательность кодирующей последовательности (кДНК) CENH3 дикого типа *A. thaliana*,

SEQ ID NO. 11: аминокислотная последовательность CENH3 дикого типа *A. thaliana*,

SEQ ID NO. 12: нуклеотидная последовательность геномной последовательности (геномной ДНК) CENH3 дикого типа *B. napus*,

SEQ ID NO. 13: нуклеотидная последовательность кодирующей последовательности (кДНК) CENH3 дикого типа *B. napus*,

SEQ ID NO. 14: аминокислотная последовательность CENH3 дикого типа *B. napus*,

SEQ ID NO. 15: нуклеотидная последовательность геномной последовательности (геномной ДНК) CENH3 дикого типа *S. bicolor*,

SEQ ID NO. 16: нуклеотидная последовательность кодирующей последовательности (кДНК) CENH3 дикого типа *S. bicolor*,

SEQ ID NO. 17: аминокислотная последовательность CENH3 дикого типа *S. bicolor*,

SEQ ID NO. 18: нуклеотидная последовательность геномной последовательности (геномной ДНК) CENH3 дикого типа *Z. mays*,

SEQ ID NO. 19: нуклеотидная последовательность кодирующей последовательности (кДНК) CENH3 дикого типа *Z. mays*,

SEQ ID NO. 20: аминокислотная последовательность CENH3 дикого типа *Z. mays*,

SEQ ID NO. 21: нуклеотидная последовательность геномной последовательности (геномной ДНК) CENH3 дикого типа *B. vulgaris*,

SEQ ID NO. 22: нуклеотидная последовательность кодирующей последовательности (кДНК) CENH3 дикого типа *B. vulgaris*,

SEQ ID NO. 23: аминокислотная последовательность CENH3 дикого типа *B. vulgaris*, а также

SEQ ID NO. 24: нуклеотидная последовательность геномной последовательности (геномной ДНК) Му-мутированного CENH3 *Z. mays*.

На рисунке представлено выравнивание аминокислотных последовательностей *Arabidopsis thaliana* (первый ряд), *Beta vulgaris* (второй ряд), *Brassica napus* (третий ряд), *Zea mays* (четвертый ряд), *Sorghum bicolor*

(пятый ряд), а также диаграмма, показывающая уровень консервативности этих пяти видов растений.

Примеры

Идентификация мутантов CENH3

Для идентификации мутаций внутри гена CENH3, вызывающих изменение аминокислотной последовательности транслируемого CENH3, где изменение способно придавать биологическую активность гаплоидного индуктора растению, исследовали все сегменты гена CENH3 в отношении подходящих мутаций, несмотря на то, что Ravi и Chan (2010) подчеркивали особую важность только N-терминального домена. Исследования мутантов в других сегментах, таких как $\alpha 2$ -спираль (еще не опубликованы), дали представление о том, что помимо всего прочего модификация других сегментов может приводить к дестабилизации способности CENH3 связываться с ДНК.

С целью обнаружения мутированных генов CENH3 в различного вида растениях были созданы TILLING-популяции, характеризующиеся высоким уровнем мутаций, для кукурузы обыкновенной (*Zea mays*), рапса (*Brassica napus*), сорго двуцветного (*Sorghum bicolor*) и сахарной свеклы (*Beta vulgaris*) и проскринированы на содержание мутаций CENH3. Для этого, после создания ампликонов, охватывающих все экзоны генов CENH3, были проанализированы от 1000 до 10000 индивидуумов каждого вида растений посредством метода секвенирования по Сэнгеру. Кроме того, растения сахарной свеклы M2 тестировали на наличие мутаций с использованием специфичной ПЦР.

Кроме того, воздействие идентифицированной мутации внутри гена CENH3 на первичную и вторичную структуру закодированного белка оценивали, используя, помимо прочего, программное обеспечение Prof (Rost, В. и Sander, С. (1994a), “Объединение эволюционной информации и нейронных сетей для предсказания вторичной структуры белка”, *Proteins*, 19(1), 55-72; Rost, В. и Sander, С. (1994b), “Сохранение и предсказание доступности растворителю в белковых семействах”, *Proteins*, 20(3), 216-26; Rost, В., Cadafio, R., Fariselli, P. и Sander, С. (1995), “Трансмембранные спирали, предсказанные с 95% точностью”, *Protein Sci*, 4(3), 521-33). В Таблицах 9-12 показаны идентифицированные мутации в *B. napus*), *Z. mays*, *S. Bicolor* и *B. vulgaris*, которые разделены на мутации, вызывающие ошибку сплайсинга, и мутации, вызывающие аминокислотную замену. Мутация в

сайте сплайсинга представляет особый интерес. Такая мутация(и) может вызывать нарушение в сплайсинге (ошибка сплайсинга), что приводит к увеличению трансляционной клеточной продукции не полностью функционирующих белков CENH3, т.е. белков с нарушенной стабильностью, уменьшенной способностью связываться с ДНК, измененной геометрической формой, предпочтительно измененной вторичной или третичной структурой, либо с беспорядочным фолдингом, по сравнению полностью функционирующим белком CENH3 дикого типа. Растения с геномом, который был гетерозиготным в отношении такой мутации(й), были жизнеспособными.

Таблица 9. Мутация CENH3 из *Brassica napus* (aa: аминокислота; nd: не определена; y: да; n: нет). Замена аминокислоты показана как X#Y, т.е. аминокислота X (однобуквенный символ) заменена аминокислотой Y в положении #.

идентификатор мутации (Brassica napus)	кодон дикого типа	мутантный кодон	мутация	случайность во вторичной структуре
BN_CenH3_01			ошибка сплайсинга после aa в положении 18	nd
BN_CenH3_02			ошибка сплайсинга после aa в положении 33	nd
BN_CenH3_03			ошибка сплайсинга после aa в положении 37	nd
BN_CenH3_04			ошибка сплайсинга после aa в положении 37	nd
BN_CenH3_05			ошибка сплайсинга после aa в положении 163	nd
BN_CenH3_06	tcc	ttc	S9F	y
BN_CenH3_07	cga	caa	R16Q	y
BN_CenH3_08	tcg	ttg	S24L	y
BN_CenH3_09	gaa	aaa	E29K	n

BN_CenH3_10	ggt	gat	G30D	n
BN_CenH3_11	gcg	acg	A33T	n
BN_CenH3_12	ccg	ctg	P35L	y
BN_CenH3_13	agc	aac	S41N	n
BN_CenH3_14	gga	gaa	G43E	y
BN_CenH3_15	cct	tct	P50S	n
BN_CenH3_16	cca	cta	P55L	n
BN_CenH3_17	ggt	gat	G57D	n
BN_CenH3_18	gga	gaa	G61E	y
BN_CenH3_19	cga	caa	R65Q	y
BN_CenH3_20	cga	tga	R65stop	n
BN_CenH3_21	cct	tct	P71S	y
BN_CenH3_22	gcc	acc	A105T	y
BN_CenH3_23	cga	caa	R110Q	y
BN_CenH3_25	agt	att	S114N	y
BN_CenH3_26	cct	tct	P121S	n
BN_CenH3_27	tgg	tga	W127stop	n
BN_CenH3_28	ctt	ttt	L132F	y
BN_CenH3_29	gcg	acg	A138T	n
BN_CenH3_30	tgc	tac	C153Y	y
BN_CenH3_31	gct	gtt	A154V	y
BN_CenH3_32	cgt	cat	R159H	n

BN_CenH3_33	gtt	att	V160I	n
BN_CenH3_34	gat	aat	D166N	n
BN_CenH3_35	gag	aag	E168K	n
BN_CenH3_36	cgt	cat	R172H	n
BN_CenH3_37	ctt	ttt	L173F	n
BN_CenH3_38	gga	gaa	G174E	y
BN_CenH3_39	aga	aaa	R178K	n

Таблица 10. Мутация CENH3 из *Zea mays* (aa: аминокислота; nd: не определена; y: да; n: нет). Замена аминокислоты показана как X#Y, т.е. аминокислота X (однобуквенный символ) заменена аминокислотой Y в положении #.

идентификатор мутации (<i>Zea mays</i>)	кодон дикого типа	мутантный кодон	мутация	случайность во вторичной структуре
ZM_CenH3_01			ошибка сплайсинга после aa в положении 89	nd
ZM_CenH3_02			ошибка сплайсинга после aa в положении 115	nd
ZM_CenH3_03			ошибка сплайсинга после aa в положении 141	nd
ZM_CenH3_04	gcg	acg	A32T	nd
ZM_CenH3_05	gaa	aaa	E35K	nd
ZM_CenH3_06	cca	tca	P56S	nd
ZM_CenH3_07	gca	aca	A107T	nd
ZM_CenH3_08	caa	taa	Q114stop	nd

ZM_CenH3_09	gga	gaa	G152E	nd
ZM_CenH3_10	cgt	cat	R155H	nd
ZM_CenH3_11	gtg	atg	V89M	nd
ZM_CenH3_12	aca	ata	T139I	nd

Таблица 11. Мутация CENH3 из *Sorghum bicolor* (aa: аминокислота; nd: не определена; у: да; n: нет). Замена аминокислоты показана как X#Y, т.е. аминокислота X (однобуквенный символ) заменена аминокислотой Y в положении #.

идентификатор мутации (S. bicolor)	кодон дикого типа	мутантный кодон	мутация	случайность во вторичной структуре
SB_CenH3_01			ошибка сплайсинга после aa в положении 26	nd
SB_CenH3_02	gca	gta	A62V	nd
SB_CenH3_03	act	agt	T64S	nd
SB_CenH3_04	gca	gta	A95V	nd
SB_CenH3_05	gca	aca	A25T	nd
SB_CenH3_06	tcg	ttg	S157L	nd

Таблица 12. Мутация CENH3 из *Beta vulgaris* (aa: аминокислота; nd: не определена; у: да; n: нет). Замена аминокислоты показана как X#Y, т.е. аминокислота X (однобуквенный символ) заменена аминокислотой Y в положении #.

идентификатор мутации (Beta vulgaris)	кодон дикого типа	мутантный кодон	мутация	случайность во вторичной структуре
Bv_CENH3_01	gat	aat	D46N	nd

Bv_CENH3_02	gat	ggt	D46G	nd
Bv_CENH3_03	aga	aaa	A2K	nd
Bv_CENH3_04	ctg	cag	L106Q	nd
Bv_CENH3_05	ctt	cct	L109P	nd
Bv_CENH3_06	caa	cta	Q110L	nd

Кроме мутаций сайтов сплайсинга и точечных мутаций, вызывающих аминокислотные замены в аминокислотной последовательности белка CENH3, был идентифицирован кукурузный мутант (называемый Му-мутант), содержащий инсерцию транспозона в 5'-нетранслируемой области гена CENH3 (см. SEQ ID NO. 24). Эта мутация вызывает расширение N-терминального хвостового домена. Таким образом, воздействие этой мутации очень схоже с воздействием мутации, описанной Ravi & Chan (2010), за исключением того, что эта мутация не является трансгенной.

Тестирование мутантов CENH3

Для оценки биологической активности гаплоидного индуктора в идентифицированных мутантах и для тестирования гаплоиндуцирующей способности материнской и отцовской форм мутантные растения необходимо было скрещивать с другим растением-тестером того же вида. Предполагаемое гаплоидное потомство в результате такого скрещивания может быстро определяться, если используемые линии-тестеры несут рецессивную не-CENH3 мутацию. Значит, у гаплоидных растений проявляется рецессивный фенотип. Например, у кукурузы может проявляться мутация «глянцевость» (Мутанты кукурузы, Neuffer, MG и соавт. (1997), Cold Spring Harbor Laboratory, Нью-Йорк).

Результаты цитогенетического анализа участия индукторов в митозе и мейозе также свидетельствуют о пригодности мутантов в качестве гаплоидных индукторов. Гомозиготность определяли, используя молекулярные маркеры, полиморфизм тестера и потенциального индуктора. Гаплоидность как таковую тестировали цитогенетически.

При скрещиваниях с растениями-тестерами TILLING-растения с мутированным эндогенным CENH3 давали по меньшей мере 0,4% гаплоидного потомства. Часто, но не всегда, уровень индуцирования был выше, если при скрещивании тестер использовали в качестве материнского родителя.

Например, у *Brassica napus* в результате мутаций на основании аминокислотных замен в N-терминальном хвостовом домене уровни индуцирования составляют по меньшей мере 0,5% и частично достигают более 2%. Следовательно, местоположения мутаций не являются специфичными для определенной области этого домена, а скорее распределены по всему домену. Длина N-терминального хвостового домена у *Brassica napus* составляет 1-84 аминокислот. Мутации, придающие биологическую активность гаплоидного индуктора, могут, например, находиться в положениях 9, 16, 24, 29, 30, 33, 41, 43, 50, 55, 57 и 61, при этом не все эти мутации обязательно приводят к изменению вторичной структуры белка (рассчитано *in silico*). Сопоставимые результаты получены для более консервативного домена гистоновой складки, состоящего из трех спиралей и двух петель. Хотя во всем домене гистоновой складки могут обнаруживаться подходящие мутации, в среднем более высокие уровни индуцирования показывали α 2-спираль, домен CATD и петля2. Исходя из этих данных изучения N-терминального хвостового домена и домена гистоновой складки, можно предположить, что и другие не тестированные положения и другие не тестированные аминокислотные замены будут придавать ту же или даже улучшенную гаплоидную индуктивность. Более того, другим видом модификации эндогенного гена CENH3 является замена нуклеотидов в сайтах сплайсинга, что в итоге приводит к ошибкам сплайсинга. Такие мутации также подходят для придания биологической активности гаплоидного индуктора. Наблюдаемые уровни индуцирования показывали по меньшей мере 0,5% гаплоидного потомства. Даже в этом случае можно предположить, что и другие не тестированные сайты сплайсинга будут придавать ту же или даже улучшенную гаплоидную индуктивность.

Например, у *Zea mays* в результате мутаций на основании аминокислотных замен в N-терминальном хвостовом домене уровни индуцирования составляют по меньшей мере 0,4%. Следовательно, местоположения мутаций не являются специфичными для определенной области этого домена, а скорее распределены по всему домену. Длина N-терминального хвостового домена у *Zea mays* составляет 1-62 аминокислот. Мутации, придающие биологическую активность гаплоидного индуктора,

могут, например, находиться в положениях 32, 35 и 56. Сопоставимые результаты получены для более консервативного домена гистоновой складки, состоящего из трех спиралей и двух петель. Исходя из этих данных изучения N-терминального хвостового домена и домена гистоновой складки, можно предположить, что и другие не тестированные положения и другие не тестированные аминокислотные замены будут придавать ту же или даже улучшенную гаплоидную индуктивность. Более того, другим видом модификации эндогенного гена CENH3 является замена нуклеотидов в сайтах сплайсинга, что в итоге приводит к ошибкам сплайсинга. Такие мутации также подходят для придания биологической активности гаплоидного индуктора. Наблюдаемые уровни индуцирования показывали по меньшей мере 0,4% гаплоидного потомства. Даже в этом случае можно предположить, что и другие не тестированные сайты сплайсинга будут придавать ту же или даже улучшенную гаплоидную индуктивность.

Mu-мутант, содержащий инсерцию транспозона в 5'-нетранслируемой области гена CENH3 (ID NO. 24) тестировали на биологическую активность гаплоидного индуктора. Эта нетрансгенная мутация порождает уровень индуцирования более 1%.

Кроме того, результаты скрещивания различных культур показывают, что идентифицированные и отмеченные мутации могут быть функциональными и в других видах растений. Таким образом, мутации могут вводиться в другие виды растений посредством таких технологий, как TILLING, мутагенез или геномное редактирование (например, нуклеазы CRISPR/Cas, TALEN, «цинковые пальцы» и т.д.). Более того, биологическую активность и эффективность гаплоидного индуктора может быть еще больше улучшена посредством объединения различных идентифицированных мутаций в одном растении и/или путем модификации генетического фона гаплоидного индуктора. Объединение различных мутаций может эффективно достигаться с помощью геномного редактирования, либо посредством создания вторичной мутации мутантного гаплоидного индуктора.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение, обладающее биологической активностью гаплоидного индуктора и содержащее полинуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую центромерный белок-гистон H3 (CENH3),

отличающееся тем, что полинуклеотид содержит по меньшей мере одну мутацию, вызывающую изменение аминокислотной последовательности белка CENH3 в α 2-спирали, соответствующей нуклеотидам в положении 379-465 последовательности SEQ ID NO. 10 белка CENH3 из *Arabidopsis thaliana*, приведенного в последовательности SEQ ID NO. 11,

и указанное изменение является заменой одной или более аминокислот, выбранных из группы, включающей

- i. аланин, пролин, валин или лейцин в положении 1,
- ii. лейцин или валин в положении 4,
- iii. изолейцин или лейцин в положении 7,
- iv. глутамин в положении 8,
- v. аланин или серин в положении 10,
- vi. цистеин или лейцин в положении 25,
- vii. аланин или треонин в положении 26;

и причём указанное изменение придает растению биологическую активность гаплоидного индуктора.

2. Растение по п. 1, отличающееся тем, что аминокислота аланин в положении 1 последовательности SEQ ID NO. 6 заменена предпочтительно на треонин, или аминокислота аланин в положении 107 последовательности SEQ ID NO. 20 заменена предпочтительно на треонин, или аминокислота лейцин в положении 4 последовательности SEQ ID NO. 6 заменена предпочтительно на фенилаланин или глутамин, или аминокислота лейцин в положении 132 последовательности SEQ ID NO. 14 или положении 106 последовательности SEQ ID NO. 23 заменена предпочтительно на фенилаланин или глутамин,

или аминокислота лейцин в положении 7 последовательности SEQ ID NO. 6 заменена предпочтительно на пролин, или аминокислота лейцин в положении 109 последовательности SEQ ID NO. 23 заменена предпочтительно на пролин, или аминокислота глутамин в положении 8 последовательности SEQ ID NO. 6 заменена предпочтительно на стоп-сигнал или лейцин, или аминокислота глутамин в положении 114 последовательности SEQ ID NO. 20 или положении 110 последовательности SEQ ID NO. 23 заменена предпочтительно на стоп-сигнал или лейцин, или аминокислота аланин в положении 10 последовательности SEQ ID NO. 6 заменена предпочтительно на треонин, или аминокислота аланин в положении 138 последовательности SEQ ID NO. 14 заменена предпочтительно на треонин, или аминокислота цистеин в положении 25 последовательности SEQ ID NO. 6 заменена предпочтительно на тирозин, или аминокислота цистеин в положении 153 последовательности SEQ ID NO. 14 заменена предпочтительно на тирозин, или аминокислота аланин в положении 26 последовательности SEQ ID NO. 6 заменена предпочтительно на валин, или аминокислота аланин в положении 154 последовательности SEQ ID NO. 14 заменена предпочтительно на валин.

3. Растение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что полинуклеотид, содержащий по меньшей мере одну мутацию, представляет собой эндогенный ген или трансген.
4. Часть растения по любому из предшествующих пунктов.
5. Часть растения по п. 4, которая представляет собой вегетативный орган побега, корень, цветок или цветковый орган, семя, плод, семязачаток, зародыш, растительную ткань или растительную клетку.
6. Способ создания гаплоидного растения, включающий стадии:
 - a. скрещивание растения по пп. 1-3 с растением, экспрессирующим белок SENH3 дикого типа, и
 - b. идентификацию гаплоидного потомства растения, получаемого на стадии скрещивания.

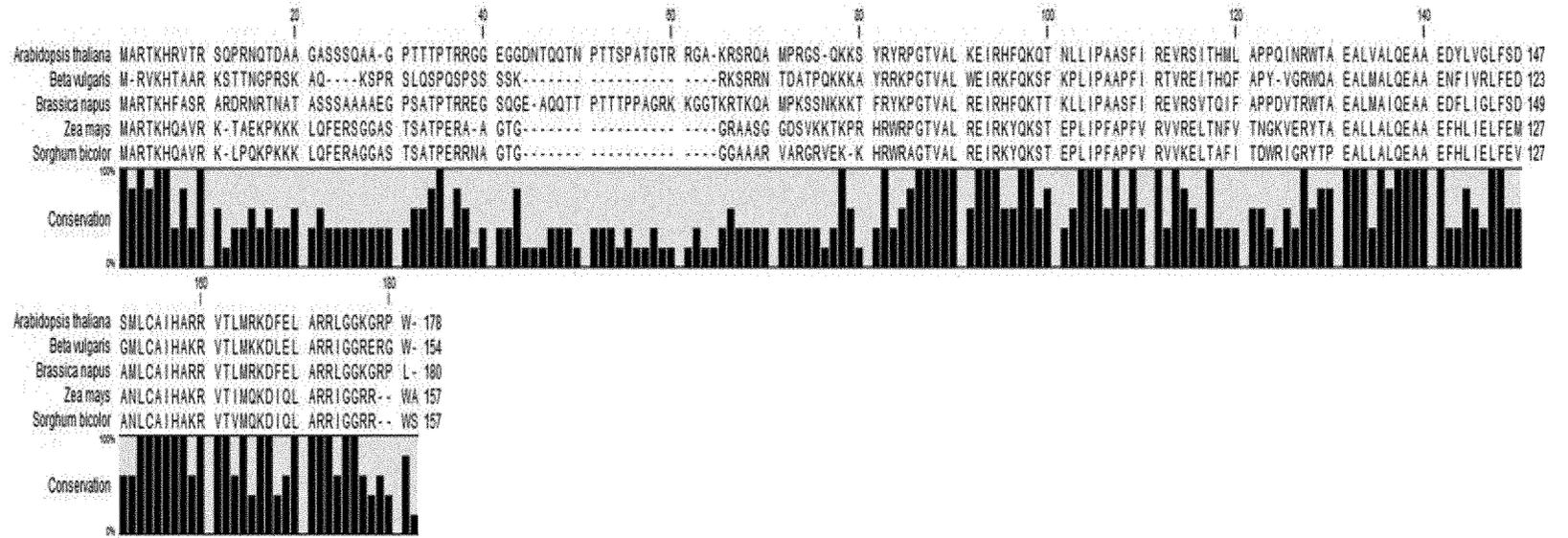
7. Способ создания удвоенного гаплоидного растения, включающий стадии:
 - a. скрещивания растения по пп. 1-3 с растением, экспрессирующим белок CENH3 дикого типа,
 - b. идентификацию гаплоидного потомства растения, получаемого на стадии скрещивания, и
 - c. перевод гаплоидного потомства растения в удвоенное гаплоидное растение.
8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что на стадии c) гаплоидное потомство растения переводится в удвоенное гаплоидное растение путем обработки колхицином или посредством спонтанного удвоения хромосом.
9. Способ замены цитоплазмы растения, включающий стадии:
 - x. скрещивания растения по пп. 1-3 в качестве материнского родителя с растением, экспрессирующим белок CENH3 дикого типа, в качестве отцовского родителя, и
 - y. получения гаплоидного потомства растения, содержащего хромосомы отцовского родителя и цитоплазму материнского родителя.
10. Способ создания растения по пп. 1-3, включающий стадии:
 - i. обработки семян растения эффективным количеством мутагена для получения растений M1,
 - ii. обеспечения производства фертильных растений M2,
 - iii. выделения геномной ДНК из растений M2 и
 - iv. отбора растений, содержащих по меньшей мере одну мутацию в полинуклеотиде, раскрытом в п. 1, включающем нуклеотидную последовательность, кодирующую центромерный белок-гистон H3 (CENH3), причем по меньшей мере одна мутация вызывает изменение аминокислотной последовательности белка CENH3 в α 2-спирали, соответствующей нуклеотидам в положении 379-465 последовательности SEQ ID NO. 10 белка CENH3 из *Arabidopsis thaliana*, приведенного в последовательности SEQ ID NO. 11.

11.Способ создания растения по п. 10, отличающийся тем, что в качестве мутагена используется этилметансульфонат.

12.Способ создания растения по пп.1-3, включающий стадии:

- yy) трансформации растительной клетки путём введения полинуклеотида, раскрытого в п. 1, или вектора, содержащего указанный полинуклеотид, и
- zz) регенерации растения, обладающего биологической активностью гаплоидного индуктора, из растительной клетки.

Рисунок 1



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference KWS0223PCT	FOR FURTHER ACTION		see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/EP2015/081 158	International filing date (<i>day/month/year</i>) 23 December 2015 (23-12-2015)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 23 December 2014 (23-12-2014)	
Applicant KWS SAAT SE			

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 11 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed
 a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established by this Authority to read as follows:

GENERATION OF HAPLOID PLANTS

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
 as suggested by the applicant
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2015/081158

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2015/081158

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-16(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/081158

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C12N15/82 C12N15/29 C07K14/415 A01H1/08 A01H5/00
 A01H5/06 A01H5/10
 ADD.
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C12N C07K A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/044132 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]; CHAN SIMON [US]; MARUTHACHALAM RAVI [US]) 14 April 2011 (2011-04-14) claims 1-33; pages 1-6, 11-24; Examples -----	1-16
X	MARUTHACHALAM RAVI & SIMON W L CHAN: "Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination", NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, UNITED KINGDOM, vol. 464, no. 7288, 25 March 2010 (2010-03-25), pages 615-620, XP002677783, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE08842 pages 615-617; methods; Figure 1; Table 1 ----- -/--	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 9 March 2016	Date of mailing of the international search report 14/02/2017
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Kurz, Birgit
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/081158

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Pooja Bhatnagar- Mathur ET AL: "Engineering Centromeres for Haploidy Induction in Grain Legumes", ICRISAT Asia Regional Planning Meeting, Patancheru, India, February 10-12, 2014, 1 February 2014 (2014-02-01), XP055193834, Patancheru, India Retrieved from the Internet: URL:http://ksiconnect.icrisat.org/wp-content/uploads/2014/02/6Pooja-DH-for-haploids.pdf [retrieved on 2015-06-05] the whole document</p>	1-16
A	<p>Izabel C. R. Moraes: "Structural requirements for CENH3 targeting to centromeric chromatin", 1 February 2011 (2011-02-01), XP055191122, Retrieved from the Internet: URL:http://d-nb.info/1025136047/34 [retrieved on 2015-05-22] page 53-56</p>	1-16
A	<p>MARUTHACHALAM RAVI ET AL: "A haploid genetics toolbox for Arabidopsis thaliana", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 5, 31 October 2014 (2014-10-31), page 5334, XP055191112, DOI: 10.1038/ncomms6334 Figures 1 and 2</p>	1-16
X,P	<p>RAHELEH KARIMI-ASHTIYANI ET AL: "Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 112, no. 36, 20 August 2015 (2015-08-20), pages 11211-11216, XP055233787, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1504333112 abstract; page 11211, 11212, 11213; figure 2; Materials and Methods: A. thaliana and B. vulgaris</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/081158

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>-& RAHELEH KARIMI-ASHTIYANI ET AL: "Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 112, no. 36, 20 August 2015 (2015-08-20), pages 11211-11216, XP055233810, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1504333112 the whole document -----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2015/081158

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011044132 A1	14-04-2011	AU 2010303635 A1 CA 2774941 A1 EP 2486135 A1 RU 2012118381 A US 2011083202 A1 US 2014090099 A1 US 2016057953 A1 WO 2011044132 A1	19-04-2012 14-04-2011 15-08-2012 20-11-2013 07-04-2011 27-03-2014 03-03-2016 14-04-2011

WO 2014110274 A2	17-07-2014	NONE	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-16(partially)

Plant having biological activity of a haploid inducer and comprising a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence encoding a centromer histone H3 (CENH3) protein, wherein the polynucleotide comprises at least one mutation causing an alteration of the amino acid sequence of the CENH3 protein and said alteration confers the biological activity of a haploid inducer, wherein the at least one mutation causes an alteration of the amino acid sequence of the CENH3 protein in at least the N-terminal domain corresponding to nucleotides from position 1 to position 246 set forth in SEQ ID NO: 10.

2. claims: 1-16(partially)

Plant having biological activity of a haploid inducer and comprising a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence encoding a centromer histone H3 (CENH3) protein, wherein the polynucleotide comprises at least one mutation causing an alteration of the amino acid sequence of the CENH3 protein and said alteration confers the biological activity of a haploid inducer, wherein the at least one mutation causes an alteration of the amino acid sequence of the CENH3 protein in at least the α N-helix corresponding to nucleotides from position 247 to position 291 set forth in SEQ ID NO: 10.

3. claims: 1-16(partially)

Plant having biological activity of a haploid inducer and comprising a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence encoding a centromer histone H3 (CENH3) protein, wherein the polynucleotide comprises at least one mutation causing an alteration of the amino acid sequence of the CENH3 protein and said alteration confers the biological activity of a haploid inducer, wherein the at least one mutation causes an alteration of the amino acid sequence of the CENH3 protein in at least the α 1-helix corresponding to nucleotides from position 307 to position 339 set forth in SEQ ID NO: 10.

4. claims: 1-16(partially)

Plant having biological activity of a haploid inducer and comprising a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence encoding a centromer histone H3 (CENH3) protein, wherein the polynucleotide comprises at least one mutation causing an alteration of the amino acid sequence of the

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

CENH3 protein and said alteration confers the biological activity of a haploid inducer, wherein the at least one mutation causes an alteration of the amino acid sequence of the CENH3 protein in at least loop1 corresponding to nucleotides from position 340 to position 378 set forth in SEQ ID NO: 10.

5. claims: 1-16(partially)

Plant having biological activity of a haploid inducer and comprising a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence encoding a centromer histone H3 (CENH3) protein, wherein the polynucleotide comprises at least one mutation causing an alteration of the amino acid sequence of the CENH3 protein and said alteration confers the biological activity of a haploid inducer, wherein the at least one mutation causes an alteration of the amino acid sequence of the CENH3 protein in at least the α 2-helix corresponding to nucleotides from position 379 to position 465 set forth in SEQ ID NO: 10.

6. claims: 1-16(partially)

Plant having biological activity of a haploid inducer and comprising a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence encoding a centromer histone H3 (CENH3) protein, wherein the polynucleotide comprises at least one mutation causing an alteration of the amino acid sequence of the CENH3 protein and said alteration confers the biological activity of a haploid inducer, wherein the at least one mutation causes an alteration of the amino acid sequence of the CENH3 protein in at least loop2 corresponding to nucleotides from position 466 to position 486 set forth in SEQ ID NO: 10.

7. claims: 1-16(partially)

Plant having biological activity of a haploid inducer and comprising a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence encoding a centromer histone H3 (CENH3) protein, wherein the polynucleotide comprises at least one mutation causing an alteration of the amino acid sequence of the CENH3 protein and said alteration confers the biological activity of a haploid inducer, wherein the at least one mutation causes an alteration of the amino acid sequence of the CENH3 protein in at least the α 3-helix corresponding to nucleotides from position 487 to position 516 set forth in SEQ ID NO: 10.

8. claims: 1-16(partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Plant having biological activity of a haploid inducer and comprising a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence encoding a centromer histone H3 (CENH3) protein, wherein the polynucleotide comprises at least one mutation causing an alteration of the amino acid sequence of the CENH3 protein and said alteration confers the biological activity of a haploid inducer, wherein the at least one mutation causes an alteration of the amino acid sequence of the CENH3 protein in at least the C-terminal domain corresponding to nucleotides from position 517 to position 534 set forth in SEQ ID NO: 10.
