

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048139**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.10.28**

(51) Int. Cl. *A01H 5/10* (2018.01)  
*C12N 15/82* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**202092307**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.03.06**

---

(54) **СПОСОБ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕТЕРОЗИСА РАСТЕНИЙ**

---

(31) **201810325528.4; 201811205889.1**

(32) **2018.04.12; 2018.10.16**

(33) **CN**

(43) **2021.02.01**

(86) **PCT/CN2019/077154**

(87) **WO 2019/196576 2019.10.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЧАЙНА НЭШНЛ РАЙС РИСЕРЧ  
ИНСТИТЮТ (CN)**

(72) Изобретатель:  
**Ван Кэцзянь, Ван Чунь (CN)**

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

(56) MIEULET, D. et al. "Turning Rice Meiosis into Mitosis" Cell Research, Vol. 26, 21 October 2016 (2016-10-21), ISSN: 1001-0602, pages 1242-1254, see abstract, and page 1243, left-hand column  
WO-A-2017087682  
US-A1-2014298507  
US-A1-2017067067

---

(57) Предложен способ использования гетерозиса растений, включающий следующие стадии: S1, трансформацию, с использованием технологии генных мутаций или геномной инженерии, мейоза половых клеток гибридов в подобие митоза с получением гамет, генотип и хромосомная плоидность которых соответствует гибридам; и S2, оказание влияния, с использованием технологии генных мутаций и геномной инженерии, на участие в развитии гамет или зародышей в растениях, где вовлеченный белок представляет собой белок MTL.

---

**B1**

**048139**

**048139**

**B1**

### Область техники

Настоящее раскрытие относится к области биотехнологии, а именно к способу использования гетерозиса растений.

#### Предшествующий уровень техники

Гетерозис относится к такому явлению, когда в биологическом мире две разновидности или два родственных вида с разным генетическим фоном гибридизируются с получением гибрида, и поколение гибрида лучше по таким признакам, как энергия роста, жизнеспособность, адаптивность, урожайность и т.д., чем их родители. Гетерозис является распространенным явлением в биологическом мире, и его широко используют при выращивании культур и в практике возделывания сельскохозяйственных культур.

Для применения гетерозиса в сельскохозяйственном производстве одним из важнейших звеньев является эффективная подготовка гибридных семян. У двудомных культур, таких как кукуруза и т.д., мужские цветки материнской инбредной линии могут быть удалены вручную (или механически), и пыльца другой инбредной линии (мужской родитель) может быть использована для опыления с получением гибридных семян. Эта операция относительно проста, поэтому гетерозис кукурузы использовался давно, и система проработана и широко используется. Однако также существует проблема, заключающаяся в том, что период цветения некоторых родителей не совпадает, что делает невозможным проведение крупномасштабного получения гибридных семян в полевых условиях.

Кроме того, в случае однодомных культур (таких как рис, пшеница и т.д.) нельзя достичь крупномасштабного получения гибридных семян, удаляя пыльцу от женского родителя. Например, рис: в настоящее время способ решения такой проблемы для риса заключается в использовании растений с характеристиками стерильности пыльцы в качестве женского родителя и использовании другого культивара в качестве мужского родителя с получением гибридов пыльцы, то есть системы применения гетерозиса, использующей мужскую стерильность в качестве основной технологии. При этом использование гетерозиса риса можно разделить на два технических подхода. Один из них представляет собой "трехлинейный" метод гибридизации со стерильностью пыльцы в результате ядерно-цитоплазматического взаимодействия в качестве основной технологии, а другой представляет собой "двухлинейный метод" гибридизации с фототермочувствительной генной мужской стерильностью, контролируемой естественным световым циклом и температурой в качестве основной технологии.

Как показано на фиг. 1А, в "трехлинейном методе" гибридизации используют линию с ядерно-цитоплазматической мужской стерильностью в качестве женского родителя и используют линию закрепителя мужской стерильности в качестве мужского родителя для серийного размножения семян, все из которых еще сохраняют стерильные характеристики; используют стерильную линию в качестве женского родителя и линию восстановителя в качестве мужского родителя для крупномасштабного получения гибридных семян, восстанавливая фертильность пыльцы и имея гетерозис, и гибридные семена используют для получения гибридного риса.

На фиг. 1Б показан "двухлинейный метод" гибридизации: та же рисовая линия, пыльца которой при определенных условиях является фертильной, и ее фертильность используют для размножения семян стерильной линии; при других конкретных условиях пыльца стерильна, ее стерильность используют для гибридизации с мужским родителем с получением гибридных семян.

Поскольку гибридный рис получает преимущество первого поколения гибридов, разделение признаков или фертильности будет происходить на протяжении многих поколений, поэтому производство семян должно осуществляться ежегодно, что требует много трудовых, материальных и земельных ресурсов. Кроме того, "трехлинейный метод" ограничен соотношением восстановления и поддержания, и коэффициент использования ресурсов зародышевой плазмы низок; "двухлинейный метод" подвержен влиянию естественной температуры и света, и репродуктивный выход стерильных линий нестабилен, а самооплодотворение стерильных линий, индуцированное при низкой температуре при получении гибридных семян, приводит к риску того, что чистота гибридных семян не достигнет стандарта.

Кроме того, в некоторой связанной с этим литературе сообщается, что использование гетерозиса и генов, связанных с репродукцией растений, например превращение мейоза риса в митоз (Cell Research (2016) 26:1242-1254), показывает, что апомиктические семена могут быть использованы для получения самовоспроизведения гибридов F1 для поддержания превосходных признаков, где гены CENH3, экспрессируемые в результате экзогенной модификации, введены посредством гибридизации. В US 2014/0298507 A1 раскрыта трансформация апомиктических гамет в клонированные зародыши или семена. В Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), Vol.29, No.2, 1992 раскрыто применение апомиксиса в селекции растений и в методах исследования клеточной эмбриологии.

#### Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение направлено на предложение способа использования гетерозиса растений так, чтобы гибриды могли производить клонированные семена или растения, и тем самым повышалась эффективность производства семян.

Для достижения вышеуказанной цели, согласно одному из аспектов настоящего изобретения, предложен способ использования гетерозиса растений. Способ включает следующие стадии: S1, трансформация мейоза половых клеток гибридов в подобие митоза для получения гамет, генотип и пloidность хро-

мосом которых совпадает с гибридами, с использованием технологии генной мутации или генной инженерии; и S2, оказание влияния и вовлечение в развитие гамет или зародышей растений с использованием технологии генной мутации и генной инженерии, в которую вовлечен белок MTL.

Кроме того, мутация гена включает случайный мутагенез и направленный мутагенез, где случайный мутагенез включает химический мутагенез, физический мутагенез и биологический мутагенез; направленный мутагенез включает технологию редактирования генов, технология редактирования генов включает метод редактирования генов с помощью системы CRISPR/Cas, метод редактирования генов с помощью системы CRISPR/Cpf1, метод редактирования генов с помощью системы TALEN, метод редактирования генов с помощью хоминг-эндонуклеазы и метод редактирования генов с помощью ZFN (нуклеазы "цинковые пальцы"); технология генной инженерии включает трансгенную технологию для индуцирования специфической экспрессии, эктопической экспрессии или сайленсинга генов.

Кроме того, S1 включает предоставление гибридных семян, трансформации мейоза половых клеток гибридов в подобие митоза для получения гамет, генотип и хромосомная ploидность которых соответствует гибридам с помощью технологии генной мутации или генной инженерии.

Кроме того, S1 включает редактирование родителя гибридных семян с использованием технологии генной мутации или генной инженерии с последующим получением гибрида посредством межродительской гибридизации, так чтобы получить гибридные гаметы, где мейоз половых клеток трансформирован в подобие митоза.

Кроме того, S1 включает редактирование белков, вовлеченных в мейоз растений, чтобы реализовать трансформацию мейоза половых клеток в подобие митоза с помощью технологии генной мутации или генной инженерии; где белки включают первый белок, второй белок и третий белок, среди них:

первый белок представляет собой белок, вовлеченный в образовании разрыва двухцепочечной ДНК, и первый белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

белка PAIR1, представленного в SEQ ID NO: 13, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PAIR1;

белка PAIR2, представленного в SEQ ID NO: 14, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR2, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PAIR2;

белка PAIR3, представленного в SEQ ID NO: 15, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR3, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PAIR3;

белок PRD1, представленный в SEQ ID NO: 16, белок, имеющий по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PRD1, или белок, имеющий по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PRD1;

белка PRD2, представленного в SEQ ID NO: 17, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PRD2, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PRD2;

белка SPO11-1, представленного в SEQ ID NO: 18, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SPO11-1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком SPO11-1;

белка SPO11-2, представленного в SEQ ID NO: 19, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SPO11-2, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком SPO11-2;

белка SDS, представленного в SEQ ID NO: 20, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SDS, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком SDS;

белка CRC1, представленного в SEQ ID NO: 21, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком CRC1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком CRC1;

белка P31<sup>comet</sup>, представленного в SEQ ID NO: 22, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком P31<sup>comet</sup>, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%,

75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком P31<sup>comet</sup>;

белка МТОРVІВ (мейотическая Торо VI В-субъединица), представленного в SEQ ID NO: 23, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком МТОРVІВ, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком МТОРVІВ;

белка DFO, представленного в SEQ ID NO: 24, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком DFO, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком DFO;

второй белок вовлечен в контроль адгезии между сестринскими хромосомам во время мейоза, и второй белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

белка REC8, представленного в SEQ ID NO: 25, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком REC8, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком REC8;

третий белок вовлечен во второе деление мейоза, и третий белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

белка OSD1, представленного в SEQ ID NO: 26, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком OSD1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком OSD1;

белка TAM, представленного в SEQ ID NO: 27, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком TAM, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком TAM;

белка TDM1, представленного в SEQ ID NO: 28, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком TDM1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком TDM1.

Кроме того, S2 включает воздействие и вовлечение в развитие гамет или зародышей в растениях, и индукцию развития гамет в семена или растения с помощью технологии генной мутации и генной инженерии.

Кроме того, S2 включает опыление индуцированной пыльцой других растений, чтобы индуцировать развитие гамет в семена или растения.

Кроме того, S2 включает индукцию развития гамет в семена или растения посредством физической стимуляции, биотического стресса или обработки химическим агентом.

Кроме того, S2 включает индукцию развития гамет в семена или растения через культуру пыльников или пыльцевую культуру.

Кроме того, белок MTL представляет собой белок MTL, представленный в SEQ ID NO: 29, белок, имеющий по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком MTL, или белок, имеющий по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком MTL.

Кроме того, растения включают однодольные и двудольные растения.

Кроме того, растения включают рис, кукурузу, сорго, просо, ячмень, пшеницу, рожь, овес, гречиху, семена бусенника, сахарный тростник, спаржу, молодые побеги бамбука, лук туберозный, ямс, соевые бобы, картофель, горох, золотистую фасоль, фасоль адзуки, боб садовый, спаржевую вигну (*vigna sequipedalis*), фасоль обыкновенную, чечевицу пищевую, калопогон мукуновыи, нут, маниоку, сладкий картофель, рапс, хлопок, свеклу, баклажаны, арахис, чай, мяту, кофе, кунжут, подсолнечник, клещевину обыкновенную, семена периллы, сафлор, помидоры, перец, огурцы, китайскую листовую капусту, салат-латук, шпинат, чеснок, капусту огородную, горчицу сарептскую, цицанию водную, лук-багун, восковую тыкву (*benincasa hispida*), цуккини, люфу, китайскую капусту, редьку, лук, арбуз, виноград, морковь, цветную капусту, тыкву, табак, травостой, перистошестинник пурпурный Schumacher, перистошестинник лисохвостный, суданское сорго, орхидеи, лилии, тюльпаны и люцерну.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения, предложено растение или семя, которое поддерживает гетерозис. Растение или семя получают любым из вышеуказанных способов.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения, предложен набор для поддержания гетерозиса у растений. Набор включает вектор и/или реагент, способный трансформировать мейоз половых клеток растений в подобие митоза, а также вектор и/или реагент для развития гамет в семена или растения.

Кроме того, вектор и/или реагент, способный трансформировать мейоз половых клеток растений в подобие митоза, является вектором и/или реагентом, используемым в технологии генной мутации или генной инженерии для трансформации мейоза половых клеток гибридов в подобие митоза, предпочтительно вектор и/или реагент является вектором и/или реагентом для случайного мутагенеза или направ-

ленного мутагенеза.

Кроме того, случайный мутагенез включает химический мутагенез, физический мутагенез и биологический мутагенез; направленный мутагенез включает метод редактирования генов с помощью системы CRISPR/Cas, метод редактирования генов с помощью системы CRISPR/Cpf1, метод редактирования генов с помощью системы TALEN, метод редактирования генов с помощью хоминг-эндонуклеазы и метод редактирования генов с помощью ZFN; технология геной инженерии включает трансгенный метод индуцирования специфической экспрессии, эктопической экспрессии или сайленсинга генов.

Кроме того, вектор и/или реагент, способный трансформировать мейоз половых клеток растений в подобие митоза, представляет собой вектор и/или реагент, используемый в технологии геной мутации или геной инженерии для редактирования белков, вовлеченных в мейоз растений для осуществления трансформации половых клеток в подобие митоза, где белки включают первый белок, второй белок и третий белок, и среди них:

первый белок представляет собой белок, вовлеченный в образование разрыва двухцепочечной ДНК, и первый белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

белка PAIR1, представленного в SEQ ID NO: 13, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PAIR1;

белка PAIR2, представленного в SEQ ID NO: 14, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR2, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PAIR2;

белка PAIR3, представленного в SEQ ID NO: 15, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR3, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PAIR3;

белка PRD1, представленного в SEQ ID NO: 16, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PRD1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PRD1;

белка PRD2, представленного в SEQ ID NO: 17, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PRD2, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PRD2;

белка SPO11-1, представленного в SEQ ID NO: 18, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SPO11-1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком SPO11-1;

белка SPO11-2, представленного в SEQ ID NO: 19, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SPO11-2, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком SPO11-2;

белка SDS, представленного в SEQ ID NO: 20, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SDS, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком SDS;

белка CRC1, представленного в SEQ ID NO: 21, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком CRC1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком CRC1;

белка P31<sup>comet</sup>, представленного в SEQ ID NO: 22, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком P31<sup>comet</sup>, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком P31<sup>comet</sup>;

белка MTOPVIB, представленного в SEQ ID NO: 23, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком MTOPVIB, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком MTOPVIB;

белка DFO, представленного в SEQ ID NO: 24, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком DFO, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком DFO;

второй белок вовлечен в контроль адгезии между сестринскими хромосомам во время мейоза, и второй белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

белка REC8, представленного в SEQ ID NO: 25, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком REC8, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком REC8;

третий белок вовлечен во второе деление мейоза, и третий белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

белка OSD1, представленного в SEQ ID NO: 26, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком OSD1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком OSD1;

белка TAM, представленного в SEQ ID NO: 27, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или

98% идентичность последовательности с белком TAM, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком TAM;

белка TDM1, представленного в SEQ ID NO: 28, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком TDM1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком TDM1.

Кроме того, вектор и/или реагент для развития гамет в семена или растения, среди прочего включает вектор и/или реагент для индукции развития гамет в семена или растения с использованием технологии генной мутации и генной инженерии для воздействия на белок MTL, вовлеченный в развитие гамет или зародышей у растений, и белок MTL представляет собой белок MTL, представленный в SEQ ID NO: 29, белок, имеющий по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком MTL, или белок, имеющий по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком MTL.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено растение, полученное путем использования вышеуказанного набора. Мейоз половых клеток растения трансформируется в подобие митоза, так что он может производить гаметы, генотип и хромосомная ploidy которых соответствует гибридам.

Кроме того, гаметы растения могут быть подвергнуты индукции для развития в растения или семена.

Кроме того, растение представляет собой генетический мутант или является растением, полученным посредством генетической инженерии, это растение используют в технологии генной мутации или генетической инженерии для регуляции белков, вовлеченных в мейоз растений, для осуществления трансформации мейоза половых клеток в подобие митоза; это растение используют в технологии генной мутации или генетической инженерии для влияния на четвертый белок, вовлеченный в развитие гамет или зародышей растений так, чтобы индуцировать развитие гамет в семена или растения; где белки включают первый белок, второй белок и третий белок, и где первый белок представляет собой белок, вовлеченный в образовании разрыва двухцепочечной ДНК, и первый белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

белка PAIR1, представленного в SEQ ID NO: 13, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PAIR1;

белка PAIR2, представленного в SEQ ID NO: 14, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR2, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PAIR2;

белка PAIR3, представленного в SEQ ID NO: 15, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR3, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PAIR3;

белка PRD1, представленного в SEQ ID NO: 16, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PRD1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PRD1;

белка PRD2, представленного в SEQ ID NO: 17, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PRD2, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,

85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PRD2;

белка SPO11-1, представленного в SEQ ID NO: 18, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SPO11-1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком SPO11-1;

белка SPO11-2, представленного в SEQ ID NO: 19, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SPO11-2, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком SPO11-2;

белка SDS, представленного в SEQ ID NO: 20, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SDS, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком SDS;

белка CRC1, представленного в SEQ ID NO: 21, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком CRC1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком CRC1;

белка P31<sup>comet</sup>, представленного в SEQ ID NO: 22, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком P31<sup>comet</sup>, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком P31<sup>comet</sup>;

белка MTOPVIB, представленного в SEQ ID NO: 23, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком MTOPVIB, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком MTOPVIB;

белка DFO, представленного в SEQ ID NO: 24, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком DFO, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком DFO;

второй белок вовлечен в контроль адгезии между сестринскими хромосомами во время мейоза, и второй белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из

белка REC8, представленного в SEQ ID NO: 25, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком REC8, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком REC8;

третий белок вовлечен во второе деление мейоза, и третий белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

белка OSD1, представленного в SEQ ID NO: 26, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком OSD1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком OSD1;

белка TAM, представленного в SEQ ID NO: 27, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком TAM, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком TAM; белка TDM1, представленного в SEQ ID NO: 28, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком TDM1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком TDM1;

белка TDM1, представленного в SEQ ID NO: 28, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком TDM1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком TDM1;

четвертый белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

белка MTL, представленного в SEQ ID NO: 29, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком MTL, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком MTL.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения, предложен способ поддержания гетерозиса растений. Способ включает следующие стадии: S1, трансформация мейоза половых клеток гибрида в подобие митоза в течение поколения F1 так, чтобы получить диплоидные женские гаметы поколения F1 с использованием метода редактирования генов; и S2, оказание воздействия и вовлечение в развитие га-

мет или зародышей растений, чтобы индуцировать развитие диплоидных женских гамет в семена с использованием технологии генной мутации и генетической инженерии, где подвергаемым воздействию белком является белок MTL.

Кроме того, S1 включает предоставление гибридных семян поколения F1, трансформацию мейоза зародышевых клеток гибрида в подобие митоза так, чтобы получить диплоидные женские гаметы поколения F1 с использованием метода редактирования генов.

Кроме того, S1 включает редактирование родителей гибридных семян с использованием метода редактирования генов с получением растений, имеющих отредактированные гены, все из которых являются гетерозиготными мутантами, и с последующим получением гибридных семян посредством межродительской гибридизации, скрининг гибридных семян, имеющих множество отредактированных генов, все из которых являются гомозиготными мутантами у обоих родителей, так чтобы получить диплоидные женские гаметы поколения F1, где мейоз половых клеток трансформирован в подобие митоза.

Кроме того, S1 включает нокаут генов REC8, OSD1 и PAIR1 для осуществления трансформации мейоза половых клеток в подобие митоза посредством использования метода редактирования генов.

Кроме того, S2 включает опыление диплоидных женских гамет пыльцой гаплоиндуктора для индуцирования развития диплоидных женских гамет в семена.

Кроме того, S2 включает нокаут генов MTL с получением пыльцы гаплоиндуктора с использованием метода редактирования генов.

Кроме того, S2 включает использование пыльцы гаплоиндуктора от других растений для индуцирования развития диплоидных женских гамет в семена.

Кроме того, одновременный нокаут генов REC8, OSD1, PAIR1 и MTL за время поколения F1.

Кроме того, растение включает рис, кукурузу, сорго, просо, ячмень и пшеницу.

При использовании технического решения настоящего изобретения, гибриды могут производить клонированные семена, генотипы и хромосомная ploидность которых полностью соответствует их собственным, так что гибриды можно использовать в течение длительного времени, и такие проблемы, как трудность межродительской гибридизации из-за несовпадающего цветения и т.д., низкая семенная продуктивность и высокая стоимость гибридов и т.д., могут быть решены при использовании гетерозиса.

#### **Краткое описание графических материалов**

Прилагаемые графические материалы, которые являются частью настоящей заявки, представлены для дополнительного понимания настоящего изобретения, иллюстративные воплощения настоящего изобретения и их описание предназначены для объяснения настоящего изобретения и не предназначены для его ограничения.

В графических материалах:

на фиг. 1А показано схематическое изображение способа трехлинейной гибридной селекции из предшествующего уровня техники;

на фиг. 1Б показано схематическое изображение способа двухлинейной гибридной селекции из предшествующего уровня техники;

на фиг. 2 и 3 показаны схематические изображения поддержания генотипа F1 поколения по настоящему изобретению;

на фиг. 4А показаны результаты теста ploидности клеток поколения F1 растения Chunyou 84 в примере 1;

на фиг. 4Б показаны результаты теста ploидности клеток растений с фиксированным гетерозисом в примере 1;

на фиг. 5 показаны результаты полного секвенирования генов мужского родителя C84, женского родителя 16A, гибрида Chunyou84 (CY84) растений с фиксированным генотипом и хромосомной ploидностью в примере 1.

#### **Подробное описание воплощений**

Следует отметить, что примеры, представленные в настоящей заявке, и признаки из примеров могут быть объединены друг с другом без противоречия. Ниже настоящее изобретение будет подробно описано со ссылкой на графические материалы и во взаимосвязи с примерами.

Терминология, используемая в настоящем раскрытии, объясняется следующим образом.

Гетерозис относится к явлению, когда первое поколение гибрида превосходит родителя с точки зрения размера тела, скорости роста, плодовитости и характеристик реакции на окружающую среду.

Мейоз относится к такому типу деления, когда зародышевая клетка делится, хромосома дублируется только один раз, а клетка делится дважды в непрерывном режиме. Это особый способ сокращения числа хромосом вдвое.

Митоз, также известный как непрямоe деление, обнаружен у растений исследователем E. Strasburger (1880). Он характеризуется появлением веретен и хромосом во время деления клетки, так что дочерние хромосомы, которые были реплицированы в фазе S, равномерно распределяются в дочерние клетки, такой способ деления обычно наблюдается у высших растений и животных (животные и высшие растения).

Pлоидность (число) хромосом относится к числу хромосом или геномов, содержащихся в клетке,



например гаплоидное окрашивание и полиплоидное окрашивание.

Диплоидные женские гаметы: гаметы относятся к генобlastам, продуцируемым репродуктивной системой во время полового размножения в организмах, называемым половыми клетками. Гаметы включают мужские гаметы и женские гаметы; как правило, когда половая клетка делится, хромосома дублируется только один раз, а клетка делится дважды непрерывно, и число хромосом уменьшается вдвое. Однако, если число хромосом не уменьшается вдвое при образовании женских гамет, но соответствует количеству в хромосомном наборе в соматической клетке этого вида, то это называется диплоидными женскими гаметами.

Гаплоид. Особь или клетка, у которой число в соматическом наборе хромосом равно числу в гаметическом наборе хромосом этого вида.

Партеногенез, также известный как аутогенез, относится к яйцеклеткам, которые могут развиваться в нормальные новые особи без оплодотворения.

В настоящем изобретении гибриды относятся к растениям или семенам, генотипы которых гетерозиготные и потомки их полового размножения будут генетически разделены.

В соответствии с типичным воплощением настоящего изобретения предложен способ использования гетерозиса растений. Способ включает следующие стадии: S1, трансформация мейоза половых клеток гибридов в подобие митоза с получением гамет, генотип и плоидность хромосом которых соответствует гибридам, с использованием технологии генных мутаций или генной инженерии; и S2, оказание влияния и вовлечение в развитие гамет или зародышей растений путем использования технологии генных мутаций и генной инженерии, где подвергаемым воздействию белком является белок MTL.

При этом генные мутации включают случайный мутагенез и направленный мутагенез; случайный мутагенез включает химический мутагенез, физический мутагенез и биологический мутагенез; направленный мутагенез включает метод редактирования генов, предпочтительно метод редактирования генов включает метод редактирования генов с помощью системы CRISPR/Cas, метод редактирования генов с помощью системы CRISPR/Cpf1, метод редактирования генов с помощью системы TALEN, метод редактирования генов с помощью самонаводящейся эндонуклеазы и метод редактирования генов с помощью ZFN; технология генной инженерии включает трансгенный способ для индуцирования специфической экспрессии, эктопической экспрессии или сайленсинга генов.

В частности, широко используемые методы физического мутагенеза включают излучение (ультрафиолетовое излучение, рентгеновское излучение, у-излучение, нейтронное излучение), лазерные микроручки, ионные лучи, микроволны, ультразвук, тепло и т.д. Обычно используемые методы химического мутагенеза включают иммерсионный метод, метод мазка, капельный метод, инъекционный метод, метод нанесения и метод фумигации. Химические мутагены включают: алкилирующий агент, аналог основания, хлорид лития, нитрозосоединение, азид, антибиотик, гидроксилламин, акридин, диэтилсульфат (DFS), 5-бромурацил (5-BU), азотистый иприт (Nm), N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (NTG) и т.д. Методы биологического мутагенеза включают мутагенез в космических условиях, мутагенез патогенными микроорганизмами, мутагенез тканевой культурой и трансгенный мутагенез.

Примером такого подхода может являться TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes), описанный McCallum et al., *Plant Physiology*, 2000, 123, 439-442). Направленный мутагенез осуществляется с использованием стандартных методов, которые известны в данной области техники и использует гомологичную рекомбинацию, предпочтительно в комбинации с нуклеазами, такими как TALEN или CRISPR.

Согласно типичному воплощению настоящего изобретения, способ включает следующие стадии: S1, трансформация мейоза половых клеток гибридов в подобие митоза с получением гамет, генотип и хромосомная плоидность которых соответствует гибридам, посредством использования технологии генных мутаций или генной инженерии; и S2, индукция развития гамет в семена или растения.

При применении технического решения по настоящему изобретению гибриды могут производить клонированные семена или растения, генотипы и хромосомная плоидность которых полностью соответствуют их собственным, так что эти гибриды можно использовать в течение длительного времени, и при использовании гетерозиса могут быть решены такие проблемы, как трудность межродительской гибридизации из-за несовпадающего цветения и т.д., низкая семенная продуктивность, высокая стоимость гибридов и т.д.

Согласно типичному воплощению настоящего изобретения, S1 включает предоставление гибридных семян, трансформацию мейоза половых клеток гибридов в подобие митоза с получением гамет, генотип и хромосомная плоидность которых соответствует гибридам, посредством использования технологии генных мутаций или генной инженерии. Например, конкретный процесс может быть таким: S1 включает предоставление семян гибридов поколения F1, трансформацию мейоза половых клеток в подобие митоза с получением диплоидных гамет поколения F1 с использованием технологии генной инженерии. Конкретный процесс может быть таким: предоставление семян гибридов поколения F1, редактирование ключевых генов, вовлеченных в мейоз, путем введения системы редактирования генов с получением растений поколения F1 с отредактированными генами, женские гаметы растений поколения F1 с отредактированными генами являются диплоидными гаметами, предпочтительно ключевые гены, вовле-

ченные в мейоз, представляют собой три гена REC8, OSD1 и PAIR1.

Согласно типичному воплощению настоящего изобретения, S1 включает редактирование родительских семян гибрида с использованием технологии генных мутаций или генной инженерии, с последующим получением гибридных семян посредством межродительской гибридизации, с получением гибридных гамет, где мейоз половых клеток трансформирован в подобие митоза. Например, конкретный процесс может быть таким: S1 включает редактирование родителей гибридных семян с использованием технологии генной инженерии с получением растений, имеющих ключевые гены, вовлеченные в мейоз, все из которых являются гетерозиготными мутантами, и затем получение гибридных семян посредством межродительской гибридизации, отбор гибридных семян, имеющих ключевые гены, вовлеченные в мейоз, все из которых являются гомозиготными мутантами, с получением диплоидных женских гамет поколения F1, где мейоз половых клеток трансформирован в подобие митоза. Конкретный процесс может быть таким: получение мужского родителя и женского родителя гибридных семян соответственно, редактирование вышеуказанных трех ключевых генов, вовлеченных в мейоз, путем введения системы редактирования генов, таким образом, с получением родительских растений, у которых все вышеуказанные три отредактированных гена находятся в гетерозиготном состоянии, с последующей гибридизацией двух родителей, причем полученные семена будут иметь разные генотипы, и выбор из них семян, у которых вышеупомянутые три гена являются гомозиготными мутациями. Такие растения являются семенами поколения F1, которые предполагается получить в настоящем изобретении, а женские гаметы семян поколения F1 являются диплоидными женскими гаметами.

Согласно типичному воплощению настоящего изобретения, S1 включает редактирование белков, вовлеченных в мейоз растений, для осуществления трансформации мейоза половых клеток в подобие митоза, посредством использования технологии генных мутаций или генной инженерии; где белки включают первый белок, второй белок и третий белок, среди них, первый белок представляет собой белок, вовлеченный в образовании разрыва двухцепочечной ДНК, и первый белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из

белка PAIR1, представленного в SEQ ID NO: 13

(MKLKMNKACDIASISVLPPRRTGGSSGASASGSVAVAVASQPRSQPLS

QSQQSFSQGSASALLHSQSQFSQVSLDDNLLTLLPSPTRDQRFGLHDDSSKRMSLPLAS

SASCAREESQLQLAKLPSNPVHRWNPSIADTRSGQVTNEDVERKFQHLASSVHKMG

MVVDVSQSDVMQLNRAMKEASLDGSGSIRQKIAVLESSLQQILKGDDDLKALFGSSTK

HNPDQTSVLNSLGSKLNEISSTLATLQTQMQRQLQGDQTTVLNSNASKSNEISSTLA

TLQTQMADIRQLRCDVFRVFTKEMEGVVRAIRSVNSRPAAMQMMADQSYQVPVS

NGWTQINQTPVAAGRSPMNRAPVAAGRSRMNQLPETKVLSAHLVYPAKVTDLKPKV

EQGKVKAAPQKPFASSYYRVAPKQEEVAIRKVNQVPAKKAPVSIIESDDDSEGRASC

VILKTETGSKEWKVTKQGTEEGLEILRRARKRRRREMQSIVLAS),

белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PAIR1;

белка PAIR2, представленного в SEQ ID NO: 14

(MVMAQKTKEAEITEQDSLLLTRNLLRIAIFYNISYIRGLFPEK

YFNDKSVPALEMKIKLMPMDTESRRLIDWMEKGVYDALQKKYLKTLFCICEKEE

GPMIEEYAFSFSYPNTSGDEVAMNLSRTGSKKNSATFKSNAAEVTDPQMRSSACKMIR

TLVSLMRTLQDQMPPEERTILMKLLYDDVTPEDYEPFFKCCADNEAINIWNKNPLKM

EVGNVNSKHLVLALKVKSVDPCDDNNVNSEDDNMSLDNESDQDNDFSDTEVRPSE

AERYIVAPNDGTCKGQNGTISEDDTQDPVHEEELTAQVREWICSRDTESEVSDVLVN

FPDISMEMVEDIMERLLKDGLLSRAKKDSYSVNKIADPTTPHIKKEVIMQNVSPTEGT

KNSNGDLMYMKALYHALPMDYVSVGKLGKLDGEASQNMVRKLIKEMVQDGYVK

NSANRRLGKAVIHSEVTNRKLLLEIKKILEVDIAEQMAIDTNAEPGEPEKDHLSGHEM

RDGSTMGCCLQSVGSDLTRTRELPEPQQNVSMQSGQEASTVDKDPSTPTSVREASVC

SLESGVLGQKVRKSLAGAGGTQCSQDKRFRKASTVKEPILQYVKRQKSQVQVQVQ),

белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR2, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последователь-

ности с белком PAIR2; белка PAIR3, представленного в SEQ ID NO: 15

(MEVELTNIQKATSSDYWSLASNQYPCGKFPK VSVGVTIPRTSSVSR

GRDAASTAAFEKNLSQGTDGRSRPPKMDNASLQVSPEAANHGGSAKEVPKPVPAKV  
SVSQPDDNAIEQTGTFSFGTRREQDSDLQDRPPLVSSQGKRQVESADKNKPNSEM  
LRMKLWEILGGTSQNKEAVASPNEDIETPCQPKSQIANGPSSGRQKVFTSPVPYNIKT  
PAQFNSQTANKPSSDPIESDSDSPQVVEVRPITRSLGRKKEPTGSTHQDKSGSAKKPLS  
THRSTPKQKILDNVFAFNDKCTPKTVGKSANGESGLRNLRSLRRRAKVEPKKAHCS  
DRISHKTTQDDMERK VPSKYIPSEKKGEK TNSFSSLRTGKTAESC SRSPKRERRVNT  
MANVGARKMQLSENLLVKTLDNGEHLSSPQLTSFKSKGKCSSISPQKENDNTHIPE  
ASDRTAARNSFNSTPSAANPSPVLRKYWEHDENPAINGKSGQKDA SPLADRFSDMP  
DDFASPTFAANIKISPHRSKMLDDDLFSSKYPKGVNRSRSTSTSDPESEPLDKMEKTN  
ELPGSESPNSQEERQNRKQPHLSPLSPIESEGAQISIPFRKGYKSHKWLSVDSPDKSS  
IEHLGRKSHLKEGRKGRQLTSPTHFATSGTQETMSDKEPEKVPENYLTRAFDQLVVV  
LGRFQTKIKSETRNKSSKILAAATGEIIRQHLEGVEGQMADVDKLVNAGKSKRKRLES  
TFEEQKEKLRILHEKFKEEVNQQLLGCKNSVEDFEAYHAELKGVADKQKASHKLLQ  
NAEKTVGAQLSDAETKIAEVQKRARKRMKGLKFLKELIAETAE),

белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR3, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PAIR3;

белка PRD1, представленного в SEQ ID NO: 16

(MEMVLIMSFRVLLYHRLTAQTGPFKLHCLGILLNSTKDAATYIGDKQ

SLYLNLVNLRPLPSDEIRGEILFVLYKLSLLNATPWDDICDNDNVDLAIGRSLLQFSLE  
VLLKTQNDVRLNCIALLLTLAKKGAFDILLSDPSLINSAAEDNVPLNDSLVLFAE  
AVKGSLLSTNIEVQTGTLELIFHFLSSDANIFVLKTLIDQNVADYVFEVLRSLGMRNHL  
LQSSNASQFLTLLYVSGNNDPLVISSIKVLSILANSEERFKEKLAIAVSTLLPVLHYVS  
EIPFHPVQSQVLRRLVCISIINCSGILSLSQEEQIACTLSAILRRHNGGELGMSSETFALVCS  
MLVEILKLPSSADDIQLPSFIVEASKHAISLTSHEYDCLFLIPHSLLLLKEALIFCLEGN  
KDQILRKKSLIEDSIETCETYLLPWLESAIVDGNDEETLSGILQIFQILSRASDNKSFKF  
AEMLASSWFSLSFSGFMGLFPTDHVKSAYVYLVISSIVDKVLGISYGETIRDACIYLPDP  
AELLYLLGQCSEDFNLASCQACILVILYVCSFYNERLAADNQILASVEQYILLNGAKF  
PHEIPGSLMLTLLVHLYAFVRGISFRFGIPHSPEAEKTLFHAMTHKEWDLIRVHLIAL  
KWLFQNEELMEPLSFHLLNFCKFFCEDRTVMLSSSTQLVDIQLIAELVYSGETCISLLV  
SLLSQMIKESADEVLSVVNVITEILVSFPCTSDQFVSCGIVDALGSIYLSLCSRIKSVCS  
SLLIFNILHSASAMTFTCDDDAWLALTMKLLDCFNSSLAYTSSEQEWKILIGILCLILNH  
SANKVLEPAKAIILNNCLALLMDGIVQEACAKGPSLFQHNQETTFGELLMLLLIFFS  
VRSLQAILEASIDWQEFLQYSDDTESSSVL GIPCHDL CRLMHFGPSPVKLIASQCLEL  
LNRISDQRSCNAELRCSAKYLKSMIAVTEGMVFDQDSRVAENCGACTVILGWERF  
GSREKAVIRESKWSRLILEEFAVALTAPGLTSKFSFNQKIAANIALSLLQSQVPDWLT  
SLFSDSLISGIVANLSARNVTAEIVTLFSELMAKNYLNQEHIAGLHNLVQVCRQAYEG  
GGGSKAQPEQKAAAARCADDVRALLFGMMLEQRACSRATVEMEQRLLREIDSFF  
FQESSLREQNSVK),

белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PRD1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PRD1;

белка PRD2, представленного в SEQ ID NO: 17

(MAPPASRPPTPTPTANAAASSSRIESPSLRAALAMALIHYNRLP

SRAAAAAASPQALLNWKRKAKDRKREILRLREELKLLQDGARGEEMEPVASCRC  
 HFFDGCGLPPTDGDAGEHWVDDVLRRRFVRLVRWKDKRRRLDRSLPTSSLMEYN  
 TEDEVQQLSLDFLVELSDGLFAKREAGSSFTTFHQAVDFILASLKNILSSEREKEIE  
 EIINGLVARLMKRMCTTPENAGSVDCSDAQFSLQHLFRKLGNEEFVQQRILAISQKIS  
 NVSEKLLLADPFDDGFPEMHSNMFIMIQLIEFLISDSFNNWLCRDHFDRKLFEEWVRSI  
 LKARKDLEVLDRNGLYVVYIERVIGRLAREVAPAAHQGKLDLEVLKLLY),

белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PRD2, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PRD2; белка SPO11-1, представленного в SEQ ID NO: 18

(MAGREKRRRVAALDGEERRRQEEAATLLHRIRGLVRWV

VAEVAAGRSPTVALHRYQNYCSSASAAAASPCACSYDVPVGTVDVLSLLHRGSHASRL  
 NVLLRVLLVVQQLLQKNKHCSCRDIYYMYSIFQEQAVVDRAINICVLFKCSRHNL  
 NVVPVAKGLVMGWIRFLEGEKEVYCVTNVNAAFSIPVSIEAIKDVVSVADYILIVEKE  
 TVFQRLANDKFCERNRCIVITGRGYDIPTRRFLRYLVEQLHLPVYCLVDADPYGFDIL  
 ATYKFGSLQLAYDANFLRVPDIRWLGVFTSDFEDYRLPDCCLLHLSSEDRRKAEGILS  
 RCYLHREAPQWRLELEAMLQKGVKFEIEALSACSISFLSEEYIPKKIKQGRHI),

белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SPO11-1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком SPO11-1; белка SPO11-2, представленного в SEQ ID NO: 19

(MAEAGVAAASLFGADRRLCSADILPPAEVRARIEVAVLNFLAALTD

PAAPAISALPLISRGAAANRGLRRALLRDDVSSVYLSYASCKRSLTRANDAKAFVRVWK  
 VMEMCYKILGEGKLVTLRELFYTLSESPTYFTCQRHVNQTVQDVVSLLRCTRQSLGI  
 MASSRGALIGRLVVQGPEEHNDCSILGPSGHAITGDLNVLSKLISSDARYIIVVEKD  
 AIFQRLAEDRIYSHLPCILITAKGYPDLATRFILHRLSQTYPNMPIFALVDWNPAGLAIL  
 CTYKYGSISMGLSYRYACNVKWLGLRGDDLQLIPQSAYQELKPRDLQIAKSLSSKF  
 LQDKHRAELTLMLETGKRAEIEALYSHGFDFLGKYVARKIVQGDYI),

белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SPO11-2, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком SPO11-2; белка SDS, представленного в SEQ ID NO: 20

(MPPTMLASVPTPRSHPFRRRRGAAAAAPLLPDQIAAAAAAAAKRP

AESSTSASSCFHSEVISATSTTCPTSLAAAQRPEKRPRYQDVDEEQPAASECSEPIGGAR  
 PRAAEVEVSESSCLASVLESYLACPEQLANDAETTAYSSAREDLTSETEEEEEEVEVR  
 SGPCICTDCSFSPLHESSSSDDDNAVPSPTFSLFLALAEQFVPFTHPKTPTATDVALQA  
 GEGKRFEDLDNEVSYERFRRRERRGVVARDYIEVYSSMLGSYGRAVVEQRVVMVNW  
 IMEHSQAMKLQPETVFMGIGLMDRFLTRGYVKGSRNLQLLGIACITLATRIEENQYPYN  
 CILQKAFKVGINTYSRSEVVAMEWLQEVLDVDFQCFVTTTHHFLWFYKAAANADDRVE  
 DLAKYLALLSLLDHKHLSFWPSTVAAAVVALACLATNNESSCHLVMETHMRTKNDD  
 LPECLMSLEWLTNYAS),

белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SDS, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком SDS;

белка CRC1, представленного в SEQ ID NO: 21

(MSAPMEVSFSAPPPDAASAAAAAPSLVPAVSAAVAATTVSCS  
 PQPPTGSPSADDRILVSVEVLLHATSTARAEVCAAVERMLEARSLSYVDGPVPIPNP  
 DPFLLANVKRIQICDTDEWTENHKVLLFWQVRPVVHVFLQSEDGPGEEPGEEDTLSS  
 FNEWALPAKEFDGLWESLLYEVGLKQRLRYAASALLFTEKGVDPCLVSWNRIVLLH  
 GPPGTGKTSLCKALAQKLSIRFKSRYSMCQLIEVNAHSLFSKWFSESGKLVAKLFQKIQ  
 EMVEEESNLVFLVIDEVESLAAARQAASGSEPSDSIRVVNALLTQMDKLSWPNVIL  
 TTSNITTAIDIAFVDRADIKAYVGPPTLQARYEILRSCLQELLRVGILTHTQGGSNLCCL  
 SYFSLMENQHCPEVADPHGSVHLSGLLHKA AEICEGLSGRTLRLKLPFLAHASVANPSC  
 CDASAFHLALIQTARELSESRG),

белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком CRC1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком CRC1;

белка P31<sup>comet</sup>, представленного в SEQ ID NO: 22

(MERATTSGGGGGGSPPRGVGLPLVEVQAAAASLRSEVFYVVK  
 LLGFVLYMHHQIPAVLQNLNEFASLKEEMTEMALPPGEMKPSDQRKYNTRKREVR  
 RIKKQEKLMNGLSSVFSALQKALDEVPSIEGVLLILGGSLVRPLFVYDITISHGRFDAG  
 SANERGASKLAQSVSRKAIRALISSGAGSLSYTGPTKLFVLRCPCTLNPLDFLPKR  
 FRYSKKVVPLQMCIKCNIAGIQIDNQITSIVDASRCTSESTISEVIWFQCKHTIRGLPC  
 KASLEE),

белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком P31<sup>comet</sup>, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком P31<sup>comet</sup>; белка MTOPVIB, представленного в SEQ ID NO: 23

(MASSPPPSTASPTSSSPYRKLHSLIYWAVQRCRMSSEPCRLTVSVKR  
 SPEPAGSSPLRISVSDTGVGSKLEEFLELDALARETPVEKWDGTLITTTGIDDKAIYRY  
 QFNLQEDTSSSTRFTKLATMYKSRAIFSGTEVCLCLPTEADVDDLILWLWVGFVRKIFVL  
 RASNLACELFVAQTDSAGSGDVCLSQSDDVHISITSSIDRLVSGLKDYALSHANTSD  
 RCEACYMNRDRLKIGTGTAKYVDKRKAKGQLVEVVIMIAPTSSDLSCWMTNCSSTQ  
 VLHFVEFIPCPISQSSLSALMSIDWQSYGFKFKGGFIDDDGNAELQWDNMAFSHVDIA  
 IHTYHEGAVDEWKSSQPERHLLRKALKSALFGLKADHAEDFLSCHGQKVREYVPDL  
 AESIAGLILSSNDQEFQDECIALGLGSDQDLTEGAVRSCIGEKMNRIEMNDTKENVE  
 HNAPYLFECERFDEDYSLLEDDDPDEDMIFDF),

белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком MTOPVIB, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком MTOPVIB;

белка DFO, представленного в SEQ ID NO: 24

(MRHNIKFKSKGTLKIRNTAQISLWKKCSDSMIADQTYLFINRVQDRR  
 FDEESLRILELSLVAMNVKSFLEVRSRLRDFMRSESVVIFGELTGESMVAKLSVLEFFA  
 RAFALLGDMESCLAMRYEALNLRQLKSPSCLWLGVSHSEWTKFAVQSMENGFPSIAG  
 KASENALLSLKKDSLIEPKSEDNSDILDAAEKVRRLRDSAASLTSSHSGIFIIYVSSLKFA  
 VCNRLTTF),

белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком DFO, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком DFO;

второй белок вовлечен в контроль адгезии между сестринскими хромосомами во время мейоза, и второй белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

белка REC8, представленного в SEQ ID NO: 25

(MFYSHQLLARKAPLGQIWMAATLHASKINRKRDLKLDIIKICEEILN

PSVPMALRLSGILMGGVAIVYERKVKALYDDVSRFLIEINEAWRVKPVADPTVLPKGGK  
TQAKYEAVTLPENIMDMMDVEQPMLFSEADTTRFRGMRLEDLDDQYINVNLDLDDDFS

RAENHHQADAENITLADNFGSGLGETDVFNRFERFDITDDDATFNVTDPGHPQVPSNL

VPSPPRQEDSPQQENHHAASSPLHEEAQQGGASVKNQEQQKMKGQQPAKSSKRK

KRRKDDEVMMMDNDQIMIPGNVYQTWLKDPSLITKRHRINSKVNLRISIKIRDLMDLP

LVSLISSLEKSPLEFYYPKELMQLWKECTEVKSPKAPSSGGQQSSSPEQQQRNLPPQAF

PTQPQVDNDREMGFHPVDFADDIEKLRGNTSGEYGRDYDAFHS DHSVTPGSPGLSRR

SASSSGGSGRGFTQLDPEVQLPSGRSKRQHSSGKSGFNLDPVVEEFPFEQELRDFKMR

RLSDVGPPTDLLEEIEPTQTPYEKKNPIDQVTQSIHSYLKLFHDTPGASQSESLSQLAH

GMTTAKAARLFYQACVLATHDFIKVNQLEPYGDILISRGPKM),

белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком REC8, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком REC8;

третий белок вовлечен во второе деление мейоза, и третий белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

белка OSD1, представленного в SEQ ID NO: 26

(MPEVRNSGGRAALADPSGGGFFIRRTTSPPGAVAVKPLARRA

LPPTSNKENVPPSWAVTVRATPKRRSPLPEWYPRSPLRDITSVVKAVERKSRLGNAAV

RQQIQLSESSRSVDPATPVQKEEGVPQSTPTPTQKALDAAAPCPGSTQAVASTSTAY

LAEGPKKASSSPDCSFQTPSRPNPALADLMEKELSSSIEQIEKMVRKNLKRAPKA

AQPSKVTIQKRTLLSMR),

белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком OSD1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком OSD1;

белка TAM, представленного в SEQ ID NO: 27

(MSSSSRNLSQENPIPRPNLAKTRTSLRDVGNRRAPLGDITNQKN

GSRNPSPSSTLVNCSNKIGQSKKAPKALSRNWNLGLDGLPPKPNKSNIIVPYEDT

ELLQSDSLLCSPALS LDASPTQSDPSISTHDSLTHVVDYMVESTTDDGNDLDDDEI

VNIDSDLMDPQLCASFACDIYEHLRVSEVNKR PALDYMERTQSSINASMRSILIDWLVE

VAEEYRLSPETLYLAVNYVDRYLTGNAINKQNLQLLGVTCMMIAAKYEEVCVPQVED

FCYITDNTYL RNELLEMESSVLNYLKFELTPTAKCFLRRFLRAAQGRKEVPSLLSECL

ACYLTEL SLLDYAMLRYP SLVAASAVFLAQYTLHPSRKPWNATLEHYTSYRAKHME

ACVKNLLQLCNEKLS SDVVAIRKKYSQH KYKFAAKKLCPTSLPQELFL),

белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком TAM, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком TAM; белка TDM1, представленного в SEQ ID NO: 28

(MCPCVERRAPPGVYYT PPPARTSDHVAAMPMTERRRPPYSCSSSE

RRDPFHIVHKVPSGDS PYVRAKHAQLIDKDPNRAISLFWTAINAGDRVDSALKDMAV

VMKQLGRSDEGIEAIK SFRYLCSFESQDSIDNLLLELYKKS GRIEEEEAVLLEHKLQTL

QGMFGGRVSRARVQGKHVIMTIEQEKARILGNL GWVHLQLHNYGIAEQHYRFGF

VTKIPNIDYCLVMRALGLERDKNKL CNLAICLMRMSRIPEAKSLDDVRDSPAESECG

DEPFAKSYDRAVEMLA EIESKKPEADLSEKFYAGCSFVNRMKENIAPGTANKNYS DV

SSPASVRPNSAGLYTQPRRCRLFEEETRGAARKLLFGKPPFGSEQMKILERGE EEP

KRKKLDQNM IQYLHEFVKDTADGPKSES KSWADIAEEEEAE EEEEEERLQGELKTAE M),

белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком TDM1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком TDM1.

Среди них белок PAIR1 участвует в инициации мейотической рекомбинации и катализирует образование двухцепочечных разрывов ДНК. Делеция гена PAIR1 приводит к потере процесса рекомбинации; белок REC8 отвечает за тесное сцепление вновь удвоенных сестринских хромосом и является ключевым регуляторным фактором, который гарантирует, что сестринские (или гомологичные) хромосомы будут правильно разделены и направлены в дочерние клетки. Потеря его функции приводит к тому, что сестринские хроматиды разделяются в конце первого мейотического деления и двигаются к двум полюсам; потеря функции гена OSD1 приводит к тому, что в образовании гамет будет полностью пропущен второй процесс мейотического деления.

Нокаут вышеупомянутого гена является простым и эффективным методом трансформации мейоза половых клеток в подобие митоза.

Супрессия белка в настоящем раскрытии относится к мутагенезу гена, кодирующего белок или его промотор, и к выбору частичной или полной потери активности белка, включая получение супрессии родственных белков посредством экспрессии сайленсинг-РНК в растениях.

Согласно типичному воплощению настоящего изобретения, S2 включает влияние и вовлечение в развитие гамет или зародышей растений, а также индукцию развития гамет в семена или растения с использованием технологии генной мутации и генной инженерии. Кроме того, S2 может включать опыление индуцированной пыльцой других растений, чтобы индуцировать развитие гамет в семена или растения. Например, S2 включает опыление диплоидной женской гаметы пыльцой гаплоиндуктора для индукции развития диплоидных женских гамет в семена; в качестве другого примера, S2 включает индукцию развития гамет в семена или растения посредством физической стимуляции, биотического стресса или обработки химическим агентом; в качестве другого примера, S2 включает индукцию развития гамет в семена или растения посредством культуры пыльников или культуры пыльцы.

Предпочтительно, белок MTL представляет собой MTL, представленный в SEQ ID NO: 29

```
(MAASYSCRRTCEACSTRAMAGCVVGPASAPGQRVTLLAIDGGGIRGLIPGTILAFLE
ARLQELDGPDARLADYFDICIAGTSTGGLITAMLAAPGDHGRPLFAASDINRFYLDNPG
LIFPQKRCGMAAAMAALTRPRYNGKYLGKIRKMLGETRVRDTLTVVPTFDVRL
QPTIFSTYDAKSMPLKNALLSDICISTSAAPTYLPAHCFQTTDDATGKVREFDLIDGGV
AANNPTMVAMTQITKIMVKDKKEELYPVKPSDCGKFLVLSVGTGSTSDQGMYTARQ
CSRWGIVRWLRNKGMAPIIDIFMAASSDLVDIHAAVMFQSLHSDGDYLRIQDNTLHG
DAATVDAATRDNMRALVGIGERMLAQRVSRVNVETGRYVEVPGAGSNADALRGFAR
QLSEERRARLGRNACGGGGEGEPSGVACKR),
```

белок, имеющий по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком MTL, или белок, имеющий по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком MTL. При этом индуцирующая пыльца может иметь происхождение от растений, продуцирующих гаметы, генотип и плоидность которых соответствует гибриду, а также может иметь происхождение от других растений. Предпочтительно, индуцирующая пыльца происходит от растений, которые производят женские гаметы, генотип и плоидность которых соответствуют гибриду, и получается путем одновременной инактивации генов REC8, OSD1, PAIR1 и MTL в гибриде.

Согласно типичному воплощению настоящего изобретения, растения включают однодольные и двудольные растения; предпочтительно, растения включают рис, кукурузу, сорго, просо, ячмень, пшеницу, рожь, овес, гречиху, семена бусенника, сахарный тростник, спаржу, побеги бамбука, лук туберозный, ямс, соевые бобы, картофель, горох, золотистую фасоль, фасоль адзуки, боб садовый, спаржевую вигну (*vigna sequipedalis*), фасоль обыкновенную, чечевицу пищевую, калопогон мукуновы, нут, маниоку, сладкий картофель, рапс, хлопок, свеклу, баклажаны, арахис, чай, мяту, кофе, кунжут, подсолнечник, клещевину обыкновенную, семена периллы, сафлор, помидоры, перец, огурцы, китайскую листовую капусту, салат-латук, шпинат, чеснок, капусту огородную, горчицу сарептскую, цацинию водную, лук-батун, восковую тыкву (*benincasa hispida*), цуккини, люфу, китайскую капусту, редьку, лук, арбуз, виноград, морковь, цветную капусту, тыкву, табак, травостой, перистошестинник пурпурный Schumacher, перистошестинник лисохвостный, суданское сорго, орхидеи, лилии, тюльпаны и люцерну.

Принцип использования настоящей заявки заключается в следующем.

Принцип апомиксиса в настоящей заявке заключается в непосредственном формировании зародышей и получении семян, минуя процесс мейоза и оплодотворения, который в основном делится на две основные стадии.

Первая стадия: мейоз представляет собой особый процесс деления клеток, который происходит в период размножения животных и растений. Во время мейоза генетическая информация от родителей рекомбинируется с получением гамет с уменьшенным вдвое числом хромосом.

После того, как гены, вовлеченные в три разных важных стадии мейоза растений, одновременно мутируют (этот тримутантный материал называется MiMe, митоз вместо мейоза), мейоз растений трансформируется в процесс, подобный митозу.

Количество хромосом и генотипов в женских и мужских клетках-гаметах, продуцируемых MiMe растениями, точно такое же, как в соматических клетках. Все их самовоспроизводимые потомки представляют собой по генотипу гетерозиготные тетраплоиды, это доказывает, что посредством мутации одновременно трех генов, гибридные растения могут обойти процесс мейоза с получением клонированных гамет, генотип которых соответствует соматическим клеткам.

Стадия 2: пыльце-специфический ген фосфолипазы (MATRILINEAL, MTL) в основном действует на мужские гаметы растений. Это ген, который контролирует индукцию гаплоидов. Он был впервые клонирован в кукурузе. Вещество гаплоиндуктора *mtl* может быть получено посредством нокаута гена MTL. В процессе двойного оплодотворения геном мужской гаметы *mtl* в зиготе разрушается, то есть ядро отцовской половой клетки не образует зиготу с рецепторным ядром яйцеклетки, что индуцирует у гаплоидного ядра яйцеклетки завязывание семян.

Поэтому, одновременно модифицируя четыре эндогенных гена MiMe и MTL у растений, получают материал Fix (фиксация гибридов), который может подвергаться апомиксису, то есть, минуя процесс мейоза и оплодотворения для сохранения материнского генома, получают растение, клеточная плоидность которого является диплоидной и генотип которого точно такой же, как у родителя. Это доказывает, что, модифицируя одновременно четыре эндогенных гена, можно ввести характеристики апомиксиса в гибридные растения с достижением фиксации гетерозиготных генотипов.

Согласно типичному воплощению настоящего изобретения, оно включает следующие этапы: 1) трансформацию мейоза при формировании гамет в подобие митоза. Исследование показало, что, когда три гена REC8, OSD1 и PAIR1, вовлеченные в стадию мейоза, одновременно нокаутированы (этот материал называется MiMe, митоз вместо мейоза), хромосома дублируется только один раз, и половая клетка делится один раз вместо того, чтобы делиться дважды в первоначальном виде, в полученных гаметах число хромосом не уменьшается вдвое и соответствует соматическим клеткам. То есть превращение мейоза в подобие митоза с достижением цели - удвоения хромосом; 2) полученные женские гаметы стимулируют пыльцой, которая может индуцировать развитие женских гамет, то есть женские гаметы могут развиваться в зародыши без слияния с хромосомами сперматозоидов, образуя семена, имеющие точно такие же генотипы, как и соматические клетки. При нокауте гена MTL можно получить пыльцу, которая индуцирует получение гаплоида. Использование гибридных семян в качестве трансгенного фона, одновременный нокаут четырех генов REC8, OSD1, PAIR1 и MTL посредством использования технологии генных мутаций или геномной инженерии. Женские гаметы, производимые этим растением, имеют такую же хромосомную плоидность, что и соматические клетки, и, в результате разрушения гена MTL, производимая пыльца может индуцировать развитие женских гамет в семена или растения, так что полученные семена или растения не претерпевают изоляцию генов (разделению признаков или плодовитости), и генотипы являются точно такими же, как у материнских клеток (гибриды исходного материала, использованные для трансгеноза), и наконец достигают цели фиксированного гетерозиса.

На фиг. 2 и 3 ясно показано, что генотип и хромосомная плоидность дочернего поколения F1 по настоящему изобретению соответствует гибридным материнским клеткам.

Согласно типичному воплощению предложено растение или семя, которое поддерживает гетерозис. Растение или семя получают любым из вышеуказанных способов, при этом семя может хорошо зафиксировать гетерозис.

Согласно типичному воплощению предложен набор для поддержания гетерозиса у растений. Набор включает вектор и/или реагент, способный трансформировать мейоз половых клеток растений в подобие митоза, а также вектор и/или реагент для развития гамет в семена или растения. Предпочтительно, вектор и/или реагент, способный трансформировать мейоз половых клеток растений в подобие митоза, и вектор и/или реагент для индуцирования партеногенеза гамет растений являются вектором и/или реагентом для случайного мутагенеза или направленного мутагенеза. При этом случайный мутагенез включает химический мутагенез, физический мутагенез и биологический мутагенез; направленный мутагенез включает метод редактирования генов с помощью системы CRISPR/Cas, метод редактирования генов с помощью системы CRISPR/Cpf1, метод редактирования генов с помощью системы TALEN, метод редактирования генов с помощью хоминг-эндонуклеазы и метод редактирования генов с помощью ZFN; технология геномной инженерии включает трансгенный способ индуцирования специфической экспрессии, эктопической экспрессии или сайленсинга генов.

Согласно типичному воплощению, вектор и/или реагент, способный трансформировать мейоз половых клеток растений в подобие митоза, представляет собой вектор и/или реагент, используемый в гено-инженерных методах для супрессии белков, участвующих в мейотической рекомбинации у растений, для осуществления трансформации мейоза половых клеток в подобие митоза, где белки включают пер-





85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком OSD1;

белка TAM, представленного в SEQ ID NO: 27, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком TAM, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком TAM;

белка TDM1, представленного в SEQ ID NO: 28, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком TDM1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком TDM1.

Кроме того, вектор и/или реагент для развития гамет в семена или растения, среди них включает вектор и/или реагент для индуцирования развития гамет в семена или растения с использованием генных мутаций и технологии генной инженерии для воздействия на белок MTL, участвующий в развитии гамет или зародышей в растениях, белок MTL представляет собой белок MTL, представленный в SEQ ID NO: 29, белок, имеющий по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком MTL, или белок, имеющий по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком MTL.

Для удобства продажи и применения набор, предпочтительно, содержит вектор и/или реагент для одновременного нокаута генов REC8, OSD1, PAIR1 и MTL в гибридах.

В соответствии с типичным воплощением предложено растение. Мейоз половых клеток этого растения трансформирован в подобие митоза, так что он может производить гаметы, генотип и хромосомная ploидность которых соответствует гибридам; например, мейоз половых клеток растения трансформирован в подобие митоза, так что он может производить гаметы, хромосомная ploидность и генотип которых соответствует гибридам. Предпочтительно, растения могут индуцировать развитие гамет в растения или семена.

В соответствии с типичным воплощением, растение представляет собой генетически мутантное или генно-инженерное растение, белки, участвующие в мейозе растений, регулируют, чтобы осуществить трансформации мейоза половых клеток в подобие митоза с помощью технологии генной мутации или генной инженерии; белок MTL, участвующий в развитии гамет у растений, подвергается влиянию технологии генных мутаций или генной инженерии, чтобы индуцировать развитие гамет в семена или растения; при этом белки включают первый белок, второй белок и третий белок, из которых первый белок представляет собой белок, вовлеченный в образовании разрыва двухцепочечной ДНК, первый белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

белка PAIR1, представленного в SEQ ID NO: 13, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PAIR1;

белка PAIR2, представленного в SEQ ID NO: 14, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR2, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PAIR2;

белка PAIR3, представленного в SEQ ID NO: 15, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR3, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PAIR3;

белка PRD1, представленного в SEQ ID NO: 16, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PRD1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PRD1;

белка PRD2, представленного в SEQ ID NO: 17, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PRD2, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком PRD2;

белка SPO11-1, представленного в SEQ ID NO: 18, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SPO11-1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком SPO11-1;

белка SPO11-2, представленного в SEQ ID NO: 19, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SPO11-2, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком SPO11-2;

белка SDS, представленного в SEQ ID NO: 20, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%,

45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SDS, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком SDS;

белка CRC1, представленного в SEQ ID NO: 21, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком CRC1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком CRC1;

белка P31<sup>comet</sup>, представленного в SEQ ID NO: 22, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком P31<sup>comet</sup>, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком P31<sup>comet</sup>;

белка MTOPVIB, представленного в SEQ ID NO: 23, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком MTOPVIB, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком MTOPVIB;

белка DFO, представленного в SEQ ID NO: 24, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком DFO, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком DFO;

второй белок вовлечен в контроль адгезии между сестринскими хромосомами во время мейоза, и второй белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

белка REC8, представленного в SEQ ID NO: 25, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком REC8, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком REC8;

третий белок вовлечен во второе деление мейоза, и третий белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

белка OSD1, представленного в SEQ ID NO: 26, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком OSD1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком OSD1;

белка TAM, представленного в SEQ ID NO: 27, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком TAM, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком TAM; белка TDM1, представленного в SEQ ID NO: 28, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком TDM1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком TDM1;

белка TDM1, представленного в SEQ ID NO: 28, белка, имеющего по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком TDM1, или белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком TDM1;

белок MTL представляет собой MTL, представленный в SEQ ID NO: 29, белок, имеющий по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком MTL, или белок, имеющий по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% подобие последовательности с белком MTL.

Полезные результаты настоящего изобретения будут дополнительно проиллюстрированы в сочетании с приведенными ниже примерами. Стадии или реагенты, которые не описаны подробно в следующих примерах, могут быть выполнены с помощью обычных технических средств или обычных реагентов в данной области техники.

#### Пример 1.

1. В этом примере использованный гибрид F1 представляет собой одобренный имеющийся в продаже гибридный культивар риса Chunyou84. Chunyou84 представляет собой новую межподвидовую гибридную рисовую комбинацию japonica-non-indica-restorer (японика-пе-индика-восстановитель), выведенную с использованием раннецветущей поздней стерильной линии японики Chunjiang 16A и промежуточного типа индика-японика широкой совместимости и линии восстановителя C84. Гибридный рис обладает такими преимуществами, как потенциал высокой урожайности, высокая семенная продуктивность, отличные комплексные агрономические характеристики, хорошая устойчивость к вредителям, широкая адаптивность и т.д. Исходным материалом генетической трансформации, используемым в этом примере, является каллус, индуцированный гибридными семенами риса F1 и не прошедший стадию полового размножения. Таким образом, трансгенный материал поколения T<sub>0</sub>, полученный после трансгена, соответ-

ствует гибриднему растению риса F1 с учетом генетического фона.

## 2. Конструирование векторов мультигенного нокаута.

Основными стадиями являются следующие (конкретные детали также можно найти в CN 201510485573.2).

### 1) Конструирование единой целевой SK-gRNA.

Следующие четыре сайта были выбраны в качестве сайтов для системы редактирования генов CRISPR-Cas9 для нокаута сайтов REC8, OSD1, PAIR1 и MTL (PAM последовательность обозначена подчеркиванием):

сайт нокаута гена *OSD1* (SEQ ID NO:1): CTGCCGCCGACGAGCAACAAGG

сайт нокаута гена *PAIR1* (SEQ ID NO:2): AAGCAACCCAGTGCACCGCTGG

сайт нокаута гена *REC8* (SEQ ID NO:3): CCCATGGCACTAAGGCTCTCCG

сайт нокаута гена *MTL* (SEQ ID NO:4): GGTC AACGTCGAGACCGGCAGG

Были сконструированы две комплементарные последовательности ДНК, соответственно: добавление GGCA перед прямой последовательностью и добавление AAAC перед обратной комплементарной последовательностью;

имеется два сайта рестрикции AarI на SK-gRNA. После расщепления с помощью AarI образовался вектор с липкими концами; после денатурации и отжига сконструированных прямого и обратного праймеров целевой последовательности, лигазу T4 лигировали с ранее сконструированным промежуточным вектором SK-gRNA с образованием единой целевой gRNA;

### 2) Объединение множества gRNA и конструирование конечного бинарного экспрессионного вектора:

используя характеристики BglII и BamHI, NheI и XbaI, SalI и XhoI, являющегося изокаудимером, полимеризовали gRNA: SK-gRNA OSD1 была расщеплена с помощью KpnI и XhoI в качестве вектора; SK-gRNA PAIR1 была расщеплена с помощью SalI и XbaI с получением фрагмента PAIR1 sgRNA, SK-gRNA REC8 была расщеплена с помощью NheI и BamHI с получением фрагмента REC8 sgRNA, и SK-gRNA MTL была расщеплена с помощью BglII и KpnI с получением фрагмента MTL sgRNA, была выполнена одностадийная быстрая полимеризация gRNA с 4 вышеуказанными; наконец, полимеризованный фрагмент gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1-gRNA MTL был расщеплен с помощью KpnI и BglII, и фрагменты были извлечены и лигированы в бинарный вектор pC1300-Cas9, экспрессирующий белок Cas9 (между сайтами KpnI и BamHI), и наконец был получен вектор для мультигенного нокаута pC1300-Cas9-gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1-gRNA MTL, в котором четыре гена REC8, OSD1, PAIR1 и MTL были одновременно нокаутированы и который использовали для трансгеноза для получения мультимутанта риса.

### 3. Получение трансгенных растений.

Мультигенный нокаутный бинарный экспрессионный вектор pC1300-Cas9-gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1-gRNA MTL был трансфицирован в штамм *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 посредством электропорации, и бинарный экспрессионный вектор переносили в каллус риса Chunyou84 с использованием *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной трансформации. Конкретный метод трансформации заключается в стерилизации зародышевой гибридных риса Chunyou84 с последующей инокуляцией их в среду для индуцирования каллуса. Через 1 неделю культивирования в качестве реципиента трансформации был выбран энергично растущий, светло-желтый и относительно рыхлый зародышевый каллус. Штамм EHA105, содержащий плазмиду pC1300-Cas9-gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1-gRNA MTL, использовали для инфицирования рисового каллуса, после культивирования в темноте при 25°C в течение 3 суток резистентный каллус и трансгенные проростки подвергали скринингу на селекционной среде, содержащей 50 мг/л гигромицина. Были выбраны трансгенные проростки, которые нормально растут на гигромициновой селекционной среде.

4. Идентификация четверных мутантов посредством секвенирования Для идентификации мутаций целевых генов использовали метод молекулярной биологии. Геномную ДНК трансгенных растений экстрагировали из одного растения методом СТАВ, и целевую зону амплифицировали методом ПЦР. Используемая пара праймеров:

OSD1-F (SEQ ID NO: 5): atctccaggatgcctgaagtgag

OSD1-R (SEQ ID NO: 6): cctagactgctactcttgcctagtgat

PAIR1-F (SEQ ID NO: 7): ctgtacctgtgcactaattacag

PAIR1-R (SEQ ID NO: 8): ccccatcttatgtactgagctgccag

REC8-F (SEQ ID NO: 9): gcgacgcttactcgaagatca

REC8-R (SEQ ID NO: 10): cgccatgcctcgttgatctcaa

MTL-F (SEQ ID NO: 11): acagtgactagtgcacaaacgatcg

MTL-R (SEQ ID NO: 12): gatcgcgctcagcatgatgcgtgtac

Полученные продукты ПЦР были отправлены в секвенирующую компанию и OSD1-F, PAIR1-F, REC8-F, MTL-F использовали в качестве секвенирующих праймеров для секвенирования. Результаты выравнивали с последовательностью дикого типа. Результаты секвенирования являются бимодальными. Для анализа использовали стратегию вырожденного кодона (<http://dsdecode.scgene.com/> для анализа пиковых паттернов), чтобы получить непосредственно информацию о мутации. Четверные мутанты, все четыре гена которых являются биаллельными мутациями, были удалены.

5. Идентификация растений с фиксированной плоидностью и генотипом в первом дочернем поколении.

1) Для растений первого дочернего поколения идентифицированных четверных мутантных растений использовали проточную цитометрию для скрининга клеточной плоидности, и были получены растения, имеющие такую же клеточную плоидность, что и родительские растения.

Конкретный метод заключается в следующем.

Некоторое количество растительной ткани помещали в стеклянную чашку Петри, добавляли 1-2 мл буфера для лизиса растений LB01, измельчали ткань лезвием (эту операцию всегда выполняли на льду); аспирировали раствор для диссоциации из чашки Петри и фильтровали через нейлоновую сетку 50 мкм в центрифужную пробирку; центрифугировали при 1200 об/мин, при 4°C в течение 5 мин; супернатант отбрасывали, добавляли 450 мкл LB01, который окрашивали 25 мкл предварительно охлажденного PI (1 мг/мл) и RNКазы (1 мг/мл) и инкубировали в течение 10 мин в темноте, тестировали на приборе для удаления диплоидных растений.

На фиг. 4А показаны результаты определения плоидности клеток растения Chunyou84 поколения F1; и на фиг. 4Б показаны результаты определения плоидности клеток растений с фиксированным гетерозисом.

2) Секвенирование всего генома.

Отбирали листья двух родителей Chunjiang 16A и C84, Chunyou84 и растения с фиксированной плоидностью первого дочернего поколения (4 растения были выбраны случайным образом) и извлекали ДНК для секвенирования всего генома. Согласно результатам секвенирования всего генома (фиг. 5), существует много разных гомозиготных генотипов между Chunjiang 16A и C84. Генотипы гибрида Chunyou84 на этих сайтах находятся в гетерозиготном состоянии, имея генотипы как Chunjiang 16A, так и C84. Генотипы 4-х тестированных растений соответствовали Chunyou84 и все они были гетерозиготными. С точки зрения молекулярной биологии было доказано, что генотип полностью соответствовал гибридной материнской клетке.

Пример 2.

1. В этом примере использовали линию закрепителя Chunjiang 16B, промежуточный тип индикатора широкой совместимости и линию восстановителя C84. Исходным материалом для генетической трансформации, используемым в данном примере, является каллус, индуцированный родительскими семенами.

2. Конструирование векторов мультигенного нокаута. Основными стадиями являются следующие.

1) Построение единой целевой SK-gRNA.

Следующие четыре сайта были выбраны в качестве сайтов для системы редактирования генов CRISPR-Cas9 для нокаута сайтов REC8, OSD1, PAIR1 и MTL (последовательность PAM обозначена подчеркиванием):

сайт нокаута гена *OSD1* (SEQ ID NO: 1): CTGCCGCCGACGAGCAACAAGG

сайт нокаута гена *PAIR1* (SEQ ID NO: 2): AAGCAACCCAGTGCACCGCTGG

сайт нокаута гена *REC8* (SEQ ID NO: 3): CCCATGGCACTAAGGCTCTCCG

сайт нокаута гена *MTL* (SEQ ID NO: 4): GGTCAACGTCGAGACCGGCAGG

Соответственно были сконструированы две комплементарные последовательности ДНК: добавление GGCA перед прямой последовательностью и добавление AAAC перед обратной комплементарной последовательностью;

имеется два сайта рестрикции AarI на SK-gRNA. После расщепления с помощью AarI образовался вектор с липкими концами; после денатурации и отжига сконструированных прямого и обратного праймеров целевой последовательности, лигазу T4 лигировали с заранее сконструированным промежуточным вектором SK-gRNA для образования единой целевой gRNA.

4) Объединение множества gRNA и конструирование конечного бинарного экспрессионного вектора:

используя характеристики BglII и BamHI, NheI и XbaI, SalI и XhoI, являющегося изокаудимером, полимеризовали gRNA: SK-gRNA OSD1 была расщеплена с помощью KpnI и XhoI, в качестве вектора; SK-gRNA PAIR1 была расщеплена с помощью SalI и XbaI с получением фрагмента PAIR1 sgRNA, SK-gRNA REC8 была расщеплена с помощью NheI и BamHI с получением фрагмента REC8 sgRNA, и SK-gRNA MTL была расщеплена с помощью BglII и KpnI с получением фрагмента MTL sgRNA, была проведена одностадийная быстрая полимеризация gRNA с вышеуказанными 4; наконец, полимеризованный фрагмент gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1-gRNA MTL был расщеплен с помощью KpnI и BglII, и фрагменты были выделены и лигированы в бинарный вектор pC1300-Cas9, экспрессирующий белок Cas9

(между сайтами KpnI и BamHI), и наконец был получен вектор мультигенного нокаута pC1300-Cas9-gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1-gRNA MTL, четыре гена которого, REC8, OSD1, PAIR1 и MTL, были одновременно нокаутированы, и который использовали для трансгеноза с получением мультимутантного риса.

### 3. Получение трансгенных растений.

Бинарный экспрессионный вектор для мультигенного нокаута pC1300-Cas9-gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1-gRNA MTL переносили в штамм EHA105 *Agrobacterium tumefaciens* посредством электропорации, и бинарный экспрессионный вектор переносили в каллус Chunjiang 16B и C84 с использованием трансформации, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*. Конкретный метод трансформации заключается в стерилизации зародышей семян, с последующей инокуляцией их в каллус-индуцирующую среду. Через 1 неделю культивирования энергично растущий, светло-желтый и относительно рыхлый зародышевый каллус был выбран в качестве реципиента трансформации. Штамм EHA105, содержащий плазмиду pC1300-Cas9-gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1-gRNA MTL, использовали для инфицирования каллуса риса, после культивирования в темноте при 25°C в течение 3 суток, резистентные каллусы и трансгенные ростки подвергали скринингу на селекционной среде, содержащей 50 мг/л гигромицина. Были отобраны трансгенные ростки, которые нормально растут на гигромициновой селекционной среде.

4. Материалы Chunjiang 16B и C84, все четыре гена которых являются гетерозиготной мутацией, были идентифицированы с помощью секвенирования, и затем гибридизированы, чтобы отсеять гибридные растения, четыре гена которых являются мутациями.

Для идентификации мутаций целевых генов использовали метод молекулярной биологии. Геномную ДНК трансгенных растений экстрагировали из одного растения посредством метода СТАВ и целевую зону амплифицировали при помощи ПЦР. Использованная пара праймеров:

OSD1-F (SEQ ID NO: 5): atctccaggatgcctgaagtgag

OSD1-R (SEQ ID NO: 6): cctagactgctactcttctagtagat

PAIR1-F (SEQ ID NO: 7): ctgtacctgtgcactaattacag

PAIR1-R (SEQ ID NO: 8): ccccatcttatgtactgagcttgccag

REC8-F (SEQ ID NO: 9): gcgacgcttcactcgaagatca

REC8-R (SEQ ID NO: 10): cgccatgcctcgttgatctcaa

MTL-F (SEQ ID NO: 11): acagtgactagtgacaacgatcg

MTL-R (SEQ ID NO: 12): gatcgctcagcatgatgcgtgtac

Полученные продукты ПЦР были отправлены в секвенирующую компанию, и OSD1-F, PAIR1-F, REC8-F, MTL-F использовали в качестве секвенирующих праймеров для секвенирования. Результаты выравнивали с последовательностью дикого типа, чтобы непосредственно получить информацию о мутации.

После исключения материалов Chunjiang 16B и C84 с гетерозиготными мутациями их скрещивали и исключали гибридные растения с биаллельными мутациями в поколении F1.

5. Собирали семена гибридных растений, и в первом дочернем поколении идентифицировали растения с фиксированным генотипом и плоидностью.

1) Для растений первого дочернего поколения идентифицированных растений с тремя мутациями использовали проточную цитометрию для проверки клеточной плоидности и были получены растения, имеющие такую же клеточную плоидность, что и родительские растения.

Конкретный метод заключается в следующем.

Некоторое количество растительной ткани помещали в стеклянную чашку Петри, добавляли 1-2 мл буфера для лизиса растений LB01, измельчали ткань лезвием (эту операцию всегда выполняли на льду); аспирировали раствор для диссоциации из чашки Петри и фильтровали через нейлоновую сетку 50 мкм в центрифужную пробирку; центрифугировали при 1200 об/мин, при 4°C в течение 5 мин; супернатант отбрасывали, добавляли 450 мкл LB01, который окрашивали 25 мкл предварительно охлажденного PI (1 мг/мл) и RNКазы (1 мг/мл) в течение 10 мин в темноте, тестировали на приборе для удаления диплоидных растений.

2) Секвенирование всего генома.

Отбирали листья двух родительских растений Chunjiang 16B и C84, Chunyou84 и растений с фиксированной плоидностью первого дочернего поколения (2 растения были выбраны случайным образом), и извлекали ДНК для секвенирования всего генома. Согласно результатам секвенирования всего генома: существует много разных гомозиготных генотипов между Chunjiang 16B и C84. Генотипы гибрида Chunyou84 на этих сайтах находятся в гетерозиготном состоянии, имея генотипы обоих Chunjiang 16B и C84. Генотипы 2 тестированных растений соответствовали Chunyou84, и все они были гетерозиготными. С точки зрения молекулярной биологии было доказано, что генотип полностью соответствовал гибридной материнской клетке.

## Пример 3.

1. В этом примере используемый гибрид F1 представляет собой одобренный имеющийся в продаже гибридный культивар риса Chunyou84. Chunyou84 представляет собой новую межподвидовую гибридную рисовую комбинацию japonica-non-indica-restorer (японика-не-индика-восстановитель), выведенную с использованием стерильной линии Chunjiang 16A и промежуточного типа индика-японика широкой совместимости и линии восстановителя С84. Гибридный рис обладает такими преимуществами, как потенциал высокой урожайности, высокая семенная продуктивность, отличные комплексные агрономические характеристики, хорошая устойчивость к вредителям, широкая адаптивность и т.д. Исходным материалом генетической трансформации, используемым в этом примере, является каллус, индуцированный гибридными семенами риса F<sub>1</sub> и не прошедший стадию полового размножения. Таким образом, трансгенный материал поколения T<sub>0</sub>, полученный после трансгена, соответствует гибриднему растению риса F<sub>1</sub> с учетом генетического фона.

2. Конструирование векторов мультигенного нокаута.

Основными стадиями являются следующие.

1) Конструирование единичной целевой SK-gRNA.

Следующие три сайта были выбраны в качестве сайтов для системы редактирования генов CRISPR-Cas9 для нокаута REC8, OSD1 и PAIR1 (PAM последовательность обозначена подчеркиванием):

сайт нокаута гена *OSD1* (SEQ ID NO: 1): CTGCCGCCGACGAGCAACAAGG

сайт нокаута гена *PAIR1* (SEQ ID NO: 2): AAGCAACCCAGTGCACCGCTTGG

сайт нокаута гена *REC8* (SEQ ID NO: 3): CCCATGGCACTAAGGCTCTCCG

Были сконструированы две комплементарные последовательности ДНК, соответственно: добавление GGCA перед прямой последовательностью и добавление AAAC перед обратной комплементарной последовательностью;

имеются два сайта рестрикции AarI на SK-gRNA. После расщепления с помощью AarI, образовался вектор с липкими концами; после денатурации и отжига сконструированных прямого и обратного праймеров целевой последовательности, лигировали лигазу T4 с ранее сконструированным промежуточным вектором SK-gRNA, чтобы сформировать единую целевую gRNA.

2) Объединение трех gRNA и конструирование конечного бинарного экспрессионного вектора:

используя характеристики BglII и BamHI, NheI и XbaI, Sall и XhoI, которые являются изокаударными, полимеризовали gRNA; окончательно полимеризованный фрагмент gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1 был расщеплен с помощью KpnI и BglIII, и фрагменты были выделены и лигированы в бинарный вектор pC1300-Cas9, экспрессирующий белок Cas9 (между сайтами KpnI и BamHI), и наконец был получен вектор для мультигенного нокаута pC1300-Cas9-gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1, в котором три гена REC8, OSD1 и PAIR1 были одновременно нокаутированы и который использовали для трансгенеза с получением мультимутанта риса.

3. Получение трансгенных растений.

Мультигенный нокаутный бинарный экспрессионный вектор pC1300-Cas9-gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1-gRNA перемещали в штамм EHA105 *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium tumefaciens*) посредством электропорации и бинарный экспрессионный вектор перемещали в каллус риса Chunyou84 с использованием трансформации, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*. Конкретный метод трансформации заключается в стерилизации зародышей гибридных семян риса Chunyou84 с последующей их инокуляцией в среду для индуцирования каллуса. Через 1 неделю культивирования энергично растущий, светло-желтый и относительно рыхлый зародышевый каллус был выбран в качестве реципиента трансформации. Штамм EHA105, содержащий плазмиду pC1300-Cas9-gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1, использовали для инфицирования каллуса риса, после культивирования в темноте при 25°C в течение 3 суток, резистентный каллус и трансгенные проростки подвергали скринингу на селекционной среде, содержащей 50 мг/л гигромицина. Были отобраны трансгенные проростки, которые нормально растут на гигромициновой селекционной среде.

4. Идентификация тройных мутантов посредством секвенирования.

Для идентификации мутаций целевых генов использовали метод молекулярной биологии. Геномную ДНК трансгенных растений экстрагировали из одного растения посредством метода СТАВ и целевую зону амплифицировали посредством ПЦР.

Использованная пара праймеров:

OSD1-F (SEQ ID NO: 5): atctccaggatgcctgaagtgag

OSD1-R (SEQ ID NO: 6): cctagactgctactctgctagtgat

PAIR1-F (SEQ ID NO: 7): ctgtacctgtgcatctaattacag

PAIR1-R (SEQ ID NO: 8): ccccatcttatgtactgagcttgccag

REC8-F (SEQ ID NO: 9): gcgacgcttcactcgaagatca

REC8-R (SEQ ID NO: 10): cgccatgcctcgttgatctcaa

Полученные продукты ПЦР были отправлены в секвенирующую компанию и OSD1-F, PAIR1-F и REC8-F были использованы в качестве секвенирующих праймеров для секвенирования. Результаты выравнивали с последовательностью дикого типа.

Результаты секвенирования являются бимодальными. Для анализа использовали стратегию вырожденного кодона (<http://dsdecode.scgene.com/> для анализа пиковых паттернов), чтобы получить непосредственную информацию о мутации.

Среди них мутанты с биаллельными мутациями в этих 3 сайтах представляют собой растения, которые могут производить гаметы, генотип и хромосомная ploидность которых соответствуют соматическим клеткам.

5. Используя тройной мутант в качестве женского родителя, опыляли пыльцой другого растения гаплоиндуктора для индукции развития женских гамет в семена, в результате было получено большое количество гибридов, которые поддерживали гетерозис.

6. Идентификация растений с фиксированной ploидностью и генотипом в первом дочернем поколении.

1) Для растений первого дочернего поколения идентифицированных тройных мутантных растений использовали проточную цитометрию для скрининга клеточной ploидности, и были получены растения, имеющие такую же клеточную ploидность, что и родительские растения.

Конкретный метод заключается в следующем.

Некоторое количество растительной ткани помещали в стеклянную чашку Петри, добавляли 1-2 мл буфера для лизиса растений LB01, измельчали ткань лезвием (эту операцию всегда выполняли на льду); аспирировали раствор для диссоциации из чашки Петри и фильтровали через нейлоновую сетку 50 мкм в центрифужную пробирку; центрифугировали при 1200 об/мин, при 4°C в течение 5 мин; супернатант отбрасывали, добавляли 450 мкл LB01, который окрашивали 25 мкл предварительно охлажденного PI (1 мг/мл) и RNКазы (1 мг/мл) в течение 10 мин в темноте, тестировали на приборе для удаления диплоидных растений.

2) Секвенирование всего генома.

Отбирали листья двух родителей Chunjiang 16A и C84, Chunyou84 и первого дочернего поколения с фиксированной ploидностью (4 растения были выбраны случайным образом), и извлекали ДНК для секвенирования всего генома. Согласно результатам секвенирования всего генома: существует много разных гомозиготных генотипов между Chunjiang 16A и C84. Генотипы гибрида Chunyou84 на этих сайтах находятся в гетерозиготном состоянии, имея генотипы и Chunjiang 16A, и C84. Генотипы 4 протестированных растений соответствовали Chunyou84 и все они были гетерозиготными. С точки зрения молекулярной биологии было доказано, что генотип полностью соответствовал гибридной материнской клетке.

Пример 4.

1. В этом примере использованный гибрид F1 представляет собой одобренный имеющийся в продаже гибридный культивар риса Chunyou84. Chunyou84 представляет собой новую межподвидовую гибридную комбинацию риса japonica-non-indica-restorer, выведенную с использованием стерильной линии Chunjiang 16A и промежуточного типа индика-японика широкой совместимости и линии восстановителя C84. Гибридный рис имеет преимущества высокого потенциала урожайности, высокой семенной продуктивности, отличных комплексных агрономических характеристик, хорошей устойчивости к вредителям и широкой адаптивности и т.д. Исходным материалом генетической трансформации, используемым в этом примере, является каллус, индуцированный гибридными семенами риса F<sub>1</sub> и не прошедший стадию полового размножения. Таким образом, трансгенный материал поколения T<sub>0</sub>, полученный после трансгена, соответствует гибриднему растению риса F<sub>1</sub> на основании генетического фона.

2. Конструирование векторов мультигенного нокаута.

Основными стадиями являются следующие.

1) Конструирование единичной целевой SK-gRNA.

Следующие три сайта были выбраны в качестве сайтов для системы редактирования генов CRISPR-Cas9 для нокаута REC8, OSD1 и PAIR1 (PAM последовательность обозначена подчеркиванием):

сайт нокаута гена *OSD1* (SEQ ID NO: 1): CTGCCGCCGACGAGCAACAAGG

сайт нокаута гена *PAIR1* (SEQ ID NO: 2): AAGCAACCCAGTGCACCGCTGG

сайт нокаута гена *REC8* (SEQ ID NO: 3): CCCATGGCACTAAGGCTCTCCG

Были сконструированы две комплементарные последовательности ДНК, соответственно: добавле-



ние GGCA перед прямой последовательностью и добавление AAAC перед обратной комплементарной последовательностью;

имеются два сайта рестрикции AarI на SK-gRNA. После расщепления с помощью AarI образовался вектор с липкими концами; после денатурации и отжига сконструированных прямого и обратного праймеров целевой последовательности, лигазу T4 лигировали с ранее сконструированным промежуточным вектором SK-gRNA, чтобы сформировать единую целевую gRNA.

2) Объединение трех gRNA и конструирование конечного бинарного экспрессионного вектора:

используя характеристики BglII и BamHI, NheI и XbaI, SalI и XhoI, которые являются изокаударными, полимеризовали gRNA; наконец, полимеризованный фрагмент gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1 расщепляли с помощью KpnI и BglII, и фрагменты были выделены и лигированы в бинарный вектор pC1300-Cas9, экспрессирующий белок Cas9 (между сайтами KpnI и BamHI), и наконец был получен вектор для мультигенного нокаута pC1300-Cas9-gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1, в котором три гена REC8, OSD1 и PAIR1 были нокаутированы одновременно и который использовали для трансгеноза с получением мультимутанта риса.

3. Получение трансгенных растений.

Мультигенный нокаутный бинарный экспрессионный вектор pC1300-Cas9-gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1 переносили в штамм EHA105 *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium tumefaciens*) посредством электропорации и бинарный экспрессионный вектор переносили в каллус риса Chunyaou84 с использованием трансформации, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*. Конкретный способ трансформации заключается в стерилизации зародышей гибридных семян риса Chunyaou84 с последующей инокуляцией их в среду для индуцирования каллуса. Через 1 неделю культивирования энергично растущий, светло-желтый и относительно рыхлый зародышевый каллус был выбран в качестве реципиента трансформации. Штамм EHA105, содержащий плазмиду pC1300-Cas9-gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1, использовали для инфицирования каллуса риса, после культивирования в темноте при 25°C в течение 3 суток, резистентный каллус и трансгенные проростки подвергали скринингу на селекционной среде, содержащей 50 мг/л гигромицина. Были отобраны трансгенные проростки, которые нормально растут на гигромициновой селекционной среде.

4. Идентификация тройных мутантов посредством секвенирования.

Для идентификации мутаций целевых генов использовался метод молекулярной биологии. Геномную ДНК трансгенных растений экстрагировали из одного растения посредством метода СТАВ, и целевую зону амплифицировали посредством ПЦР. Используемая пара праймеров:

OSD1-F (SEQ ID NO: 5): atctccaggatgctgaagtgag

OSD1-R (SEQ ID NO: 6): cctagactgctactcttgctagtgtat

PAIR1-F (SEQ ID NO: 7): ctgtacctgtgcatctaattacag

PAIR1-R (SEQ ID NO: 8): ccccatcttatgtactgagcttgccag

REC8-F (SEQ ID NO: 9): gcgacgcttactcgaagatca

REC8-R (SEQ ID NO: 10): cgccatgcctcgttgatctcaa

Полученные продукты ПЦР были отправлены в секвенирующую компанию и OSD1-F, PAIR1-F и REC8-F использовали в качестве секвенирующих праймеров для секвенирования. Результаты выравнивали с последовательностью дикого типа. Результаты секвенирования являются бимодальными. Для анализа использовали стратегию вырожденного кодона (<http://dsdecode.scgene.com/> для анализа пиковых паттернов), чтобы непосредственно получить информацию о мутации.

Среди них мутанты с биаллельными мутациями в этих 3 сайтах представляют собой растения, которые могут производить гаметы, генотип и хромосомная ploидность которых соответствует соматическим клеткам.

5. После того, как тройные мутанты развились до определенной стадии, посредством асептической операции брали пыльники или пыльцу соответственно и инокулировали в искусственно составленную пыльниковую среду, чтобы индуцировать образование каллуса, и затем получали растения посредством культуры ткани.

6. Идентификация растений с фиксированной ploидностью и генотипом в растениях тканевой культуры.

1) Для растений первого дочернего поколения идентифицированных тройных мутантных растений использовали проточную цитометрию для скрининга клеточной ploидности, и были получены растения, имеющие такую же клеточную ploидность, что и родительские растения.

Конкретный метод заключается в следующем.

Некоторое количество растительной ткани помещали в стеклянную чашку Петри, добавляли 1-2 мл буфера для лизиса растений LB01, измельчали ткань лезвием (эту операцию всегда выполняли на льду); аспирировали раствор для диссоциации из чашки Петри и фильтровали через нейлоновую сетку 50 мкм в центрифужную пробирку; центрифугировали при 1200 об/мин, при 4°C в течение 5 мин; супернатант отбрасывали, добавляли 450 мкл LB01, который окрашивали 25 мкл предварительно охлажденного PI

(1 мг/мл) и РНКазы (1 мг/мл) в течение 10 мин в темноте, тестировали на приборе для удаления диплоидных растений

2) Секвенирование всего генома.

Отбирали листья двух родителей Chunjiang 16A и C84, Chunyou84 и первого дочернего поколения с фиксированной плоидностью (4 растения были выбраны случайным образом) и извлекали ДНК для секвенирования всего генома. Согласно результатам секвенирования всего генома: существует много разных гомозиготных генотипов между Chunjiang 16A и C84. Генотипы гибрида Chunyou84 на этих сайтах находятся в гетерозиготном состоянии, имея генотипы и Chunjiang 16A, и C84. Генотипы 4-х протестированных растений соответствовали Chunyou84, и все они были гетерозиготными. С точки зрения молекулярной биологии было доказано, что генотип полностью соответствовал гибридной материнской клетке.

Пример 5.

1. В этом примере используется гибрид F1 - одобренный имеющийся в продаже гибридный культивар риса Chunyou84. Chunyou84 представляет собой новую межвидовую гибридную комбинацию риса японика-поп-индика-восстановитель, выведенный с использованием стерильной линии Chunjiang 16A и промежуточного типа индика-японика широкой совместимости и восстановителя фертильности c84. Гибридный рис имеет преимущества высокого потенциала урожайности, высокой семенной продуктивности, отличных комплексных агрономических характеристик, хорошей устойчивости к вредителям и широкой адаптивности, и т.д. Исходным материалом генетической трансформации, используемым в этом примере, является каллус, индуцированный гибридными семенами риса F<sub>1</sub>, и не прошедший стадию полового размножения. Таким образом, трансгенный материал поколения T<sub>0</sub>, полученный после трансгена, соответствует гибриднему растению риса F<sub>1</sub> на основании генетического фона.

2. Конструирование векторов мультигенного нокаута. Основными стадиями являются следующие

1) Конструирование единичной целевой SK-gRNA.

Следующие три сайта были выбраны в качестве сайтов для системы редактирования генов CRISPR-Cas9 для нокаута REC8, OSD1, и PAIR1 (PAM последовательность обозначена подчеркиванием):

сайт нокаута гена *OSD1* (SEQ ID NO: 1): CTGCCGCCGACGAGCAACAAGG

сайт нокаута гена *PAIR1* (SEQ ID NO: 2): AAGCAACCCAGTGCACCGCTTGG

сайт нокаута гена *REC8* (SEQ ID NO: 3): CCCATGGCACTAAGGCTCTCCG

Были сконструированы две комплементарные последовательности ДНК, соответственно: добавление GGCA перед прямой последовательностью и добавление AAAC перед обратной комплементарной последовательностью;

имеется два сайта рестрикции AarI на SK-gRNA. После расщепления с помощью AarI образовался вектор с липкими концами; после денатурации и отжига сконструированных прямого и обратного праймеров целевой последовательности, лигазу T4 лигировали с ранее сконструированным промежуточным вектором SK-gRNA, чтобы сформировать единую целевую gRNA.

2) Объединение трех gRNA и конструирование конечного бинарного экспрессионного вектора:

используя характеристики BglII и BamHI, NheI и XbaI, SalI and XhoI, которые являются изоконверсионными, полимеризовали gRNA; наконец полимеризованный фрагмент gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1 был расщеплен с помощью KpnI и BglII, и фрагменты были выделены и лигированы в бинарный вектор pC1300-Cas9, экспрессирующий белок Cas9 (между сайтами KpnI и BamHI), и наконец был получен вектор для мультигенного нокаута pC1300-Cas9-gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1, в котором три гена REC8, OSD1 и PAIR1 были нокаутированы одновременно и который использовали для получения трансгеноза с получением мультимутанта риса.

3. Получение трансгенных растений.

Мультигенный нокаутный бинарный экспрессионный вектор pC1300-Cas9-gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1 переносили в штамм EHA105 *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium tumefaciens*) посредством электропорации и бинарный экспрессионный вектор переносили в каллус риса Chunyou84 с использованием трансформации, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*. Конкретный способ трансформации заключается в стерилизации зародышей семян гибридного риса Chunyou84 с последующей их инокуляцией в среду для индукции каллуса. Через 1 неделю культивирования энергично растущий, светло-желтый и относительно рыхлый зародышевый каллус был выбран в качестве реципиента трансформации. Штамм EHA105, содержащий плазмиду pC1300-Cas9-gRNA OSD1-gRNA REC8-gRNA PAIR1, использовали для инфицирования каллуса риса, после культивирования в темноте при 25°C в течение 3 суток, резистентный каллус и трансгенные проростки были подвергнуты скринингу на селекционной среде, содержащей 50 мг/л гигромицина. Были отобраны трансгенные проростки, которые нормально растут на гигромициновой селекционной среде.

4. Идентификация тройных мутантов посредством секвенирования. Для идентификации мутаций целевых генов использовался метод молекулярной биологии. Геномную ДНК трансгенных растений экстрагировали из одного растения методом на основе СТАВ и целевую зону амплифицировали посредством ПЦР. Использованная пара праймеров:

OSD1-F (SEQ ID NO:5): atctccaggatgcctgaagtgag

OSD1-R (SEQ ID NO:6): cctagactgctactctgctagtgat

PAIR1-F (SEQ ID NO:7): ctgtacctgtgcatctaattacag

PAIR1-R (SEQ ID NO:8): ccccatcttatgtactgagcttgccag

REC8-F (SEQ ID NO:9): gcgacgcttactcgaagatca

REC8-R (SEQ ID NO:10): cgccatgcctcgttgatctcaa

Полученные продукты ПЦР были отправлены в секвенирующую компанию, и OSD1-F, PAIR1-F и REC8-F использовали в качестве секвенирующих праймеров для секвенирования. Результаты выравнивали с последовательностью дикого типа. Результаты секвенирования являются бимодальными. Для анализа использовали стратегию вырожденного кодона (<http://dsdecode.scgene.com/> для анализа пиковых паттернов) для непосредственного получения информации о мутациях.

Среди них мутанты с биаллельными мутациями в этих 3 сайтах представляют собой растения, которые могут производить гаметы, генотип и хромосомная ploидность которых соответствует соматическим клеткам.

##### 5. Химически индуцированный партеногенез.

Был взят рисовый материал с одновременным нокаутом трех генов REC8, OSD1 и PAIR1. Перед цветением риса осуществляли удаление несозревших пестиков посредством срезания оболочки в соответствии с общей методикой гибридизации, и затем рисовые колоски погружали в раствор для обработки из 5-50 мг/л малеинового гидразида или 2-20 мг/л 6-бензиламиноаденина на 2-3 минуты, герметично упаковывая, чтобы предотвратить попадание пыльцы. Через двадцать суток после обработки брали незрелые зародыши или зерна и культивировали их с получением партеногенетических растений.

6. Идентификация растений с фиксированной ploидностью и генотипом в первом дочернем поколении.

1) Для растений первого дочернего поколения идентифицированных тройных мутантных растений использовали проточную цитометрию для скрининга клеточной ploидности, и были получены растения, имеющие такую же клеточную ploидность, что и родительские растения.

Конкретный метод заключается в следующем.

Некоторое количество растительной ткани помещали в стеклянную чашку Петри, добавляли 1-2 мл буфера для лизиса растений LB01, измельчали ткань лезвием (эту операцию всегда выполняли на льду); аспирировали раствор для диссоциации из чашки Петри и фильтровали через нейлоновую сетку 50 мкм в центрифужную пробирку; центрифугировали при 1200 об/мин, при 4°C в течение 5 мин; супернатант отбрасывали, добавляли 450 мкл LB01, который окрашивали 25 мкл предварительно охлажденного PI (1 мг/мл) и RNКазы (1 мг/мл) в течение 10 мин в темноте, тестировали на приборе для удаления диплоидных растений

##### 2) Секвенирование всего генома.

Отбирали листья двух родителей Chunjiang 16A и C84, Chunyou84 и растения с фиксированной ploидностью первого дочернего поколения (4 растения были выбраны случайным образом), и извлекали ДНК для секвенирования всего генома. Согласно результатам секвенирования всего генома: существует много разных гомозиготных генотипов между Chunjiang 16A и C84. Генотипы гибрида Chunyou84 на этих сайтах находятся в гетерозиготном состоянии, имея генотипы и Chunjiang 16A, и C84. Генотипы 4-х протестированных растений соответствовали Chunyou84, и все они были гетерозиготными. С точки зрения молекулярной биологии было доказано, что генотип полностью соответствовал гибридной материнской клетке.

Пример 6.

##### 1. Мутагенез и скрининг мутанта.

Потомство культивара сои Zhonghuang39, полученного посредством EMS (этилметансульфонат)-мутагенеза, подвергали скринингу с помощью технологии высокопроизводительного секвенирования с получением растений, у которых REC8 и OSD1 являются гетерозиготными мутациями соответственно. В результате гибридизации между гетерозиготными растениями и скрининга потомства были получены растения, у которых REC8 и OSD1 являются гетерозиготными мутациями; у культивара сои Qihuang34, посредством EMS-мутагенеза, потомство подвергали скринингу с помощью технологии высокопроизводительного секвенирования с получением растений, у которых SPO11-1 и CENH3 являются гетерозиготными мутациями соответственно. В результате гибридизации между гетерозиготными растениями и скрининга потомства были получены растения, у которых SPO11-1 и CENH3 являются гетерозиготными мутациями; растения, у которых REC8 и OSD1 являются гетерозиготными мутациями, и растения, у которых SPO11-1 и CENH3 являются гетерозиготными мутациями, гибридизировали, и потомство подвергали скринингу с получением растений, все четыре гена которых являются гетерозиготными мутациями.

##### 2. Конструирование трансгенного вектора.

Был сконструирован бинарный вектор с оцит-специфично экспрессируемым EC1.2 для управления

экспрессией CENH3 дикого типа, и этим вектором трансформировали растения, все четыре гена которых являются гетерозиготными мутациями; самовоспроизводящееся потомство растений было идентифицировано и подвергнуто скринингу с получением одного растения, у которого все гены REC8, OSD1, SPO11-1 и CENH3 являются гомозиготными мутациями и которое имеет Ec1.2::CenH3 трансгенные компоненты, были собраны самовоспроизводящееся семена этого растения.

3. Идентификация растений с фиксированной плоидностью и генотипом в первом дочернем поколении.

1) Для дочерних растений первого поколения использовали проточную цитометрию для скрининга плоидности клеток и были получены растения, имеющие такую же клеточную плоидность, что и родительские растения.

Конкретный метод заключается в следующем.

Некоторое количество растительной ткани помещали в стеклянную чашку Петри, добавляли 1-2 мл буфера для лизиса растений LB01, измельчали ткань лезвием (эту операцию всегда выполняли на льду); аспирировали раствор для диссоциации из чашки Петри и фильтровали через нейлоновую сетку 50 мкм в центрифужную пробирку; центрифугировали при 1200 об/мин, при 4°C в течение 5 мин; супернатант отбрасывали, добавляли 450 мкл LB01, который окрашивали 25 мкл предварительно охлажденного PI (1 мг/мл) и РНКазы (1 мг/мл) в течение 10 мин в темноте, тестировали на приборе для удаления диплоидных растений

2) Генотипическое тестирование.

Потомство с фиксированной плоидностью (4 растения были выбраны случайным образом) и листья растений предыдущего поколения были отобраны для экстракции ДНК; 16 гетерозиготных участков были случайным образом отобраны из материалов гибридов предыдущего поколения, и были сконструированы праймеры для детекции. Генотипическое тестирование выполняли на растениях первого дочернего поколения, и оказалось, что генотипы 4 растений на 16 участках были точно такими же, как и у предыдущего поколения, то есть все они были гетерозиготными. С точки зрения молекулярной биологии было доказано, что гетерозиготный генотип не подвергся рекомбинации или разделению.

Пример 7.

1. В этом примере использованный гибрид F<sub>1</sub> представляет собой гибрид кукурузы Jiahe158, который представляет собой комбинацию LD140×LD975.

2. Конструирование векторов мультигенного нокаута. Основными стадиями являются следующие.

1) Конструирование единичной целевой SK-gRNA.

Следующие четыре сайта были выбраны как сайты для системы редактирования генов CRISPR-Cas9 для нокаута сайтов REC8, OSD1, PAIR1 и MTL кукурузы (PAM последовательность обозначена подчеркиванием):

сайт нокаута гена *ZmOSD1* (SEQ ID NO: 30): TCTGCCTGACTGGAGTTATTGG

сайт нокаута гена *ZmPAIR1* (SEQ ID NO: 31): GGATTGCTGCGACAGCGGCTTGGG

сайт нокаута гена *ZmREC8* (SEQ ID NO: 32): GGAAGTCCCACGAGTAATTATGG

сайт нокаута гена *ZmMTL* (SEQ ID NO: 33): GGAAGGCGAGGATGGTTCCCGGG

2) Объединение множества gRNA и конструирование конечного бинарного экспрессионного вектора:

используя характеристики BglII и BamHI, NheI и XbaI, SalI и XhoI, которые являются изокаударными, полимеризовали gRNA: SK-gRNA *ZmOSD1* расщепляли с помощью KpnI и XhoI в качестве вектора; SK-gRNA *ZmPAIR1* расщепляли с помощью KpnI и XhoI с получением фрагмента *ZmPAIR1* sgRNA, SK-gRNA *ZmREC8* расщепляли с помощью NheI и BamHI с получением фрагмента *ZmREC8* sgRNA, и SK-gRNA *ZmMTL* расщепляли с помощью BglII и KpnI с получением фрагмента *ZmMTL* sgRNA, была проведена одностадийная быстрая полимеризация gRNA с вышеуказанными 4; наконец полимеризованный фрагмент gRNA *ZmOSD1*-gRNA *ZmREC8*-gRNA *ZmPAIR1*-gRNA *ZmMTL* расщепляли с помощью KpnI и BglII, и фрагменты были выделены и лигированы в бинарный вектор pC1300-Cas9, экспрессирующий белок Cas9 (между сайтами KpnI и BamHI), и наконец был получен вектор для мультигенного нокаута pC1300-Cas9-gRNA *ZmOSD1*-gRNA *ZmREC8*-gRNA *ZmPAIR1*-gRNA *ZmMTL*, у которого четыре гена кукурузы REC8, OSD1, PAIR1 и MTL были одновременно нокаутированы и который использовали для трансгенеза с получением мультимутанта кукурузы.

3. Получение трансгенных растений.

Кукурузный вектор для мультигенного нокаута, полученный на предыдущей стадии, переносили в штамм LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* посредством электропорации, и этот бинарный экспрессионный вектор переносили в каллус кукурузного гибрида Jiahe158 посредством трансформации, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*. После опыления кукурузу искусственно упаковывали на 9-12 суток, брали женские початки, снимали прицветники, и опрыскивали 75% спиртом, когда снимали каждый прицветник, для дезинфекции поверхности, и незрелые зародыши размером 1,0-1,2 мм отбирали в бокс с помощью лезвия и затем помещали в гипертонический раствор для дальнейшего использования, при этом время в гипертоническом растворе не должно было превышать 1 час. Когда значение OD<sub>600</sub> культивированных *Agrobacterium tumefaciens* достигало 0,8, бактерии собирали посредством центрифуги-

гирования, используя 1 моль/л суспензию после ресуспендирования, добавляли ацетосирингон до конечной концентрации 200 мкмоль/л, этот бактериальный раствор использовали для инфицирования незрелых зародышей в течение 5 минут, затем смесь переносили в среду для со-культивирования и культивировали в темноте при 25°C в течение 7 суток. Незрелых зародышей переносили в селективную среду, содержащую 15 мг/л гигромицина, и в регенерационную среду в более поздний период для скрининга устойчивого каллуса и трансгенных растений.

#### 4. Идентификация четверных мутантов посредством секвенирования.

Метод СТАВ использовали для выделения геномной ДНК трансгенной кукурузы из одного растения, и Hi-Tom (Высокопроизводительное отслеживание мутаций) использовали для идентификации мутаций целевого гена (конкретные подробности можно найти в CN 201710504178.3).

5. Идентификация растений кукурузы с фиксированной плоидностью и генотипом в первом дочернем поколении.

1) Для растений первого дочернего поколения идентифицированного четверного мутанта кукурузы использовали проточную цитометрию для скрининга плоидности, и были получены растения, имеющие такую же клеточную плоидность, что и родительские растения.

Конкретный метод заключается в следующем.

Некоторое количество растительной ткани помещали в стеклянную чашку Петри, добавляли 1-2 мл буфера для лизиса растений LB01, измельчали ткань лезвием (эту операцию всегда выполняли на льду); аспирировали раствор для диссоциации из чашки Петри и фильтровали через нейлоновую сетку 50 мкм в центрифужную пробирку; центрифугировали при 1200 об/мин, 4°C в течение 5 мин; супернатант отбрасывали, добавляли 450 мкл LB01, который окрашивали 25 мкл предварительно охлажденного PI (1 мг/мл) и RNКазы (1 мг/мл) в течение 10 мин в темноте, тестировали на приборе для удаления диплоидных растений

#### 2) Секвенирование всего генома.

Отбирали листья двух родителей LD140 и LD975, Jiahe158 и растения кукурузы первого дочернего поколения с фиксированной плоидностью, и извлекали ДНК для секвенирования всего генома. Генотипы растений кукурузы первого дочернего поколения соответствовали Jiahe158 и все они были гетерозиготными. С точки зрения молекулярной биологии было доказано, что генотипы полностью соответствовали гибридным материнским клеткам.

#### Пример 8.

1. В этом примере использованный гибрид F<sub>1</sub> представляет собой гибрид томата Elisa, материнская особь представляет собой устойчивую к низким температурам инбредную линию "Syi2-4", и отцовская особь представляет собой высококачественную устойчивую к болезням инбредную линию "S28".

#### 2. Конструирование векторов мультигенного нокаута.

Основными стадиями являются следующие.

##### 1) Конструирование единичной целевой SK-gRNA.

Следующие четыре сайта были выбраны, как сайты для системы редактирования генов CRISPR-Cas9 для нокаута сайтов томата REC8, OSD1, SPO11 и MTL (PAM последовательность обозначена подчеркиванием):

сайт нокаута гена *S1OSD1* (SEQ ID NO: 34): CAGAAGCAGGGAGAATGGCAGG

сайт нокаута гена *S1SPO11* (SEQ ID NO: 35): TGAGGATCTCGCTCGAGGTAGG

сайт нокаута гена *S1REC8* (SEQ ID NO: 36): GCACAGGAGGAACCTGCTAAGG

сайт нокаута гена *S1MTL* (SEQ ID NO: 37): TGATTGCCGGAACGAGCACCGG

##### 2) Объединение множества gRNA и конструирование конечного бинарного экспрессионного вектора:

используя характеристики BglII и BamHI, NheI и XbaI, SalI и XhoI, которые являются изокаударными, полимеризовали gRNA: SK-gRNA S1OSD1 расщепляли с помощью KpnI и XhoI в качестве вектора; SK-gRNA S1SPO11 расщепляли с помощью SalI и XbaI для создания фрагмента S1SPO11 sgRNA, SK-gRNA S1REC8 расщепляли с помощью NheI и BamHI для создания фрагмента S1REC8 sgRNA, и SK-gRNA S1MTL расщепляли с помощью BglII и KpnI для создания фрагмента S1MTL sgRNA, проводили одностадийную быструю полимеризацию gRNA с вышеуказанными 4; наконец, полимеризованный фрагмент gRNA S1OSD1-gRNA S1REC8-gRNA S1PAIR1-gRNA S1MTL расщепляли с помощью KpnI и BglII, и фрагменты были выделены и лигированы в бинарный вектор pC1300-Cas9, экспрессирующий белок Cas9 (между сайтами KpnI и BamHI), и наконец был получен вектор для мультигенного нокаута pC1300-Cas9-gRNA S1OSD1-gRNA S1REC8-gRNA S1SPO11-gRNA S1MTL, в котором четыре гена томата REC8, OSD1, SPO11 и MTL были одновременно нокаутированы и который использовали для трансгеноза с целью получения мультимутанта томата.

##### 3. Получение трансгенных растений.

Вектор для мультигенного нокаута томата, полученный на предыдущей стадии, переносили в штамм EHА105 *Agrobacterium tumefaciens* посредством электропорации, используя метод листового диска, и этот бинарный экспрессионный вектор переносили в каллус гибрида томата Elisa с помощью

трансформации, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*.

Семена томатов подвергали асептической обработке и высевали на среду 1/2 MS, культивировали в темноте в течение 2-3 суток, после прорастания культивировали при свете. Через 10-12 суток, когда семядоли проростков полностью развернулись, но настоящие листья не образовались, семядоли отбирали в качестве эксплантатов, два конца семядолей обрезали, среднюю часть делили на две горизонтально, и мелкие кусочки представляли собой листовые диски. Листовые диски инокулировали в среду для предварительного культивирования листьями вверх и предварительно культивировали в течение 2 суток. Предварительно культивированный семядольный листовой диск замачивали в приготовленном растворе бактерий *Agrobacterium tumefaciens*, который полностью просачивался в течение 5 мин, листовой диск должным образом промокали стерильной фильтровальной бумагой, обратной стороной листа вверх, культивировали в темноте в течение 48-72 ч при температуре культивирования 28°C. Листовые диски, совместно культивируемые с *Agrobacterium tumefaciens*, переносили в стерильную среду и культивировали на свету. Через 5 суток листовые диски переносили на среду для скрининга и переносили один раз в 14 суток. Когда устойчивая почка вырастала до примерно 2 см, ее срезали с эксплантата и переносили в среду для укоренения. После того как развилась корневая система, ее пересаживали в почву.

4. Идентификация четверных мутантов посредством секвенирования.

Метод СТАВ использовали для выделения геномной ДНК трансгенных томатов из одного растения и Hi-Tom использовали для идентификации мутации целевого гена (конкретные подробности можно найти CN 201710504178.3).

5. Идентификация растений томата с фиксированной ploидностью и генотипом в первом дочернем поколении.

1) Для растений первого дочернего поколения идентифицированных четверных мутантов томата использовали проточную цитометрию для скрининга клеточной ploидности, и получали растения, имеющие такую же клеточную ploидность, что и родительские растения.

Конкретный метод заключается в следующем.

Некоторое количество растительной ткани помещали в стеклянную чашку Петри, добавляли 1-2 мл буфера для лизиса растений LB01, измельчали ткань лезвием (эту операцию всегда выполняли на льду); аспирировали раствор для диссоциации из чашки Петри и фильтровали через 50 мкм нейлоновую сетку в центрифужную пробирку; центрифугировали при 1200 об/мин, 4°C в течение 5 мин; супернатант отбрасывали, добавляли 450 мкл LB01, который окрашивали 25 мкл предварительно охлажденного PI (1 мг/мл) и RNКазы (1 мг/мл) в течение 10 мин в темноте, тестировали на приборе для удаления диплоидных растений.

2) Секвенирование всего генома.

Отбирали листья двух родителей "Syi2-4" и "S28", гибрида томата Elisa и растений томатов первого дочернего поколения с фиксированной ploидностью и извлекали ДНК для секвенирования всего генома. Генотипы протестированных растений томата первого дочернего поколения соответствовали Elisa, и все они были гетерозиготными. С точки зрения молекулярной биологии было доказано, что генотипы полностью соответствовали гибридным материнским клеткам.

Кроме того, все векторы и реагенты, используемые в этом примере, включены в набор из данного примера.

Приведенное выше описание является лишь предпочтительным воплощением настоящего изобретения и не предназначено для ограничения настоящего изобретения, и различные модификации и изменения могут быть внесены в настоящее изобретение для специалистов в данной области техники. Любое изменение, эквивалентная замена, улучшение и тому подобное, в пределах сущности и объема настоящего изобретения, должны быть включены в объем правовой охраны настоящего изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ поддержания гетерозиса растений, включающий следующие стадии:

S1, трансформация мейоза половых клеток гибридов в подобие митоза путем использования технологии генных мутаций или генной инженерии с получением гамет, генотип и хромосомная ploидность которых соответствуют гибридам; и

S2, нокаут гена MTL путем использования технологии генной инженерии, чтобы индуцировать развитие гамет, генотип и хромосомная ploидность которых соответствуют гибридам, в семена или растения, где ген MTL кодирует белок MTL, представленный в SEQ ID NO: 29, или белок, имеющий по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с этим белком MTL;

где S1 включает редактирование белков, вовлеченных в мейоз растений для осуществления трансформации мейоза половых клеток в подобие митоза посредством использования технологии генных мутаций или генной инженерии, в результате которого белки, вовлеченные в мейоз, делают нефункциональными или нокаутируют; где белки включают первый белок, второй белок и третий белок, из которых первый белок представляет собой белок, вовлеченный в образование разрывов двухцепочечной

ДНК, и первый белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из

белка PAIR1, представленного в SEQ ID NO: 13, белка, имеющего по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR1;

белка PAIR2, представленного в SEQ ID NO: 14, белка, имеющего по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR2;

белка PAIR3, представленного в SEQ ID NO: 15, белка, имеющего по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PAIR3;

белка PRD1, представленного в SEQ ID NO: 16, белка, имеющего по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PRD1;

белка PRD2, представленного в SEQ ID NO: 17, белка, имеющего по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком PRD2;

белка SPO11-1, представленного в SEQ ID NO: 18, белка, имеющего по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SPO11-1;

белка SPO11-2, представленного в SEQ ID NO: 19, белка, имеющего по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SPO11-2;

белка SDS, представленного в SEQ ID NO: 20, белка, имеющего по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком SDS;

белка CRC1, представленного в SEQ ID NO: 21, белка, имеющего по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком CRC1;

белка P31<sup>comet</sup>, представленного в SEQ ID NO: 22, белка, имеющего по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком P31<sup>comet</sup>;

белка MTOPVIB, представленного в SEQ ID NO: 23, белка, имеющего по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком MTOPVIB;

белка DFO, представленного в SEQ ID NO: 24, белка, имеющего по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком DFO;

второй белок вовлечен в контроль адгезии между сестринскими хромосомами во время мейоза, и второй белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из

белка REC8, представленного в SEQ ID NO: 25, белка, имеющего по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком REC8;

третий белок вовлечен во второе деление мейоза, и третий белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из

белка OSD1, представленного в SEQ ID NO: 26, белка, имеющего по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком OSD1;

белка TAM, представленного в SEQ ID NO: 27, белка, имеющего по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком TAM;

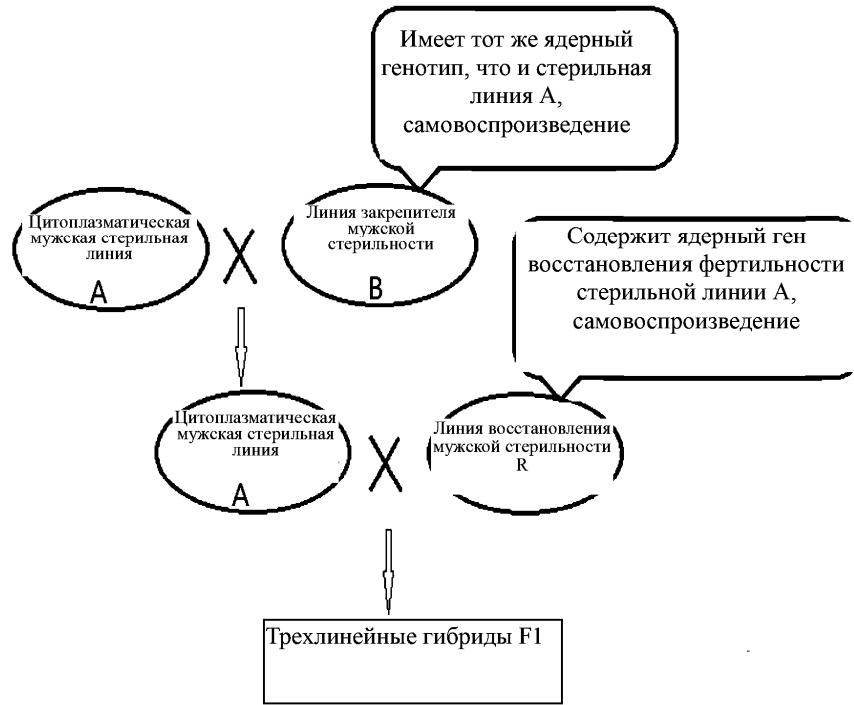
белка TDM1, представленного в SEQ ID NO: 28, белка, имеющего по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% идентичность последовательности с белком TDM1.

2. Способ по п.1, где S1 включает предоставление гибридных семян, трансформацию мейоза половых клеток гибридов в подобие митоза путем использования технологии генных мутаций или генной инженерии с получением гамет, генотип и хромосомная ploидность которых соответствуют гибридам.

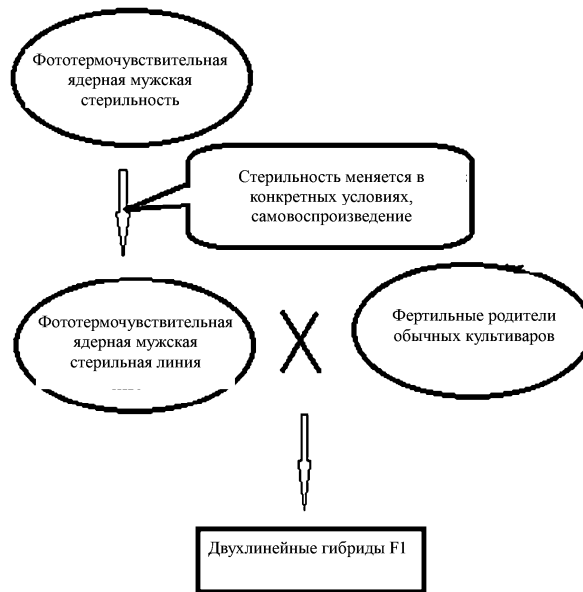
3. Способ по п.1, где S1 включает редактирование родителя гибридных семян путем использования технологии генных мутаций или генной инженерии и затем получение гибрида посредством межродительской гибридизации с получением гибридных гамет, где мейоз половых клеток трансформирован в подобие митоза.

4. Способ по п.1, где растения включают однодольные растения и двудольные растения.

5. Способ по п.1, где растения включают рис, кукурузу, сорго, просо, ячмень, пшеницу, рожь, овес, гречиху, семена бусенника, сахарный тростник, спаржу, побеги бамбука, лук туберозный, ямс, соевые бобы, картофель, горох, золотистую фасоль, фасоль адзуки, боб садовый, спаржевую вигну (*vigna sequipedalis*), фасоль обыкновенную, чечевицу пищевую, калопогон мукуновыи, нут, маниоку, сладкий картофель, рапс, хлопок, свеклу, баклажаны, арахис, чай, мяту, кофе, кунжут, подсолнечник, клещевину обыкновенную, семена периллы, сафлор, помидоры, перец, огурцы, китайскую листовую капусту, салат-латук, шпинат, чеснок, капусту огородную, горчицу сарептскую, цицанию водную, лук-батун, восковую тыкву (*benincasa hispida*), цуккини, люфу, китайскую капусту, редьку, лук, арбуз, виноград, морковь, цветную капусту, тыкву, табак, травостой, перистошестинник пурпурный Schumacher, перистошестинник лисохвостный, суданское сорго, орхидеи, лилии, тюльпаны и люцерну.

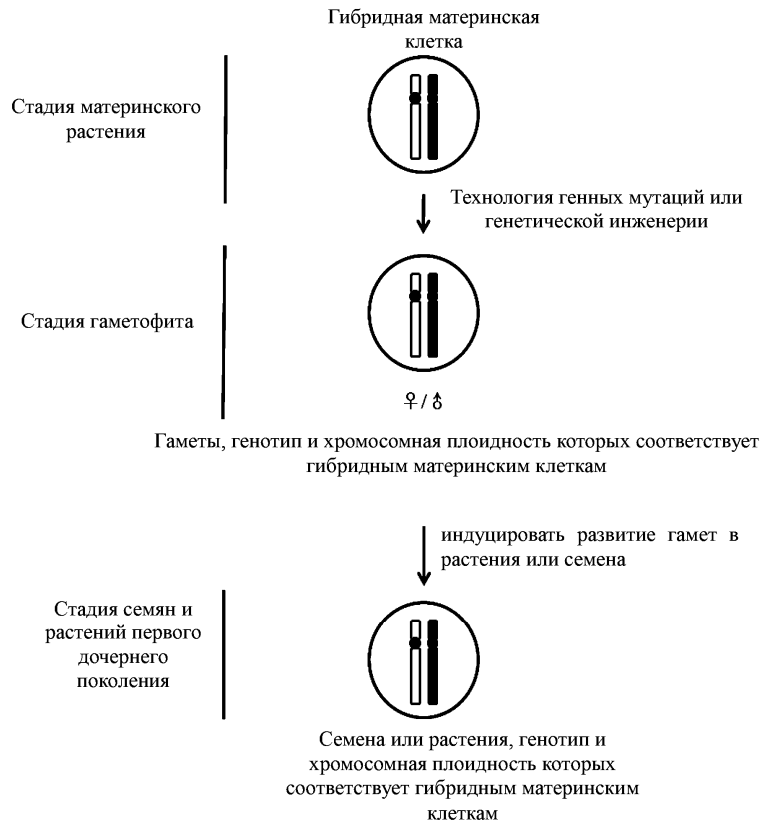


Фиг. 1А

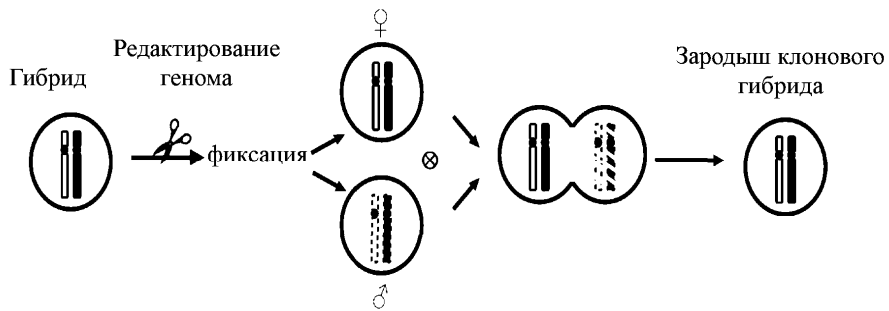


Фиг. 1Б

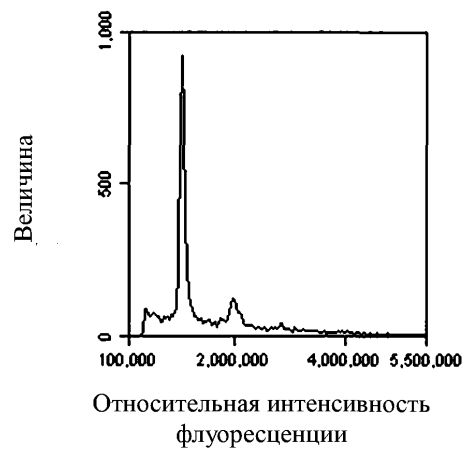




Фиг. 2



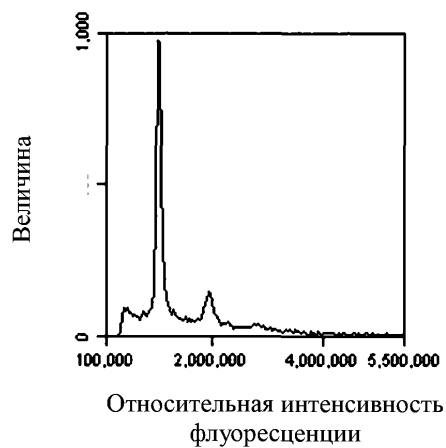
Фиг. 3



Chunyou84

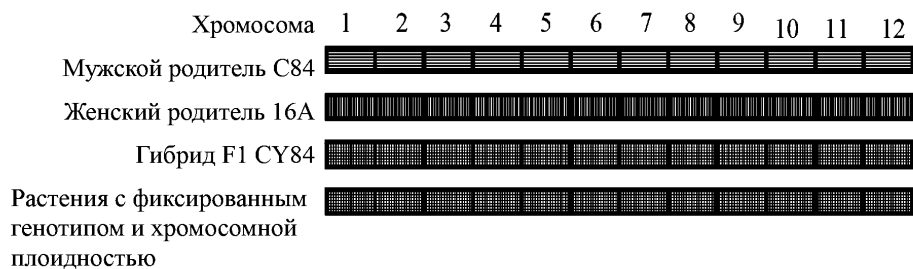
Фиг. 4А

048139



Растения с фиксированным  
генотипом и хромосомной  
плоидностью

Фиг. 4Б



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ  
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2