

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **032843**(13) **B9**

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

**(15)** Информация об исправлении  
**Версия исправления: 1 (W1 B1)**  
**исправления в формуле: п.7, 14**

**(51)** Int. Cl. *C12N 9/88* (2006.01)  
*C12N 15/82* (2006.01)

**(48)** Дата публикации исправления  
**2019.11.29, Бюллетень №11'2019**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2019.07.31**

**(21)** Номер заявки  
**201590662**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.09.25**

**(54) РАСТЕНИЯ SOLANUM LYCOPERSICUM, ИМЕЮЩИЕ НЕТРАНСГЕННЫЕ  
МОДИФИКАЦИИ В ГЕНЕ ACS4**

**(31)** 12186606.5

**(32)** 2012.09.28

**(33)** EP

**(43)** 2015.08.31

**(86)** PCT/EP2013/069985

**(87)** WO 2014/049002 2014.04.03

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**НУНХЕМС Б.В. (NL)**

**(72)** Изобретатель:  
**Вризен Виллем Хендрик (NL)**

**(74)** Представитель:  
**Беляева Е.Н., Беляев С.Б. (BY)**

**(56)** TSUCHISAKA ATSUNARI ET AL.: "A Combinatorial Interplay Among the 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Isoforms Regulates Ethylene Biosynthesis in Arabidopsis thaliana", GENETICS, vol. 183, no. 3, November 2009 (2009-11), pages 979-1003, XP002691844, ISSN: 0016-6731 page 981, line 30 - line 34; figure 1D page 995, left-hand column, paragraph 3

LINCOLN JAMES E. ET AL.: "LE-ACS4, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (Lycopersicon esculentum): Expression in Escherichia coli structural characterization, expression characteristics, and phylogenetic analysis", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 26, 1993, pages 19422-19430, XP002691845, ISSN: 0021-9258

WO 97/01952 A1

TARUN ALICE S. ET AL.: "Complementation analysis of mutants of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase reveals the enzyme is a dimer with shared active sites", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 20, 15 May 1998 (1998-05-15), pages 12509-12514, XP002691846, ISSN: 0021-9258

WO-A2-2005016504

WO-A2-2007044043

MINOIA SILVIA ET AL.: "A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology", BMC RESEARCH NOTES, BIOMED CENTRAL LTD, GB, vol. 3, no. 69, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 1-8, XP002682656, ISSN: 1756-0500

**(57)** Изобретение относится к культивируемому растению вида Solanum lycopersicum, содержащему аллель *acs4*, имеющий одну или более мутаций, где указанные мутации приводят к продуцированию мутантного белка *acs4* с утраченной функцией или с пониженной функцией по сравнению с белком *Acs4* дикого типа.

**B9****032843****032843****B9**

### Область, к которой относится настоящее изобретение

Изобретение относится к области биотехнологии растений и селекции растений. Рассматриваются растения *Solanum lycopersicum*, включающие аллель *acs4*, имеющий одну или более мутаций, которые приводят к продуцированию мутантного белка *acs4* с утраченной функцией белка *acs4* или с пониженной активностью по сравнению с белком *AcS4* дикого типа. Настоящее изобретение относится к плодам указанных растений, которые продуцируют этилен на более низком уровне и/или имеют более длительный срок хранения по сравнению с растениями *Solanum lycopersicum* дикого типа, являющимися гомозиготными по аллелю *AcS4*. Кроме того, настоящее изобретение относится к плодам, семенам, пыльце, органам и к потомству растений томата *Solanum lycopersicum* согласно изобретению. Настоящее изобретение также относится к кормам и к продуктам питания, включающим плоды растений согласно изобретению или состоящим из этих плодов.

Настоящее изобретение относится к эндогенному гену *acs4* и к белку *acs4*, кодируемому указанным геном, имеющим по меньшей мере одну нетрансгенную мутацию, индуцированную человеком.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к способам выращивания растений томата, включающих в своем геноме один или более аллелей *acs4*.

### Предпосылки создания изобретения

Целью разведения растений *Solanum lycopersicum* является выведение промышленных сортов растений, оптимально адаптированных к условиям их роста и хранения. Опытные селекционеры сталкиваются с проблемой достижения оптимального соотношения между сохранением крепости плодов после сбора урожая и требованиями потребителей к вкусу, качеству и цвету плодов. Удовлетворение таких требований потребителя в значительной степени зависят от созревания плодов. Созревание плодов - это сложный процесс развития, заключающийся в трансформации семясодержащего органа в ткань растения, привлекательную как для дистрибьютеров семян, так и для потребителей сельскохозяйственной продукции. Изменения, связанные с созревания плодов, в частности, размягчение плодов после сбора урожая, ограничивают срок хранения свежих томатов.

Что касается роста и развития плодов томата, то здесь можно выделить ряд последовательных стадий: развитие цветков, опыление, раннее развитие плода, которое характеризуется высокой частотой деления клеток и быстрым увеличением размера плода, обусловленным, главным образом, размножением клеток. По окончании третьей фазы, плод достигает стадии зеленой зрелости. Во время четвертой фазы происходит созревание плодов, которое характеризуется изменением их цвета и вкуса, а также приобретение этими плодами соответствующей упругости и консистенции.

Приобретение характерного для томата красного цвета обусловлено накоплением ликопина и каротина. Вообще говоря, различают несколько фаз появления окраски, таких как фаза зеленой, бурой, розовой и красной зрелости. На стадии побурения плода томата инициируется появление типичной красной пигментации. Стадия приобретения плодами красной спелости или покраснения уже собранных плодов представляет собой стадию, на которой большая часть плодов достигает цвета своей зрелости.

В период созревания плодов, ферментативная активность, помимо изменения цвета, приводит к деградации средней ламеллярной области клеточных стенок, что, в свою очередь, приводит к потере клеток, которое проявляется как размягчение и изменение структуры плода. Размягчение плодов часто определяют как внешнее сопротивление плода сжатию, которое может быть количественно измерено, например, с помощью пенетрометра.

Модификация отдельных генов, которые, как известно, ответственны за созревание плода, пока еще не позволяет получить плоды с нормальным созреванием и с минимальным размягчением их ткани.

Созревание и старение климактерических плодов, таких как томаты, стимулируются этиленом. Этилен является аутокатализатором своего собственного биосинтеза благодаря повышению активности 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота-(ACC)-синтазы (ACS) и ACC-оксидазы (ACO). ACS также называют 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-синтазой; Le-ACS; или S-аденозил-L-метионин-метилтио-аденозин-лиазой. Таким образом, увеличение количества ACS и ACO приводит к повышению уровня превращения L-метионина в этилен. В томатах было идентифицировано по меньшей мере восемь генов ACS (LEACS1A, LEACS1B и LEACS2-7) (Alexander et al., Journal of Experimental Botany, Vol. 53, No 377, pp 2039-2055, 2002), и каждый ген ACS имеет различные паттерны экспрессии.

ACC-синтаза (ACS) представляет собой фермент, который катализирует синтез 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (ACC) из S-аденозилметионина. Затем происходит превращение ACC в этилен, катализируемое ACO. Биосинтез этилена описан, например, в публикации Stearns и Glick (Biotechnology Advances 2003, vol. 21 pp. 193-210), которая вводится в настоящее описание посредством ссылки.

ACS принадлежит к а-семейству пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимых ферментов и имеет небольшое сходство с другими членами этого семейства, такими как аспартат-аминотрансфераза (AATaза) и тирозин-аминотрансфераза (TATaза). Структура ACS, происходящей от различных источников, была описана Capitani et al. При выравнивании последовательности из восьми белков ACS (*Malus domestica*, *Phaseolus aureus*, *Solanum tuberosum*, *Pelargonium hortorum*, *Nicotiana tabacum*, *Cucumis melo*, *Lycopersicon esculentum* и *Brassica oleracea*) были описаны консервативные области, которые на фигуре 1 указан-

ной публикации Capitani показаны красным и желтым цветом. Было определено три домена: один крупный домен, простирающийся от остатка 52 до остатка 318, и два небольших домена, простирающихся от остатка 20 до остатка 49 и от остатка 333 до остатка 430. Спираль  $\alpha 12$  определена как спираль, соединяющая крупный домен и второй небольшой домен (Capitani et al., *Journal of Molecular Biology*, 1999, vol. 294, pp 745-756).

Было высказано предположение, что в климактерических растениях, регулирующих продуцирование этилена, действуют две системы. Первая система действует во время нормального вегетативного роста растений (система 1) и представляет собой самоподавляющуюся систему, ответственную за продуцирование этилена на базальных уровнях, который обнаруживается во всех тканях, в том числе и в тканях климактерических растений. Система 1 действует на протяжении всего периода развития плода вплоть до его перехода в стадию созревания. Затем наступает переходный период, когда активируются LEACS1A и LEACS4, в результате чего уровень этилена повышается. Такое повышение уровня этилена индуцирует экспрессию LEACS2, запускающую систему 2, которая является активной в период созревания плодов климактерических растений. В системе 2, продуцирование этилена является аутокаталитическим. Эта сложная система регуляции продуцирования этилена была изучена посредством антисмыслового ингибирования LEACS2 в трансгенных растениях (Bargy et al., *Plant Physiology* vol. 123, pp 979-986, 2000).

В заявке WO2005/016504 описаны растения, которые "остаются зелеными", то есть, растения, фенотип которых характеризуется замедленным увяданием листьев по сравнению с обычными растениями. В указанной заявке рассматриваются растения с дизрупцией генов ACS2, ACS6, ACS7 генов, которая приводит к ингибированию экспрессии или активности указанного ACS.

Yokotani и сотрудниками были описаны трансгенные томаты со всеми известными генами LeEIL (генами резистентности к этилену), которые были подвергнуты ингибированию в целях изучения регуляторных механизмов биосинтеза этилена (Yokotani et al, *Journal of Experimental Botany*, vol. 60, pp 3433-3442, 2009).

Таким образом, существует необходимость в выращивании растений томата с модифицированным механизмом продуцирования этилена, где указанные растения имеют замедленное созревание и/или более длительный срок хранения плодов сравнению с растениями томата дикого типа.

Описание сущности изобретения Таким образом, целью настоящего изобретения является выращивание и идентификация культивируемых растений вида *Solanum lycopersicum*, дающих плоды с замедленным созреванием и/или с более длительным сроком хранения.

Настоящее изобретение также относится к культивируемому растению вида *Solanum lycopersicum*, включающему аллель *acs4*, имеющий одну или более мутаций, где указанные мутации приводят к продуцированию мутантного белка *acs4*, который не обладает функцией белка *acs4* или имеет пониженную активность по сравнению с белком *Acs4* дикого типа, но который имеет функцию, достаточную для созревания плодов томатов до стадии покраснения, если мутантный аллель присутствует в гетерозиготной или гомозиготной форме.

### Общие определения

Термин "последовательность нуклеиновой кислоты" (или молекулы нуклеиновой кислоты) означает молекулу ДНК или РНК в одноцепочечной или двухцепочечной форме, а в частности ДНК, кодирующую белок или фрагмент белка согласно изобретению. Термин "выделенная последовательность нуклеиновой кислоты" означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая уже не находится в своей природной среде, из которой она была выделена, например, в последовательности нуклеиновой кислоты в бактериальной клетке-хозяине или в геноме ядра или пластиды растения.

Используемые здесь термины "белок" или "полипептид" являются синонимами и означают молекулы, состоящие из цепи аминокислот, независимо от конкретного механизма их действия, размера, 3-мерной структуры или происхождения. Таким образом, используемые здесь термины "фрагмент" или "часть" белка *Acs4* могут также означать просто "белок". Используемый здесь термин "выделенный белок" означает белок, который больше не находится в своей природной среде, например, *in vitro* или в рекомбинантной бактериальной или растительной клетке-хозяине.

Термин "ген" означает последовательность ДНК, содержащую область (транскрибируемую область), которая транскрибируется в молекулу РНК (например, в молекулу мРНК или интерферирующую РНК (РНКи)) в клетке, функционально присоединенную к подходящим регуляторным областям (например, промотору). Таким образом, ген может содержать несколько функционально присоединенных последовательностей, таких как промотор; 5'-лидерная последовательность, включающая, например, последовательности, участвующие в инициации трансляции; (белок)-кодирующая область (кДНК или геномная ДНК); и 3'-нетранслируемая последовательность, содержащая, например, сайты терминирования транскрипции. Ген может представлять собой эндогенный ген (природный ген данного вида) или химерный ген (например, трансген или цис-ген).

Термин "экспрессия гена" означает процесс, в котором ДНК-область, функционально присоединенная к соответствующим регуляторным областям, а в частности, к промотору, транскрибируется в РНК, которая является биологически активной, то есть, способной транслироваться в биологически активный

белок или пептид (или активный пептидный фрагмент), либо обладает собственной активностью (например, способностью к посттранскрипционному сайленсингу генов или к РНК-интерференции). Кодированная последовательность может иметь смысловую ориентацию и кодирует нужный биологически активный белок или пептид или активный пептидный фрагмент.

Термин "активный белок" или "функциональный белок" означает белок, который обладает активностью, измеряемой *in vitro*, например, с помощью анализа на активность *in vitro*, и/или *in vivo*, например, по фенотипу, сообщаемому данным белком. Белок "дикого типа" представляет собой полностью функциональный белок, присутствующий в растении дикого типа. Используемый здесь термин "мутантный белок" означает белок, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей одну или более мутаций (в мутантной молекуле нуклеиновой кислоты), которые приводят к "снижению функций" или к "утрате функций" белка, например, как может быть измерено *in vivo*, например по фенотипу, сообщаемому мутантным аллелем.

Термин "белок *acs4* с пониженной функцией" или "белок *acs4* с пониженной активностью" означает мутантный белок *acs4*, который имеет пониженную каталитическую активность в синтезе АСС из S-аденозилметионина, что приводит к снижению уровня синтеза этилена по сравнению с белком *Acs4c* дикого типа. Указанная пониженная каталитическая активность белка *acs4*, включая пониженную функцию белка *acs4*, влияет на процесс созревания плодов, если аллель, кодирующий мутантный белок, присутствует в растении томата в гомозиготной или гетерозиготной форме, то есть, замедляет созревание плодов и/или продлевает срок хранения плодов. Такое снижение функции белка *acs4* может быть достигнуто путем транскрипции и трансляции "мутантного аллеля, частично дефицитного по *acs4*", который, например, представляет собой аллель *acs4* дикого типа, содержащий одну или более мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты. В одном из аспектов изобретения, такой мутантный аллель, частично дефицитный по *acs4*, представляет собой аллель *acs4* дикого типа, содержащий одну или более мутаций, которые, предпочтительно, способствуют продуцированию белка *Acs4*, где по меньшей мере одна консервативная и/или функциональная аминокислота заменена другой аминокислотой так, чтобы биологическая активность была значительно снижена, но не полностью элиминирована. Однако другие мутации, такие как одна или более мутаций, а именно, нонсенс-мутация, миссенс-мутация, мутация сайта сплайсинга или мутация со сдвигом рамки считывания в аллеле *Acs4* томатов могут также приводить к снижению функции белка *acs4*, и такие белки с пониженными функциями могут иметь замены, инсерции или делеции одной или более аминокислот по сравнению с аминокислотами белка *ACS4* дикого типа. Такой мутантный аллель, частично дефицитный по *acs4*, может также кодировать доминантно негативный белок *acs4*, способный негативно влиять на биологическую активность других белков *Acs4* в той же самой клетке. Указанный доминантно негативный белок *acs4* может представлять собой белок *acs4*, который еще способен взаимодействовать с такими же элементами, как и белок *Acs4* дикого типа, но у которого заблокированы некоторые его функции. Примерами доминантно негативных белков *acs4* являются белки *acs4*, у которых отсутствуют специфические аминокислотные остатки, играющие важную роль в его активации, или имеются модификации в этих остатках, но которые еще содержат свои связывающие домены, в результате чего снижается или утрачивается не только их собственная биологическая активность, но также снижается общая активность *acs4* в клетках, благодаря конкуренции этих белков за сайты связывания с белками дикого типа и/или с присутствующими в клетке белками, частично дефицитными по *acs4*. Мутантными аллелями могут быть либо "природные мутантные" аллели, которые представляют собой мутантные аллели, встречающиеся в природе (например, продуцируемые спонтанно без введения мутагенов человеком), либо "индуцированные мутантные" аллели, которые были продуцированы человеком, например, путем мутагенеза.

Термин "белок *acs4* с утраченной функцией" означает мутантный белок *acs4*, который, по сравнению с белком *Acs4* дикого типа, по существу, не обладает какой-либо каталитической активностью при синтезе АСС из S-аденозилметионина по сравнению с белком *acs4* дикого типа, что приводит к снижению уровня синтеза этилена. Такое отсутствие каталитической активности при синтезе влияет на характер созревания плодов, содержащих такой белок *acs4* с утраченной функцией, если аллель, кодирующий мутантный белок, присутствует в растении томата в гомозиготной или гетерозиготной форме. Плоды растений томата, гомозиготных по такому "белку *acs4* с утраченной функцией", еще могут продуцировать этилен, катализируемый другими белками (например, другими белками *Acs*, такими как *Acs1A*). В результате этого, плоды растений томата, гомозиготных по такому "белку *acs4* с утраченной функцией", все еще могут созревать, но такое созревание может быть замедленным и/или срок хранения плодов таких растений может увеличиваться.

Термин "мутация" в молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, означает модификацию одного или более нуклеотидов по сравнению с последовательностью дикого типа, например, замену, делецию или инсерцию одного или более нуклеотидов. Термин "точечная мутация" означает замену одного нуклеотида, или инсерцию или делецию одного нуклеотида.

Термин "нонсенс"-мутация означает (точечную) мутацию в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, в которой кодон заменен стоп-кодоном. Такая мутация приводит к преждевременному прекращению трансляции под действием указанного стоп-кодона, присутствующего в

мРНК, и к усечению белка. Усеченный белок может иметь пониженную функцию или вообще не иметь такой функции.

Термин "миссенс"-мутация или несинонимичная мутация означает (точковую) мутацию в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, в которой кодон заменен кодоном, кодирующим другую аминокислоту. Полученный белок может иметь пониженную функцию или вообще не иметь такой функции.

Термин мутация "сайта сплайсинга" означает мутацию в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, где указанная мутация приводит к изменению РНК-сплайсинга пре-мРНК, в результате чего мРНК приобретает другую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, имеющий другую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности дикого типа. Полученный белок может иметь пониженную функцию или вообще не иметь такой функции.

Термин "мутация со сдвигом рамки считывания" означает мутацию в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, где такая мутация приводит к сдвигу рамки считывания мРНК и к образованию другой аминокислотной последовательности. Полученный белок может иметь пониженную функцию или вообще не иметь такой функции.

Мутация в регуляторной последовательности, например, в промоторе гена, означает модификацию одного или более нуклеотидов по сравнению с последовательностью дикого типа, например, посредством замены, делеции или инсерции одного или более нуклеотидов, приводящей, например, к снижению уровня транскрипта мРНК гена или к его элиминации.

Термин "сайленсинг" означает подавление или полное ингибирование экспрессии гена-мишени или семейства таких генов.

Термин "ген-мишень" в методах сайленсинга генов означает ген или семейство генов (или один или более специфических аллелей гена), где экспрессия эндогенного гена подавляется или полностью ингибируется (прекращается), если экспрессируется химерный молчащий ген (или "химерный ген РНКи), что приводит, например, к продуцированию РНК-транскрипта, ответственного за сайленсинг (например, к образованию дцРНК или шпилечной РНК, способных подавлять экспрессию эндогенного гена-мишени). В способах мутагенеза, ген-мишень представляет собой эндогенный ген, который может подвергаться мутации, приводящей к изменению (снижению или прекращению) экспрессии генов или к изменению (снижению или утрате) функции кодируемого белка.

Используемый здесь термин "функционально присоединенный" относится к связыванию полинуклеотидных элементов в функционально приемлемой ориентации. Нуклеиновая кислота является "функционально присоединенной", если она находится в функционально приемлемой ориентации по отношению к другой последовательности нуклеиновой кислоты. Так, например, промотор или точнее последовательность регуляции транскрипции функционально присоединена к кодирующей последовательности, если она влияет на транскрипцию кодирующей последовательности. Термин "функционально присоединенный" означает, что связанные последовательности ДНК, как правило, являются непрерывными и, если необходимо соединить кодирующие области двух белков, то эти последовательности должны быть непрерывными и должны сохранять одну и ту же рамку считывания, так, чтобы образовывался "химерный белок". Термины "химерный белок" или "гибридный белок" означают белок, состоящий из различных "доменов" (или мотивов) белка, которые как таковые не встречаются в природе, но были соединены друг с другом для создания функционального белка, который обладает функциями присоединенных доменов. Химерным белком может быть также гибридный белок, состоящий из двух или более белков, встречающихся в природе.

Термин "пищевой продукт" означает любое вещество, необходимое для обеспечения жизнедеятельности организма. Пищевой продукт обычно бывает растительного или животного происхождения и содержит необходимые питательные вещества, такие как углеводы, жиры, белки, витамины или минералы. Такое вещество, при его введении в организм, усваивается клетками организма и способствует выработке энергии, поддержанию жизнедеятельности или стимуляции роста этого организма. Термин "пищевой продукт" означает любое вещество, необходимое для обеспечения жизнедеятельности организма человека и животного.

Термин "срок годности" или "срок хранения после сбора урожая" означает (средний) период времени, по прошествии которого плоды становятся непригодными для продажи или потребления (то есть, "портятся"). "Срок хранения" означает период времени, в течение которого эти продукты могут храниться, и в течение которого определенные качества конкретной части этих продуктов поддерживаются на приемлемом уровне при ожидаемых условиях распределения, хранения и продажи. Срок годности зависит от нескольких факторов: воздействия света и тепла, пропускания газов (включая влажность), механического напряжения и загрязнения примесями, такими как микроорганизмы. Качество продукции часто математически моделируется с учетом таких параметров, как упругость/мягкость плодов. Срок годности может быть определен как (средний) период времени, по прошествии которого плоды данной линии растения портятся и становятся не пригодными для продажи или потребления, и отсчитывается, например, начиная со времени вступления первого плода растения в стадию побурения или в стадию появле-

ния бурого цвета, либо с первого полностью покрасневшего плода или уже снятого плода. В одном из вариантов осуществления изобретения, мутанты согласно изобретению имеют значительно более длительный срок годности, чем срок годности растений дикого типа, например, большее число дней от того момента, когда первый плод достигает стадии побурения (или стадии появления бурого, розового или красного цвета или после сбора урожая) до того момента, когда первый плод начинает "портиться" и становится непригодным для продажи или потребления, например, значительно более длительный срок годности, например, по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более дней превышающий срок годности плодов контрольных растений (например, Acs4/Acs4-растений дикого типа), если эти растения выращиваются в одних и тех же условиях, а плоды обрабатываются тем же самым способом и хранятся в одних и тех же условиях. Таким образом, для определения количества дней, прошедших от определенной стадии (например, от стадии побурения или последующей стадии) до состояния "испорченности", определяют день, когда первый плод контрольного растения дикого типа (выращенного в тех же самых условиях и до той же самой стадии развития, как и мутантное растение) достигает определенной стадии (например, стадии побурения или последующей стадии), и этот день может быть взят, например, за начальную точку отсчета (день 1), от которой начинается периодическое наблюдение за плодами (через определенные интервалы времени, например через 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней) вплоть до дня, когда первый плод достигает стадии полного покраснения и становится "испорченным" (как может быть определено визуально и/или путем оценки мягкости плода).

В настоящей заявке, слова "улучшенный", "повышенный", "более длительный" и "продолжительный", если они употребляются в сочетании со словом "срок хранения", являются синонимами и означают, что все плоды томата согласно изобретению имеют в среднем более длительный срок хранения, чем контрольные плоды (плоды Acs4/Acs4-растения).

Термин "задержка созревания" означает, что для достижения стадии покраснения от стадии зеленой зрелости, стадии побурения, стадии появления бурого цвета и/или стадии розового цвета, плодам растения томата или линии растения томата (например, мутантного растения) согласно изобретению требуется в среднем значительно больше дней, чем плодам контрольных растений дикого типа, гомозиготных по аллелю Acs4 дикого типа (Acs4/Acs4). Задержка созревания плодов растения и/или плодов растения после сбора урожая может быть определена как число дней, необходимых для достижения стадии покраснения у определенного процента плодов (например, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и/или 100% плодов). Говорят, что растение имеет фенотип задержки созревания, если 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и/или 100% плодов этих растений достигают стадии покраснения по меньшей мере на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дней позже, чем это требуется для такого же процента плодов контрольных растений дикого типа. Очевидно, что каждая комбинация вышеприведенного числа дней (то есть, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дней) с каждой процентной величиной (%) плодов, достигших стадии покраснения (то есть, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и/или 100%) входит в объем варианта настоящего изобретения, относящихся к задержке созревания, определяемой у растения и после сбора урожая. Так, например, покраснение 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и/или 100% плодов может достигаться по меньшей мере на 2 дня позже, чем это требуется для такого же процента плодов контрольного растения дикого типа. В другом примере, задержка созревания плодов растения и/или плодов после сбора урожая определяется как покраснение 100% плодов, которое происходит по меньшей мере на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дней позже, чем это требуется для такого же процента плодов контрольного растения дикого типа. День, когда первый плод контрольного растения дикого типа (выращенного в тех же самых условиях и до той же самой стадии развития, как и мутантное растение) достигает определенной стадии (например, стадии побурения), может быть определен, например, как начальная точка (день 1), от которой начинается период наблюдения плодов (через определенные интервалы времени, например через 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней), после чего, количество плодов, которые находятся в стадии побурения и покраснения, подсчитывается как для мутантной линии растения, так и для контрольных растений (см. примеры).

Используемый здесь термин "снижение уровня продуцирования этилена" означает статистически значимое уменьшение количества этилена, продуцируемого плодами томата согласно изобретению (по сравнению с Acs4/Acs4-плодами дикого типа) в период созревания плодов, например, на стадии приобретения розового и/или светло-красного цвета, и/или на стадии покраснения, как описано в примерах, и как может быть оценено путем измерения уровня продуцирования этилена в реальном времени. В одном из вариантов осуществления изобретения, уровни продуцирования этилена значительно снижаются в процессе созревания плодов от стадии приобретения розового цвета до стадии покраснения.

Очевидно, что сравнение различных линий растений включает выращивание ряда линий растений (например, по меньшей мере 5 растений, а предпочтительно по меньшей мере 10 растений каждой линии) в тех же условиях, в которых выращивают растения одного или более контрольных линий (предпочтительно, растений дикого типа) и определение статистически значимых различий между линиями растений, культивируемых в одних и тех же условиях окружающей среды.

Термин "задержка наступления стадии побурения" относится к мутантам согласно изобретению, которым, для достижения стадии побурения первых плодов и/или для всех плодов требуется значительно больше дней, например, по меньшей мере на 1 день, а предпочтительно по меньшей мере на 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней больше, чем плодам контрольного растения дикого типа, культивированного в тех же самых условиях.

"Стадии созревания" плодов томата можно разделить на следующие стадии: (1) стадию зеленой зрелости: поверхность полностью зеленый цвет; а оттенок зеленого цвета может варьироваться от светлого до темного; (2) стадию побурения: не более чем 10% поверхности имеет цвет, варьирующийся от зеленого до коричневатого-желтого, розового или красного; (3) стадию появления бурого цвета: от 10 до 30% поверхности не имеет зеленого цвета и, в целом, ее цвет варьируется от зеленого до коричневатого-желтого, розового или красного цвета или их комбинации; (4) стадию приобретения розового цвета: от 30 до 60% поверхности не имеет зеленого цвета и, в целом, она имеет розовый или красный цвет; (5) стадию приобретения светло-красного цвета: от 60 до 90% поверхности не имеет зеленого цвета, и, в целом, она имеет розовато-красный или красный цвет; (6) стадию покраснения: более 90% поверхности не имеет зеленого цвета и, в целом, она имеет красный цвет.

"Идентичность последовательностей" и "сходство последовательностей" могут быть определены путем выравнивания двух пептидных или двух нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритмов общего или локального выравнивания. Затем эти последовательности могут быть определены как "по существу идентичные" или "по существу аналогичные", если они, при оптимальном выравнивании с помощью, например, программ GAP или BESTFIT или встроенной программы "Needle" (с использованием параметров по умолчанию, см. ниже), имеют по меньшей мере некоторый минимальный процент идентичности (как определено ниже). В этих программах используется общий алгоритм выравнивания Нидлмана и Вюнша, применяемый для выравнивания двух последовательностей по всей их длине, для максимизации числа соответствий и минимизации числа пробелов. Вообще говоря, используемыми параметрами по умолчанию являются: "штраф" на введение пробела = 10 и "штраф" на пробел-удлинение = 0,5 (оба они применяются для выравнивания нуклеотидных последовательностей и последовательностей белка). Для выравнивания нуклеотидов, используемой оценочной матрицей по умолчанию является DNAFULL, а для выравнивания белков, используемой оценочной матрицей по умолчанию является Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 10915-10919). Выравнивание последовательностей и оценка процента идентичности, могут быть, например, осуществлены с использованием компьютерных программ, таких как EMBOSS ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)). Альтернативно, сходство или идентичность последовательностей могут быть определены путем поиска в базах данных, таких как FASTA, BLAST и т.п., в результате чего должны быть выявлены последовательности с наибольшим сходством, и эти последовательности должны быть подвергнуты попарному выравниванию для сравнения идентичности последовательностей. Два белка или два домена белка или две последовательности нуклеиновой кислоты являются, "по существу, идентичными", если процент идентичности этих последовательностей составляет по меньшей мере 90, 95, 98, 99% или более (как может быть определено с помощью программы Emboss "Needle" с использованием параметров по умолчанию, то есть, "штрафа" на введение пробела = 10 и "штрафа" на пробел-удлинение = 0,5 и с использованием оценочной матрицы DNAFULL для нуклеиновых кислот и Blosum62 для белков). Такие последовательности также называются здесь "вариантами"; так, например, могут быть идентифицированы другие варианты белков с мутантными аллелями *acs4* и мутантных белков *acs4*, которые имеют последовательности, отличающиеся от конкретных последовательностей нуклеиновых кислот и белков, описанных в настоящей заявке, и которые обладают одинаковым действием с точки зрения задержки созревания и/или увеличения срока хранения плодов, содержащих такие варианты.

Выравнивание пяти аминокислотных последовательностей, проиллюстрированное на фиг. 1 в работе Capitani et al. (Journal of Molecular Biology, 1999, vol. 194, pp. 745-756) (Cucumis melo Accession Q42668, Pelargonium hortorum Accession Q43810, Brassica oleracea Accession Q43747, Phaseolus aureus Accession Q41688 и Solanum tuberosum Accession Q43166), с аминокислотной последовательностью ACS4 растения Solanum lycopersicum дикого типа, представленной в SEQ ID NO 1 (Le-ACS4), продемонстрировано на фиг. 1 данной заявки. При таком выравнивании, проиллюстрированном на фиг. 1, было выявлено, что консервативные аминокислоты, показанные желтым и красным цветом на фиг. 1 в работе Capitani et al., также являются консервативными в аминокислотной последовательности ACS4 растения Solanum lycopersicum дикого типа. Следует отметить, что нумерация аминокислот на фиг. 1 настоящей заявки, не соответствует нумерации аминокислот на фиг. 1 в работе Capitani et al.

Термин "крупный домен" ACS4 означает аминокислотные остатки от аминокислоты 65 до аминокислоты 327 последовательности SEQ ID NO: 1 (см. также фиг. 4). Термин "небольшие домены" ACS4 означает аминокислотные остатки 33-62 (см. фиг. 4) и/или аминокислоты от 339 до 438 SEQ последовательности ID NO: 1 (см. фиг. 4) настоящей заявки. Каталитический центр ACS4, очевидно, присутствует в "крупном домене".

В настоящей заявке и в формуле изобретения, глагол "включать" и его спрягаемые формы употребляются в своем неограничивающем смысле и означают, что данный объект включает элементы, перечисленные за этим глаголом, но это не означает, что данный объект не может включать другие, не упомянутые здесь, элементы. Кроме того, употребление существительного с неопределенным артиклем "a" или "an", означающего какой-либо элемент, не исключает возможности наличия более, чем одного эле-

мента, если это явно не противоречит контексту изобретения, в котором подразумевается присутствие одного и только одного элемента. Таким образом, существительное, употребляемое с неопределенным артиклем "a" или "an", обычно означает "по меньшей мере один". При этом следует отметить, что в настоящей заявке, слово "последовательность", обычно, означает фактические физические молекулы, включающие субъединицы (например, аминокислоты), расположенные в определенной последовательности.

Используемый здесь термин "растение" охватывает как целые растения, так и любые его части или дериваты, такие как органы растений (например, собранные или несобранные плоды, цветки, листья и т.п.), растительные клетки, протопласты растений, растительные клетки или тканевые культуры, из которых могут быть регенерированы целые растения; регенерируемые или нерегенерируемые растительные клетки, каллусы растений, скопления клеток растений и растительные клетки, которые являются интактными в растениях, или части растений, такие как эмбрионы, пыльца, семязачатки, завязи, плоды (например, собранные ткани или органы, такие как собранные помидоры или их части, цветки, листья, семена, клубни, вегетативно размноженные растения, корни, стебли, семядоли, гипокотили, кончики корней и т.п. Этот термин также охватывает растения на любой стадии развития, такие как рассада, незрелые и зрелые растения и т.п.

Термин "линия растения" или "линия селекции" означает растение и его потомство. Используемый здесь термин "инбредная линия" означает линию растения, которая уже неоднократно подвергалась самоопылению.

Термин "сорт растения" означает группу растений, входящую в одну и ту же известную ботаническую таксономическую единицу низшего ранга, которая (независимо от того, будут ли выполняться условия, необходимые для признания прав селекционеров) может быть определена исходя из экспрессии признаков, характерных для определенного генотипа или комбинации генотипов; может быть дифференцирована от любой другой группы растений по экспрессии по меньшей мере одного из этих признаков; и может рассматриваться как один целостный признак, поскольку он может передаваться из поколения в поколение без каких-либо изменений. Поэтому, термин "сорт растений" не может быть использован для обозначения группы растений, даже когда они принадлежат к одному и тому же виду, если все они характеризуются присутствием 1 локуса или гена (или ряда фенотипических признаков, обусловленных присутствием одного этого локуса или гена), но, в отношении остальных локусов или генов, они могут сильно отличаться друг от друга.

"F1, F2 и т.п." означают последующие родственные поколения, образованные в результате скрещивания двух родительских растений родительских линий. Растения, выращенные из семян, полученных в результате скрещивания двух растений или линий, называются поколением F1. Самоопыление растений F1 приводит к образованию поколения F2 и т.п. "Гибридное растение F1" (или семена F1) представляет собой поколение, полученное после скрещивания двух инбредных родительских линий. Термин "популяция M1" означает совокупность мутагенизированных семян/растений некоторых линий или сортов. "M2, M3, M4 и т.п." означают последующие поколения, полученные после самоопыления первого мутагенизированного семени/растения (M1).

Термин "аллель(и)" означает любую одну или более альтернативных форм гена в конкретном локусе, и все аллели этих генов относятся к одному признаку или свойству в конкретном локусе. В диплоидной клетке организма, аллели данного гена расположены в определенном положении или в локусе (во множестве локусов) на хромосоме. Один аллель присутствует на каждой хромосоме пары гомологичных хромосом. Виды диплоидных растений могут включать большое число различных аллелей в определенном локусе. Эти аллели могут представлять собой идентичные (гомозиготные) аллели гена, либо они могут представлять собой два различных (гетерозиготных) аллеля.

Термин "локус" (множество локусов) означает конкретное положение или положения или сайт на хромосоме, где присутствует, например, ген или генетический маркер. Таким образом, локус ACS4 локализован в геноме, где присутствует ген ACS4.

Используемый здесь термин "аллель дикого типа" (WT) означает вариант гена, кодирующего полностью функциональный белок (белок дикого типа). Такой последовательностью, кодирующей полностью функциональный белок Acs4, является, например, последовательность кДНК (мРНК) Acs4 дикого типа, представленная в SEQ ID NO: 8 и имеющаяся в базе данных Genbank под рег. № M63490.1, или геномная последовательность Acs4 дикого типа, представленная в SEQ ID NO: 15. Последовательность белка, кодируемого этой мРНК Acs4 дикого типа, представлена в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 15. Эта последовательность состоит из 476 аминокислот. В вышеупомянутом белке Acs4 присутствуют три домена, то есть, первый небольшой домен, простирающийся от аминокислоты 33 до аминокислоты 62 последовательности SEQ ID NO: 1; "крупный домен", который, предположительно, содержит каталитический центр белка (простирающийся от аминокислоты 65 до аминокислоты 327 последовательности SEQ ID NO: 1), и второй небольшой домен, простирающийся от аминокислоты 339 до аминокислоты 438 последовательности SEQ ID NO: 1 (см. фиг. 4). Другие аллели, кодирующие полностью функциональный белок Acs4 (то есть, аллели, которые ответственны за созревание и продуцирование этилена в той же степени, как и белок SEQ ID NO: 1), могут присутствовать и в других растениях *Solanum lycopersicum* и

могут содержать последовательность, по существу, идентичную последовательности SEQ ID NO: 1, то есть, приблизительно по меньшей мере на 90, 95, 98, 99, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1. Такие полностью функциональные белки Acs4 дикого типа называются здесь "вариантами" SEQ ID NO: 1. Аналогичным образом, нуклеотидные последовательности, кодирующие такие полностью функциональные белки Acs4, называются здесь вариантами SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 15.

Описанные ниже мутантные аллели *acs4* представляют собой репрезентативные аллели, имеющие мутации *acs4*, сообщающие пониженный уровень продуцирования этилена и/или задержку созревания и/или более длительный срок хранения, и эти аллели были идентифицированы в соответствии с настоящим изобретением. Следует отметить, что описанные здесь нуклеотидные последовательности (SEQ ID NO: 8-14) представляют собой кДНК, то есть, последовательности ДНК, кодирующие белки SEQ ID NO: 1-7. Следует отметить, что при упоминании этих нуклеотидных последовательностей кДНК подразумевается, что кДНК представляет собой кодирующую область соответствующей геномной последовательности *acs4* *Solanum lycopersicum*, которая дополнительно содержит интроны, а поэтому их нуклеотиды имеют разную нумерацию. Таким образом, если речь идет о растении томата, включающего последовательность *acs4*, соответствующую любой из SEQ ID NO: 8-14, то подразумевается, что это растение томата содержит геномную последовательность *acs4*, включающую кодирующую ДНК (кДНК), из которой транскрибируется мРНК SEQ ID NO: 8-14 (и которая, в свою очередь, транслируется в белок). мРНК имеет такую же нуклеотидную последовательность, как и кДНК, за исключением того, что в мРНК вместо тимина (t) присутствует урацил (u). Кроме того, если речь идет о растении томата, включающем нуклеотидную последовательность, кодирующую белок согласно изобретению (такой как мутантный белок SEQ ID NO: 2-7 или другой мутант), то подразумевается, что это растение содержит другие нуклеотидные последовательности, что обусловлено вырожденностью генетического кода. В одном из вариантов осуществления изобретения, растение содержит геномную последовательность *Acs4*, представленную в SEQ ID NO: 15, или геномную последовательность *Acs4*, по существу, идентичную этой последовательности (например, приблизительно по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7% идентичную последовательности SEQ ID NO: 15), но имеющую одну или более мутаций, а в частности, мутации в экзонах указанной геномной последовательности (где экзон 1 простирается от нуклеотида 1 до нуклеотида 318; экзон 2 простирается от нуклеотида 796 до нуклеотида 955, а экзон 3 простирается от нуклеотида 1689 до нуклеотида 2638), где указанные мутации приводят к снижению или утрате функции кодируемого мутантного белка *acs4*.

Один репрезентативный мутантный аллель *acs4* (мутант 2477 или Nun 2477), сообщающий пониженную способность продуцировать этилен и/или задержку созревания и/или более длительный срок хранения и идентифицированный в соответствии с настоящим изобретением, содержит мутацию, приводящую к замене серина (Ser или S) на аспарагин (Asn или N) в положении аминокислоты 279 кодируемого белка (SEQ ID NO: 2). Мутация S279N присутствует в крупном домене белка ACS4. Последовательность мутантного белка 2477 представлена в SEQ ID NO: 2. Такая замена аминокислот обусловлена заменой G на A в положении нуклеотида 836 последовательности SEQ ID NO: 8, если считать от A в старт-кодоне ATG в положении нуклеотида 1. Мутантная кДНК представлена в SEQ ID NO: 9.

Другой репрезентативный мутантный аллель *acs4* (мутант 4043 или Nun 4043), сообщающий пониженную способность продуцировать этилен и/или задержку созревания и/или более длительный срок хранения и идентифицированный в соответствии с настоящим изобретением, содержит мутацию, приводящую к замене аланина (Ala или A) на валин (Val или V) в положении аминокислоты 248 кодируемого белка (SEQ ID NO: 3). Мутация A248V присутствует в крупном домене белка ACS4. Последовательность мутантного белка 4043 представлена в SEQ ID NO: 3. Такая замена аминокислот обусловлена заменой C на T в положении нуклеотида 743 последовательности SEQ ID NO: 1, если считать от A в старт-кодоне ATG в положении нуклеотида 1. Мутантная кДНК представлена в SEQ ID NO: 10.

Другой репрезентативный мутантный аллель *acs4* (мутант 4222 или Nun 4222), сообщающий пониженную способность продуцировать этилен и/или задержку созревания и/или более длительный срок хранения и идентифицированный в соответствии с настоящим изобретением, содержит мутацию, способствующую образованию усеченного белка, состоящего из 203 аминокислотных остатков, после трансляции, тогда как белок дикого типа имеет 476 аминокислотных остатков. Усеченная последовательность мутантного белка 4222 представлена в SEQ ID NO: 4. Такое усечение белка обусловлено заменой A на T в положении нуклеотида 610 последовательности SEQ ID NO: 1, если считать от A в старт-кодоне ATG в положении нуклеотида 1. Мутация A610T в мутанте 4222 приводит к замене кодона, кодирующего лизин (AAA), на стоп-кодон (TAA). Мутантная кДНК представлена в SEQ ID NO: 11.

Другой репрезентативный мутантный аллель *acs4* (мутант 4303 или Nun 4303), сообщающий пониженную способность продуцировать этилен и/или задержку созревания и/или более длительный срок хранения и идентифицированный в соответствии с настоящим изобретением, содержит мутацию, приводящую к замене лейцина (Leu или L) на фенилаланин (Phe или F) в положении аминокислоты 321 кодируемого белка. Мутация L321F присутствует во втором небольшом домене белка ACS4. Последовательность мутантного белка 4303 представлена в SEQ ID NO: 5. Такая замена аминокислот обусловлена за-

мной G на T в положении нуклеотида 963 последовательности SEQ ID NO: 1, если считать от A в старт-кодоне ATG в положении нуклеотида 1. Мутантная кДНК представлена в SEQ ID NO: 12.

Другой репрезентативный мутантный аллель *acs4* (мутант 4691 или Nun 4691), сообщающий пониженную способность продуцировать этилен и/или задержку созревания и/или более длительный срок хранения и идентифицированный в соответствии с настоящим изобретением, содержит мутацию, приводящую к замене валина (Val или V) на глутаминовую кислоту (Glu или E) в положении аминокислоты 250 кодируемого белка. Мутация V250E присутствует в крупном домене белка ACS4. Последовательность мутантного белка 4691 представлена в SEQ ID NO: 6. Такая замена аминокислот обусловлена заменой T на A в положении нуклеотида 749 последовательности SEQ ID NO: 1, если считать от A в старт-кодоне ATG в положении нуклеотида 1. Мутантная кДНК представлена в SEQ ID NO: 13.

Другой репрезентативный мутантный аллель *acs4* (мутант 5251 или Nun 5251), сообщающий пониженную способность продуцировать этилен и/или задержку созревания и/или более длительный срок хранения и идентифицированный в соответствии с настоящим изобретением, содержит мутацию, приводящую к замене треонина (Thr или T) на изолейцин (Ile или I) в положении аминокислоты 316 кодируемого белка. Мутация T316I присутствует во втором небольшом домене белка ACS4. Последовательность мутантного белка 5251 представлена в SEQ ID NO: 7. Такая замена аминокислот обусловлена заменой C на T в положении нуклеотида 947 последовательности SEQ ID NO: 1, если считать от A в старт-кодоне ATG в положении нуклеотида 1. Мутантная кДНК представлена в SEQ ID NO: 14.

Используемый здесь термин "мутантный аллель" означает аллель, содержащий одну или более мутаций в кодирующей последовательности (мРНК, кДНК или геномной последовательности) по сравнению с аллелем дикого типа. Такая(ие) мутация(и) (например, инсерция, инверсия, делеция и/или замена одного или более нуклеотидов) может (могут) приводить к образованию кодируемого белка, имеющего пониженную *in vitro* и/или *in vivo* функциональную активность (пониженную функцию) или вообще не обладающего функциональной активностью *in vitro* и/или *in vivo* (белка с утраченной функцией), что, например, обусловлено усечением белка или делецией, инсерцией или заменой одной или более аминокислот в аминокислотной последовательности. Такие замены могут приводить к образованию белка, имеющего другую 3D-конформацию; белка, нацеленного на другой субклеточный компартмент; белка, имеющего модифицированный каталитический домен; белка, обладающего модифицированной активностью связывания с нуклеиновыми кислотами или белками, и т.п.

Используемые здесь термины "растение дикого типа" и "плоды дикого типа" или "растения/плоды с нормальным созреванием" относятся к растению томата, содержащему две копии аллеля *Acs4* дикого типа (WT) (*Acs4/Acs4*), кодирующего полностью функциональный белок *Acs4* (например, в отличие от "мутантных растений", содержащих мутантный аллель *acs4*). Такие растения могут быть использованы, например, в качестве подходящего контроля в фенотипических анализах. Предпочтительными растениями дикого типа и/или мутантными растениями являются "культивируемые растения томатов". Так, например, растением дикого типа является растение сорта *Moneymaker*, а также растения сорта *Ailsa Craig*, сорта *Tara* и многие другие.

"Растения томатов" или "культивируемые растения томатов" представляют собой растения *Solanum lycopersicum*, то есть, разновидности, выведенные линии или сорта вида *Solanum lycopersicum*, выращенные человеком и имеющие хорошие агрономические качества; при этом, предпочтительно, чтобы такие растения не являлись растениями дикого типа, то есть, растениями, которые, в основном, имеют гораздо более низкую урожайность и более низкие агрономические качества, чем культивируемые растения, и которые, например, были выращены в естественных условиях. "Растениями дикого типа" являются, например, экотипы, линии PI (интродукции растений), суходольные виды или дикорастущие виды или дикорастущие родственные виды. Так называемые "элитные" наследуемые сорта или сорта, выведенные, например, путем перекрестного опыления, или сорта, давно выведенные человеком и часто хорошо адаптированные к конкретным географическим регионам, входят в один из аспектов настоящего изобретения и называются здесь культивируемыми растениями томатов.

Дикими родственниками томатов являются

*S. arcanum*, *S.*  
*chmielewskii*, *S. neorickii* (= *L. parviflorum*), *S. cheesmaniae*,  
*S. galapagense*, *S. pimpinellifolium*, *S. chilense*, *S.*  
*corneliomulleri*, *S. habrochaites* (= *L. hirsutum*), *S.*  
*huaylasense*, *S. sisymbriifolium*, *S. peruvianum*, *S. hirsutum* или  
*S. pennellii*.

Используемый здесь термин "среднее" означает арифметическое среднее.

#### Краткое описание списка последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность полностью функционального белка ACS4 *Solanum lycopersicum* дикого типа, происходящую от мРНК, взятой из Genbank под регистрационным № AAA34131.1 (кодируемой кДНК, взятой из Genbank под регистрационным № M634 90.1).

SEQ ID NO: 2 представляет собой последовательность мутантного белка *acs4 2477 Solanum lycopersicum*.

SEQ ID NO: 3 представляет собой последовательность мутантного белка *acs4 4043 Solanum lycopersicum*.

SEQ ID NO: 4 представляет собой последовательность мутантного белка *acs4 4222 Solanum lycopersicum*.

SEQ ID NO: 5 представляет собой последовательность мутантного белка *acs4 4303 Solanum lycopersicum*.

SEQ ID NO: 6 представляет собой последовательность мутантного белка *acs4 4691 Solanum lycopersicum*.

SEQ ID NO: 7 представляет собой последовательность мутантного белка *acs4 5251 Solanum lycopersicum*.

SEQ ID NO: 8 представляет собой кДНК *Acs4 Solanum lycopersicum* дикого типа, взятую из Genbank под регистрационным № M63490.1.

SEQ ID NO: 9 представляет собой мутантную кДНК *acs4 2477 Solanum lycopersicum*.

SEQ ID NO: 10 представляет собой мутантную кДНК *acs4 4043 Solanum lycopersicum*.

SEQ ID NO: 11 представляет собой мутантную кДНК *acs4 4222 Solanum lycopersicum*.

SEQ ID NO: 12 представляет собой мутантную кДНК *acs4 4303 Solanum lycopersicum*.

SEQ ID NO: 13 представляет собой мутантную кДНК *acs4 4 691 Solanum lycopersicum*.

SEQ ID NO: 14 представляет собой мутантную кДНК *acs4 5251 Solanum lycopersicum*.

SEQ ID NO: 15 представляет собой геномную кДНК *Acs4 Solanum lycopersicum* дикого типа.

#### **Краткое описание графического материала**

Фиг. 1 - на этом графике представлено выравнивание 5 аминокислотных последовательностей, проиллюстрированных на фиг. 1 в работе Capitani et al. (Journal of Molecular Biology, 1999, vol. 194, pp. 745-756) (*Cucumis melo*, *Pelargonium hortorum*, *Brassica oleracea*, *Phaseolus aureus* и *Solanum tuberosum*) с аминокислотной последовательностью ACS4-растения *Solanum lycopersicum* дикого типа, представленной в SEQ ID NO 1.

Фиг. 2 - высвобождение этилена, измеренное в нл/(ч×г) и также выраженное в нл×ч<sup>-1</sup>×г<sup>-1</sup> для плодов томатов на стадии появления розовой окраски и на стадии покраснения. Тара представляет собой коммерческий сорт дикого типа (*Acs4/Acs4*).

Фиг. 3 - на этом графике указан процент плодов на стадии покраснения, как было определено в различные дни после перехода контрольных плодов дикого типа в стадию побурения [на день 1, первый побуревший плод растения дикого типа). Всем плодам мутантных растений согласно изобретению требовалось больше дней для созревания, чем плодам дикого типа (wt), где "Но" означает плоды мутантного растения (указан после цифры), которые являются гомозиготными по конкретной мутации *acs4 (acs4/acs4)*; а "Не" означает плоды мутантного растения (указан после цифры), которые являются гетерозиготными по конкретной мутации *acs4 (Acs4/acs4)*.

Фиг. 4 - выравнивание SEQ ID NO: 1-7. Также указаны домены *Acs4* (обозначенные светло-серым) и их мутации (показанные жирным шрифтом и подчеркнутые).

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение относится к культивируемому растению вида *Solanum lycopersicum*, включающему аллель *acs4*, имеющий одну или более мутаций, где указанные мутации приводят к продуцированию мутантного белка *acs4* с утраченной функцией и/или с пониженной функцией по сравнению с белком *Acs4* дикого типа.

Последовательность белка *Acs4* содержит 3 домена: "крупный домен", простирающийся от аминокислотного остатка 65 до аминокислотного остатка 327, как показано на фиг. 4 настоящей заявки, и два небольших домена, простирающихся от аминокислотного остатка 33 до аминокислотного остатка 62 и от аминокислотного остатка 339 до аминокислотного остатка 438, соответственно, как показано на фигуре 4 настоящей заявки. Каталитический центр *Acs4*, очевидно, присутствует в "крупном домене".

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к культивируемому растению вида *Solanum lycopersicum*, и/или к его частям (например, плодам), включающим аллель *acs4*, имеющий одну или более мутаций, где указанные мутации приводят к продуцированию мутантного белка *acs4* с утраченной функцией или с пониженной функцией по сравнению с белком *Acs4* дикого типа, и где указанная мутация или указанные мутации приводят к снижению уровня продуцирования этилена и/или к замедлению созревания плодов и/или к увеличению срока хранения по сравнению растениями *Solanum lycopersicum*, которые являются гомозиготными по полностью функциональному аллелю *Acs4 (Acs4/Acs4)* дикого типа (кодирующему функциональный белок *Acs4* SEQ ID NO: 1 или его функциональный вариант).

Растением *S.lycopersicum*, содержащим белок SEQ ID NO: 1, является, например, растение сорта UC82B или других сортов.

В одном из аспектов изобретения функциональным вариантом SEQ ID NO: 1 является аллель *Acs4*, кодирующий белок, имеющийся в GenBank под регистрационными номерами CAH56694, CAH56504 или CAH56693. Растением *S.lycopersicum*, содержащим функциональный вариант SEQ ID NO: 1, является,

например, растение сорта San Marzano Vesuvio, San Marzano Nano или Tondino.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к культивируемому растению вида *Solanum lycopersicum*, и/или к его частям (например, плодам), включающим аллель *acs4*, имеющий одну или более мутаций, где указанные мутации приводят к продуцированию мутантного белка *acs4* с утраченной функцией или с пониженной функцией по сравнению с белком *Acs4* дикого типа, и где указанная мутация или указанные мутации приводят к снижению уровня продуцирования этилена, и/или к замедлению созревания плодов, и/или к увеличению срока хранения по сравнению растениями *Solanum lycopersicum*, которые являются гомозиготными по полностью функциональному аллелю *Acs4* (*Acs4/Acs4*) дикого типа (кодирующему функциональный белок *Acs4* SEQ ID NO: 1 или его функциональный вариант), где указанное растение томата не содержит аллеля *Acs4*, кодирующего белок, имеющийся в GenBank под регистрационными номерами САН56694, САН56504 или САН56693. В другом аспекте изобретения указанная мутация или указанные мутации в растении согласно изобретению приводят к снижению уровня продуцирования этилена по сравнению с растением *Solanum lycopersicum*, которое является гомозиготным по аллелю *Acs4* дикого типа.

В другом аспекте изобретения указанная мутация или указанные мутации в растении согласно изобретению приводят к замедлению созревания плодов и/или к увеличению срока хранения по сравнению с растениями *Solanum lycopersicum*, которые являются гомозиготными по аллелю *Acs4* дикого типа.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к культивируемому растению вида *Solanum lycopersicum*, содержащему аллель *acs4*, имеющий одну или более мутаций, приводящих к утрате функции белка *acs4* или к снижению функции белка *acs4*, где указанная(ые) мутация(и) присутствуют в "крупном домене", то есть, в кодирующей части аминокислотной области 65-327 функционального белка *Acs4* дикого типа, кодируемого аллелем *Acs4*, и где указанные мутации приводят к продуцированию мутантного белка *acs4* с утраченной функцией или с пониженной функцией по сравнению с белком *Acs4* дикого типа, и к снижению уровня продуцирования этилена и/или к замедлению созревания плодов и/или к увеличению срока хранения по сравнению с растением *Solanum lycopersicum*, которое является гомозиготным по аллелю *Acs4* дикого типа. В предпочтительном аспекте изобретения, одна или более мутаций представляют собой одну или более аминокислотных замен, делеций и/или инсерций в области аминокислот 241-251 и/или в области аминокислот 304-327 последовательности SEQ ID NO: 1; а в другом предпочтительном аспекте изобретения, одна или более мутаций приводят к образованию усеченного белка *acs4*, в котором частично или полностью отсутствует крупный домен в положении аминокислот за положениями 200, 201 или 203, либо эти мутации приводят к образованию усеченного белка *acs4*, в котором отсутствует по меньшей мере второй небольшой домен и/или часть крупного домена, например, в котором стоп-кодон присутствует в любом положении после нуклеотида 600 последовательности SEQ ID NO: 8.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к растению *Solanum lycopersicum*, содержащему аллель *acs4*, кодирующий белок *acs4* с утраченной функцией или белок *acs4* с пониженной функцией, где указанный белок содержит функциональный "крупный домен", то есть, аллель, содержащий мутацию, ответственную за снижение уровня продуцирования этилена и/или задержку созревания и/или за более длительный срок хранения, находится за пределами указанного "крупного домена". Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения, мутантный аллель *acs4* включает одну или более мутаций в одном или обоих небольших доменах, простирающихся от аминокислоты 33 до аминокислоты 62 и/или от аминокислоты 339 до аминокислоты 438 последовательности SEQ ID NO: 1 или варианта SEQ ID NO: 1, содержащего функциональный "крупный домен", а также включает (кодирующую нуклеотидную последовательность) по меньшей мере одну инсерцию, делецию или замену в области аминокислот 33-62 и/или 339-438 SEQ ID NO: 1, где указанная по меньшей мере одна инсерция, делеция или замена обеспечивает снижение уровня продуцирования этилена и/или задержку созревания и/или более длительный срок хранения плодов растения томата.

В одном из вариантов осуществления изобретения мутация(и), приводящая(ие) к продуцированию белка *acs4* с утраченной функцией или белка *acs4* с пониженной функцией *acs4*, присутствует(ют) в "крупном домене" белка *Acs4* дикого типа, то есть, белка, который содержит функциональные "небольшие домены"; так, например, в одном из вариантов осуществления изобретения, одна или более аминокислот были вставлены, делетированы или заменены в положениях 65-327 SEQ ID NO: 1 или варианта SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления изобретения, мутация(и), приводящая(ие) к продуцированию белка *acs4* с утраченной функцией или белка *acs4* с пониженной функцией *acs4*, присутствует(ют) у С-конца белка *Acs4* дикого типа, так, например, в одном из вариантов осуществления изобретения, одна или более аминокислот были вставлены, делетированы или заменены в положениях 444-476 SEQ ID NO: 1 (или варианта SEQ ID NO: 1).

Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения растения томата согласно изобретению содержат эндогенный (нетрансгенный) мутантный аллель *acs4*, который кодирует белок *acs4* с утраченной функцией или мутантный белок *acs4* с пониженной функцией, в результате чего плоды растения вызревают до стадии покраснения (предпочтительно медленнее, чем плоды растений, гомозиготных по аллели дикого типа, кодирующему полностью функциональный белок *Acs4*). В другом варианте

осуществления изобретения растения томата согласно изобретению содержат антропогенный нетрансгенный мутантный аллель *acs4*, который кодирует мутантный белок *acs4* с пониженной функцией и/или белок *acs4* с утраченной функцией. В другом варианте осуществления изобретения указанный мутантный аллель *acs4* наследуется от культивируемого растения томата и/или продуцируется в этом растении томата (например, выведенной линии, выведенного сорта или наследуемого сорта) или дикого родственника томата. Такая индуцированная человеком мутация может быть индуцирована, например, посредством сайт-направленного мутагенеза, описанного в EP1963505. Мутантные аллели *acs4*, генерируемые в диких родственниках томата, затем легко переносятся в культивируемые растения томатов путем селекции.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к растению согласно изобретению, имеющему эндогенный аллель *acs4*, кодирующий белок *acs4* с утраченной функцией или белок *acs4* с пониженной функцией, имеющие последовательность, по существу, идентичную последовательности SEQ ID NO: 1 или варианта SEQ ID NO: 1, где указанный белок содержит одну или более аминокислотных замен, делеций и/или инсерций.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к растению согласно изобретению, которое продуцирует этилен на более низком уровне, и/или у которого созревание происходит более медленно, и/или которое имеет более длительный срок хранения, чем растения дикого типа (*Acs4/Acs4*), что обусловлено тем, что указанные растения содержат эндогенный аллель *acs4*, кодирующий белок *acs4* с утраченной функцией или белок *acs4* с пониженной функцией, имеющие последовательность, по существу, идентичную последовательности SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 7. В своем конкретном аспекте, настоящее изобретение относится к культивируемым растениям томата, содержащим аллель *acs4*, присутствующий в семенах, депонированных под регистрационными номерами NCIMB 42034, NCIMB 42037, NCIMB 42038, NCIMB 42039 или NCIMB 42041, в одной или двух копиях, то есть, в гомозиготной или гетерозиготной форме. Что касается гетерозиготной формы, то другим аллелем может быть аллель *Acs4* дикого типа или другой мутантный аллель *acs4*, происходящий от любых описанных здесь других мутантов, или любой другой мутантный аллель *acs4*, кодирующий белок *acs4* с утраченной функцией или белок *acs4* с пониженной функцией, описанные в настоящей заявке. Что касается гетерозиготной формы, то другим аллелем может быть аллель *acs4* с пониженной функцией.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к эндогенному аллелю *acs4* или к белку *acs4* с утраченной функцией или белку *acs4* с пониженной функцией, кодируемым последовательностью, которая, по существу, идентична последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 7, присутствующей в семенах (и происходящей от семян), депонированных под регистрационными номерами NCIMB 42034, NCIMB 42037, NCIMB 42038, NCIMB 42039, или NCIMB 42041.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к растению томата согласно изобретению, содержащему эндогенный аллель *acs4*, кодирующий белок *acs4* с утраченной функцией или белок *acs4* с пониженной функцией, имеющий последовательность, которая на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 7.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к растению согласно изобретению, включающему эндогенный аллель *acs4*, кодирующий белок *acs4* с утраченной функцией или белок *acs4* с пониженной функцией, имеющий по меньшей мере одну аминокислотную делецию, инсерцию или замену в "крупном домене". Предпочтительно, указанный белок *acs4* включает функциональные небольшие домены, такие как небольшие домены SEQ ID NO: 1 (аминокислотные остатки 33-62 и/или 339-438) или небольшие домены (функционального) варианта SEQ ID NO: 1. В одном из вариантов осуществления изобретения, этот белок также включает С-концевую часть SEQ ID NO: 1 (аминокислоты 444-476) или С-концевую часть (функционального) варианта SEQ ID NO: 1.

В одном из аспектов изобретения, белок *acs4* содержит не более, чем 203 аминокислоты, а предпочтительно первые 203 аминокислоты. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения, растение томата содержит усеченный белок *acs4*, включающий аминокислоты 1-450, 1-400, 1-350, 1-300, 1-250 или 1-203 последовательности SEQ ID NO: 1 или ее варианта.

Настоящее изобретение также относится к семенам, растениям и частям растения томата, включающих эндогенный ген *acs4*, кодирующий кДНК (мРНК), которая имеет последовательность, по существу, идентичную последовательности SEQ ID NO: 8, и которая имеет по меньшей мере одну нетрансгенную мутацию в указанном эндогенном гене *acs4*, где указанная по меньшей мере одна нетрансгенная мутация приводит к продуцированию мутантного белка *acs4* с утраченной функцией или пониженной активностью по сравнению с белком *Acs4* дикого типа. Предпочтительно, указанная мутация приводит к снижению уровня продуцирования этилена и/или к замедлению созревания плодов и/или к увеличению срока хранения по сравнению с растением *Solanum lycopersicum*, которое является гомозиготным по функциональному аллелю *Acs4* дикого типа, кодирующему белок SEQ ID NO: 1 или его функциональный вариант. Мутацией, описанной в настоящей заявке, может быть антропогенная мутация или природ-

ная мутация. Предпочтительным растением является культивируемое растение томата. В одном из вариантов осуществления изобретения, такая мутация приводит к замене стоп-кодона или аминокислоты. В одном из вариантов осуществления изобретения, аминокислота, выбранная из группы, состоящей из Ala248, Val250, Ser279, Thr316 и Leu321 белка Acs4 дикого типа, заменена другой аминокислотой, например, Ala248Val, Val250Glu, Ser279Asn, Thr316Ile и Leu321Phe. В другом варианте осуществления изобретения, указанная мутация выбрана из группы, состоящей из G836A, C743T, A610T, G963T, T749A и C947T SEQ ID NO: 8.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к семенам, растениям и к частям растений томата, содержащим эндогенный мутантный ген *acs4*, где указанная нетрансгенная мутация приводит к замене аминокислоты в белке *acs4*, кодируемом и продуцируемом в результате транскрипции и трансляции гена *acs4*, где указанная аминокислотная замена выбрана из группы, состоящей из S279N, A248V, L321F, V250E, T316I, и к полной делеции аминокислот 204-476 SEQ ID NO: 1.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к белку *acs4*, имеющему последовательность, по существу, идентичную последовательности с SEQ ID NO: 2. В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к белку *acs4*, имеющему последовательность, по существу, идентичную последовательности с SEQ ID NO: 3. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к белку *acs4*, имеющему последовательность, по существу, идентичную последовательности с SEQ ID NO: 4. В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к белку *acs4*, имеющему последовательность, по существу, идентичную последовательности с SEQ ID NO: 5. В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к белку *acs4*, имеющему последовательность, по существу, идентичную последовательности с SEQ ID NO: 6. В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к белку *acs4*, имеющему последовательность, по существу, идентичную последовательности с SEQ ID NO: 7. Настоящее изобретение также относится к семенам, растениям и к частям растений томата, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую эти белки.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к плодам, семенам, пыльце, частям и/или к потомству растений томата согласно изобретению. Предпочтительно настоящее изобретение относится к плодам или к семенам растения согласно изобретению. Более предпочтительно настоящее изобретение относится к плодам томата с замедленным созреванием и/или с повышенным сроком хранения после сбора урожая, что обусловлено нетрансгенной мутацией по меньшей мере одного аллеля *acs4*, как описано в настоящей заявке.

В одном из аспектов изобретения растения томата согласно изобретению имеют задержку наступления стадии побурения, что означает, что первым плодам и/или всем плодам мутантов согласно изобретению требуется значительно больше дней до достижения стадии побурения, например на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 или больше дней, чем первым плодам и/или всем плодам контрольных *Acs4/Acs4*-растений дикого типа.

В одном из аспектов изобретения плодам растения томата согласно изобретению требуется больше дней для перехода из стадии побурения в стадию покраснения, например, плодам растения согласно изобретению, для перехода из стадии побурения в стадию покраснения, требуется на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 или больше дней, чем плодам контрольных *Acs4/Acs4*-растений дикого типа.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к плодам растения согласно изобретению, срок хранения которых по меньшей мере на 2 дня дольше, чем срок хранения плодов томата, гомозиготного по аллелю *Acs4* дикого типа. В еще в одном своем аспекте настоящее изобретение относится к плодам растения согласно изобретению, которые продуцируют этилен на более низком уровне, то есть, по меньшей мере на 15% или, по меньшей мере, на 20% ниже, чем плоды растения *Solanum lycopersicum*, гомозиготного по аллелю *Acs4* дикого типа.

В конкретном аспекте изобретения плоды растения томата согласно изобретению имеют срок хранения, значительно превышающий срок хранения плодов растений дикого типа, например, растениям согласно изобретению требуется большее число дней от появления первого плода в стадии побурения (или стадии появления бурого, розового или красного цвета или плодов после сбора урожая) до появления первого "испорченного" плода, который становится непригодным для продажи или потребления; так, например, растения согласно изобретению имеют срок хранения по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более дней больше, чем срок хранения плодов контрольных растений (таких как *Acs4/Acs4*-растения дикого типа), если эти растения выращиваются в одних и тех же условиях, а плоды обрабатываются одним и тем же способом и хранятся в одних и тех же условиях.

Замедленное созревание и/или более длительный срок хранения может иметь то преимущество, что этот срок хранения является более подходящим для транспортировки собранных плодов, например, для розничной торговли и супермаркетов, и/или для потребителей, которые могут хранить эти плоды более продолжительное время. Томаты могут быть собраны на стадии зеленой зрелости или на стадии побурения или на последующих стадиях. Если урожай был собран до стадии побурения, то его необходимо обработать этиленом, а урожай, собранный приблизительно на стадии побурения или на последующих стадиях, не требует обработки этиленом, поскольку на этой стадии плоды продуцируют этилен сами. Как показано на фиг. 2, мутанты согласно изобретению с замедленным созреванием продуцируют меньшее

количество этилена на стадии появления розового цвета и на стадии покраснения, чем плоды дикого типа, но достаточное количество этилена для созревания до стадии покраснения. В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к растениям томата согласно изобретению, содержащим мутантный аллель *acs4*, кодирующий белок *acs4* с утраченной функцией или белок *acs4* с пониженной функцией, где плоды указанных растений продуцируют значительно меньше этилена, чем (*Acs4/Acs4*)-растения дикого типа. Термин "значительно более низкий уровень продуцирования этилена" означает, что плоды продуцируют этилен на уровне, равном 75% или менее, равном 70% или менее, равном 65% или менее, равном 60% или менее, равном 55% или менее, равном 50% или менее, равном 45% или менее, равном 40% или менее, равном 35% или менее, равном 30% или менее, равном 25% или менее, равном 20% или менее, равном 15% или менее уровню этилена, продуцируемого плодами, гомозиготными по *Acs4/Acs4*, на стадии появления розового цвета или на стадии покраснения. Таким образом, в одном из аспектов изобретения, уровень этилена, продуцируемого на стадии появления розового цвета, составляет приблизительно ниже 3,5 нл/(ч×г), например, равен или приблизительно ниже 3 нл/(ч×г), равен или приблизительно ниже 2,5 нл/(ч×г), равен или приблизительно ниже 2,0 нл/(ч×г), равен или приблизительно ниже 1,5 нл/(ч×г), равен или приблизительно ниже 1,0 нл/(ч×г), равен или приблизительно ниже 0,5 нл/(ч×г)). В одном из аспектов изобретения, уровень этилена, продуцируемого на стадии покраснения, составляет приблизительно ниже 6 нл/(ч×г)), например, равен или приблизительно ниже 5,5 нл/(ч×г), равен или приблизительно ниже 5,0 нл/(ч×г), равен или приблизительно ниже 4,5 нл/(ч×г), равен или приблизительно ниже 3,5 нл/(ч×г), равен или приблизительно ниже 3 нл/(ч×г), равен или приблизительно ниже 2,5 нл/(ч×г), равен или приблизительно ниже 2,0 нл/(ч×г), равен или приблизительно ниже 1,5 нл/(ч×г), равен или приблизительно ниже 1,0 нл/(ч×г) или равен или приблизительно ниже 0,5 нл/(ч×г).

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к плодам растения согласно изобретению, имеющим более длительный период созревания и/или более длительный срок хранения после сбора урожая, что обусловлено нетрансгенной мутацией по меньшей мере в одном аллеле *acs4*, где период созревания и/или срок хранения после сбора урожая по меньшей мере на 110% превышает период созревания и/или срок хранения плодов томата после сбора урожая, гомозиготных по аллелю *Acs4* дикого типа. Предпочтительно, период созревания и/или срок хранения плодов после сбора урожая по меньшей мере на 115%, более предпочтительно по меньшей мере на 120%, а еще более предпочтительно по меньшей мере на 125% превышает период созревания и/или срок хранения плодов после сбора урожая, гомозиготных по аллелю *Acs4* дикого типа. В другом аспекте изобретения, период созревания и/или срок хранения плодов после сбора урожая по меньшей мере на 135%, более предпочтительно по меньшей мере на 150%, а еще более предпочтительно по меньшей мере на 165% превышает период созревания и/или срок хранения плодов после сбора урожая гомозиготных по аллелю *Acs4* дикого типа. В другом аспекте изобретения, период созревания и/или срок хранения плодов после сбора урожая по меньшей мере на 180%, более предпочтительно по меньшей мере на 200%, а еще более предпочтительно по меньшей мере на 250% превышает период созревания и/или срок хранения плодов после сбора урожая гомозиготных по аллелю *Acs4* дикого типа.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к растениям томата, у которых задержка созревания и более длительный срок хранения являются такими же или почти такими же, как у растений томата согласно изобретению, и где репрезентативные семена таких растений были депонированы Nunhems B.V. 21 августа 2012 в NCIMB Ltd. (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn Aberdeen, Scotland AB21 9YA, UK) в соответствии с Будапештским договором и согласно решению Экспертизы (EPC 2000, Rule 32(1)). Этим семенам были присвоены нижеследующие депозитарные номера: NCI MB 42034 (мутант 2477), NCIM 42037 (мутант 4043), NCIMB 42038 (мутант 4222), NCIMB 42039 (мутант 4691), NCIMB 42041 (мутант 5251).

В соответствии с другим своим аспектом, настоящее изобретение относится к клеточной культуре или к тканевой культуре растения томата согласно изобретению. Такая клеточная или тканевая культура содержит регенерируемые клетки. Эти клетки могут быть получены из листьев, пыльцы, зародышей, семядолей, гипокотилей, клеток меристемы, корней, кончиков корней, пыльников, цветков, семян и стеблей.

Настоящее изобретение также относится к семенам, из которых могут быть выращены растения согласно изобретению, а также к упаковкам, содержащим такие семена. Один из аспектов настоящего изобретения также относится к вегетативному размножению растений согласно изобретению. Также рассматриваются собранные плоды и их части, употребляемые в свежем виде или предназначенные для последующей обработки, или плоды и их части, употребляемые в обработанном виде. Плоды могут быть отобраны по качеству и по размеру и/или они могут быть упакованы. Плоды могут быть нарезаны ломтиками или кубиками или могут быть подвергнуты дальнейшей обработке.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к одной или более клеткам растения согласно изобретению.

Настоящее изобретение также относится к кормам и/или к пищевым продуктам, включающим пло-

ды или части плодов томата согласно изобретению. Используемый здесь термин "пищевой продукт" относится к питательным веществам, потребляемым человеком или животными. Примерами являются бутерброды, салаты, соусы, кетчуп и т.п.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу выращивания растения томата согласно изобретению, где указанный способ включает стадии:

- a) получения растительного материала из растения томата;
- b) обработки указанного растительного материала мутагеном с получением мутагенизированного растительного материала;
- c) анализа указанного мутагенизированного растительного материала для идентификации растения, которое имеет по меньшей мере одну мутацию по меньшей мере в одном аллеле *acs4*, имеющем последовательность, по существу, идентичную последовательности SEQ ID NO: 1 или ее вариантам.

Этот способ может также включать определение периода созревания и/или срока хранения плодов томата выбранного растения или его потомства, и отбор растения, плоды которого созревают в течение более длительного периода времени и/или имеют более длительный срок хранения.

В одном из аспектов изобретения мутация может быть выбрана из мутаций в крупном домене белка *acs4* и/или во втором небольшом домене белка *acs4* (аминокислоты 339-438). В одном из аспектов изобретения мутация может быть выбрана из мутаций, приводящих к аминокислотным заменам, выбранным из группы, состоящей из S279N, A248V, L321F, V250E, T316I или мутации стоп-кодона, приводящей к делеции аминокислот 204-476 последовательности SEQ ID NO: 1 или ее части. В другом аспекте изобретения мутация может быть выбрана из мутаций, приводящих к заменам в кДНК, выбранным из группы, состоящей из G836A, C743T, A610T, G963T, T749A и C947T последовательности SEQ ID NO: 8. В этом методе растительный материал стадии (a) предпочтительно выбран из группы, состоящей из семян, пыльцы, растительных клеток или тканей растений томата соответствующей линии или сорта. Более предпочтительными являются семена растений. В другом аспекте изобретения, мутагеном, используемым в этом методе, является этилметансульфонат. В стадии (b) и в стадии (c), мутагенизированным растительным материалом является, предпочтительно, мутантная популяция, такая как популяция томата TILLING.

Таким образом, в одном из аспектов изобретения, способ получения растения томата, продуцирующего плоды с замедленным созреванием и/или с более длительным сроком хранения, включает стадии:

- a) получения растений томата TILLING,
- b) скрининга указанной популяции томатов TILLING на мутанты в гене *acs4*, а в частности, в нуклеотидной последовательности, кодирующей крупные домены, и
- c) отбора из мутантных растений (b) тех растений (или потомства этих растений), плоды которых имеют более низкий уровень продуцирования этилена, и/или замедленное созревание, и/или более длительный срок хранения, чем (*Acs4/Acs4*)-плоды дикого типа.

Мутантные растения (M1), предпочтительно подвергнутые самоопылению один или несколько раз в целях получения, например, M2-популяций, или, предпочтительно, M3- или M4-популяций для определения фенотипа. В M2-популяциях, мутантный аллель присутствует в соотношении 1 (гомозиготных по мутантному аллелю):2 (гетерозиготных по мутантному аллелю):1(гомозиготных по аллелю дикого типа).

В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения гибридного растения *Solanum lycopersicum*, где указанный способ включает:

- (a) получение первого растения *Solanum lycopersicum* согласно изобретению и
- (b) перекрестного скрещивания указанного первого растения *Solanum lycopersicum* со вторым растением *Solanum lycopersicum*,

где указанное гибридное растение *Solanum lycopersicum* содержит аллель *acs4*, имеющий одну или более мутаций, которые приводят к продуцированию мутантного белка *acs4* с утраченной функцией или с пониженной активностью по сравнению с белком *Acs4* дикого типа.

Растения и части растений (например, плодов, клеток и др.) согласно изобретению могут быть гомозиготными или гетерозиготными по мутантному аллелю *acs4*.

В соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно, чтобы растения согласно изобретению, которые содержат один или более мутантных аллелей *acs4* (или вариантов), и которые продуцируют мутантный белок *acs4* с утраченной функцией или с пониженной активностью по сравнению с белком *Acs4* дикого типа, не давали меньше плодов, чем растения дикого типа. Таким образом, предпочтительно, чтобы количество плодов на одно растение не снижалось.

Другие предполагаемые гены/белки *ACS4* могут быть идентифицированы *in silico*, например, путем идентификации последовательностей нуклеиновой кислоты или белка в существующих базах данных нуклеиновых кислот или белков (например, GENE BANK, SWISSPROT, TrEMBL) с использованием стандартных компьютерных программ для анализа последовательностей, таких как пакеты программ для поиска сходства последовательностей (BLASTN, BLASTP, BLASTX, TBLAST, FAS TA и т.п.).

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к белку *acs4* с утраченной функцией

или к мутантным белкам *acs4* с пониженной функцией (включая варианты или ортологи, такие как белки *acs4* диких родственников томата), и к растениям и частям растений, которые кодируют белок *acs4* с утраченной функцией или мутанты с пониженной функцией, где такая пониженная функция означает снижение уровня продуцирования этилена и/или более медленное созревание плодов и/или более длительный срок хранения этих плодов по сравнению с плодами растения *Solanum lycopersicum*, которое является гомозиготными по аллелю *Acs4* дикого типа.

Мутация любого типа может приводить к снижению функции кодируемого белка *Acs4*, например, к inserции, делеции и/или замене одного или более нуклеотидов в геномной ДНК, которая включает кДНК (SEQ ID NO: 8 или ее варианты). В своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты *acs4*, способной снижать уровень продуцирования этилена и/или замедлять созревание плодов и/или обеспечивать более длительный срок хранения этих плодов по сравнению с плодами растения *Solanum lycopersicum*, которое является гомозиготными по аллелю *Acs4* дикого типа, где указанная последовательность нуклеиновой кислоты кодирует белок *acs4* с утраченной функцией или белок *Acs4* с пониженной функцией, что обусловлено одной или более мутациями в крупном домене.

Белок *acs4* с утраченной функцией или белки с пониженной функцией *in vitro* могут быть протестированы как описано в настоящей заявке путем определения влияния этого мутантного аллеля на продуцирование этилена и/или на время созревания и/или срок хранения. Растения, которые включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую такой мутантный белок *acs4* с утраченной функцией или белки с пониженной функцией, и которые продуцируют этилен на более низком уровне и/или имеют плоды с замедленным созреванием и/или с более длительным сроком хранения по сравнению с растениями *Solanum lycopersicum*, гомозиготными по аллелю *Acs4* дикого типа, могут быть получены, например, путем мутагенеза и идентифицированы методом TILLING или EcoTILLING, как известно специалистам в данной области. Кроме того, трансгенные методы могут быть применены для тестирования функциональных свойств *in vivo* мутантного аллеля *acs4*, кодирующего мутантный белок *acs4*. Мутантный аллель может быть функционально присоединен к промотору растения, и химерный ген может быть введен в растение томата путем трансформации. Регенерированные растения (или их потомство, полученное, например, посредством самоопыления), могут быть протестированы на продуцирование этилена и/или время созревания плодов и/или срок хранения. Так, например, растение томата, содержащее нефункциональный аллель *acs4*, может быть трансформировано для тестирования функциональных свойства трансгенного аллеля *acs4*.

Метод TILLING (локальные изменения в геноме, индуцированные таргетингом гена) представляет собой общую обратную генетику, в которой применяются традиционные методы химического мутагенеза для создания библиотек мутагенизированных индивидов с последующим высокоэффективным скринингом этих библиотек для поиска мутаций. Технология TILLING объединяет в себе химический мутагенез со скринингом мутаций в полученных ПЦР-продуктах и последующее выделение аллелей с миссенс-мутациями и нонсенс-мутациями целевых генов. Таким образом, в технологии TILLING применяется традиционный химический мутагенез (например, мутагенез с использованием EMS или MNU) или другие методы мутагенеза (например, облучение, а именно, УФ-облучение) с последующим высокоэффективным скринингом мутаций в специфических генах-мишенях, таких как *Acs4* согласно изобретению. Нуклеазы S1, такие как CEL1 или ENDO1, используются для расщепления гетеродуплексов мутантной ДНК-мишени и ДНК-мишени дикого типа, а также для детектирования продуктов расщепления с помощью, например, электрофореза, такого как электрофорез на системе гелевых анализаторов LICOR, см., например, Henikoff et al., *Plant Physiology* 2004, 135: 630-636. Метод TILLING применяется для растений многих видов, таких как томаты (см. [http://tilling.ucdavis.edu/index.php/Tomato\\_Tilling](http://tilling.ucdavis.edu/index.php/Tomato_Tilling)), рис (Till et al., 2007, *BMC Plant Biol.* 7:19), резушка Таля (Till et al., 2006, *Methods Mol. Biol.* 323: 127-35), капуста, кукуруза (Till et al., 2004, *BMC Plant Biol.* 4: 12) и т.п. Кроме того, широко известен метод EcoTILLING, который применяется для детектирования мутантных популяций, см. Till et al., 2006 (*Nat. Protoc.* 1:2465-77) и Comai et al., 2004 (*Plant J.* 37:778-86).

В одном из вариантов осуществления изобретения, последовательности нуклеиновых кислот (кДНК или геномной), кодирующие такие мутантные белки *acs4*, содержат одну или более нонсенс- и/или миссенс-мутаций, например, транзиции (замену пурина на другой пурин (A↔G) или пиримидина на другой пиримидин (C↔T) ) или трансверсии (замену пурина на пиримидин или наоборот (C/T↔A/G)). В одном варианте осуществления изобретения, нонсенс- и/или миссенс-мутация(и) присутствует(ют) в нуклеотидной последовательности, кодирующей любой из экзонов *Acs4*, а более предпочтительно, в крупном домене *ACS4*, или, по существу, в аналогичном домене варианта белка *Acs4*, то есть, в домене, содержащем аминокислоты, которые по меньшей мере на 80, 90, 95, 98, 99% идентичны аминокислотам 65-327 последовательности SEQ ID NO: 1 или ее вариантов.

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к нуклеотидной последовательности *acs4*, содержащей одну или более нонсенс- и/или миссенс-мутаций в одной экзон-кодирующей последовательности, а также к растению, содержащему такой мутантный аллель и продуцирующему этилен на

более низком уровне и/или имеющему плоды с замедленным созреванием и/или с более длительным сроком хранения по сравнению с растениями *Solanum lycopersicum*, гомозиготными по аллелю *Acs4* дикого типа.

В своем конкретном варианте, настоящее изобретение относится к растениям томата и к их частям (плодам, семенам и т.п.), содержащим мутантный аллель *acs4*, кодирующий белок с утраченной функцией или с пониженной функцией.

В одном из вариантов осуществления изобретения, белок *acs4* с утраченной функцией или белок *Acs4* с пониженной функцией представляет собой усеченный белок, то есть, фрагмент любого из белков *Acs4*, определенных выше (включая их варианты). В общих чертах, EMS (этилметансульфонат) индуцирует замены гуанин/цитозин на аденин/тимин. В случае глутамина (Gln или Q, кодируемого нуклеотидами кодонов CAA или CAG) или аргинина (Arg или R, кодируемого нуклеотидами кодона CGA), замена цитозина на тимин может приводить к введению стоп-кодона с сохранением рамки считывания (например, CAA/CAG/CGA на TAA/TAG/TGA) и с образованием усеченного белка.

Настоящее изобретение также относится к последовательностям нуклеиновой кислоты (геномной ДНК, κДНК, РНК), кодирующим белок *acs4* с утраченной функцией или белки *acs4* с пониженной функцией, например, *acs4*, представленный в последовательности SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; или в ее вариантах, определенных выше (включая любые химерные или гибридные белки или мутированные белки или усеченные белки). Из-за вырожденности генетического кода, различные последовательности нуклеиновой кислоты могут кодировать одну и ту же аминокислотную последовательность. Последовательностями нуклеиновых кислот согласно изобретению являются природные, искусственные или синтетические последовательности нуклеиновых кислот. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая *Acs4*, представлена в SEQ ID NO: 8 (κДНК дикого типа), GenBank, регистрационный номер M63491. Следует отметить, что если последовательности представляют собой последовательности ДНК, то соответствующая ей РНК означает нуклеотидную последовательность молекулы РНК, которая фактически идентична последовательности ДНК, и отличается лишь тем, что в ней вместо тимина (Т) присутствует урацил (U). Если в данном описании идет речь о нуклеотидных последовательностях (например, ДНК или РНК), то эти последовательности обозначены курсивом, например, "аллель *acs4*", а если речь идет о белках, то курсив не используется, например, "белок *acs4*". Мутанты обозначены строчными буквами (например, аллель *acs4* или белок *acs4*), а варианты дикого типа/функциональные формы начинаются с заглавной буквы (аллель *Acs4* или белок *Acs4*).

Кроме того, настоящее изобретение относится к последовательностям нуклеиновых кислот (геномной ДНК, κДНК, РНК), кодирующим мутантные белки *acs4*, то есть, белок с утраченной функцией или белок *acs4* с пониженной функцией, как описано выше, а также к растениям и к частям растений, включающим такие мутантные последовательности. Так, например, последовательности нуклеиновых кислот *acs4*, включающие одну или более нонсенс и/или миссенс-мутаций в кодирующей последовательности *Acs4* дикого типа, кодируют белок с утраченной функцией или с пониженной функцией *in vivo*. Настоящее изобретение также относится к последовательностям с другими мутациями, такими как мутации в сайте сплайсинга, то есть, мутации в геномной последовательности *acs4*, приводящие к aberrантному сплайсингу пре-мРНК, и/или мутации со сдвигом рамки считывания, и/или инсерции (например, инсерции транспозона), и/или делеции одной или более нуклеиновых кислот.

Очевидно, что для идентификации, синтеза или выделения вариантов или фрагментов последовательностей нуклеиновой кислоты *acs4* могут быть применены многие методы, такие как гибридизация нуклеиновых кислот, ПЦР-технологии, анализ *in silico*, синтез нуклеиновых кислот и т.п. Варианты SEQ ID NO: 8 могут кодировать белки дикого типа, функциональные белки *Acs4* или белки *acs4* с утраченной функцией или белки *Acs4* с пониженной функцией, полученные, например, путем мутагенеза, и/или идентифицированные такими методами, как TILLING или EcoTILLING, или другими методами.

Растение согласно изобретению может быть использовано в стандартной схеме селекции растений в целях получения большего числа растений с одинаковыми признаками, или в целях введения мутированного аллеля *acs4* в другие линии растений или сорта растений того же вида или родственных видов.

Трансгенные растения могут быть также получены с использованием мутантных нуклеотидных последовательностей *acs4* согласно изобретению известными методами трансформации и регенерации растений. Может быть отобран "элитный трансген", который представляет собой трансформированное растение, имеющее химерный ген (содержащий промотор, функционально присоединенный к нуклеотидной последовательности, кодирующей белок *acs4* с утраченной функцией или белок *Acs4* с пониженной функцией), встроенный в конкретный участок генома, в результате чего может быть получено растение с явно выраженным желаемым фенотипом.

Растения согласно изобретению, описанные выше, являются гомозиготными или гетерозиготными по мутантному аллелю *acs4*. Для создания растений, включающих мутантный аллель в гомозиготной форме, может быть осуществлено самоопыление. Мутантные аллели *acs4* согласно изобретению могут быть перенесены в любое другое растение томата традиционными методами селекции, такими как скрещивание, самоопыление, возвратное скрещивание и т.п. Таким образом, могут быть получены любые растения томата с замедленным созреванием и/или с более длительным сроком хранения, что обусловле-

но присутствием по меньшей мере одного мутантного аллеля *acs4* согласно изобретению. Так, например, может быть получено и/или идентифицировано любое растение *S. lycopersicum*, имеющее в своем геноме по меньшей мере один мутантный аллель *acs4* и продуцирующее белок *acs4* с утраченной функцией или пониженной активностью по сравнению с белком *Acs4* дикого типа. Таким образом, растением томата может быть любой культивируемый томат любого коммерческого сорта, любой выведенной линии или т.п., или томат детерминантного или недетерминантного сорта; томат, полученный в результате перекрестного опыления; или гибридный томат, дающий плоды любого цвета, любой формы и любого размера. Мутантный аллель, генерированный и/или идентифицированный в конкретном растении томата или в родственном растении томата, полученном путем полового скрещивания, может быть легко перенесен в любое другое растение томата путем селекции (скрещивания с растением, включающим мутантный аллель, с последующим отбором потомства, включающего этот мутантный аллель).

Присутствие или отсутствие мутантного аллеля *acs4* согласно изобретению в любом растении томата или в любой его части, и/или наследование этого аллеля в потомстве растений может быть определено фенотипически и/или молекулярными методами (например, путем детектирования присутствия или отсутствия нуклеотидной последовательности *acs4* или белка *acs4* с применением прямых или непрямых методов).

В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный аллель был создан или идентифицирован в культивируемом растении, однако, он может быть также создан и/или идентифицирован в растении дикого типа или в некультивируемом растении, а затем он может быть перенесен в культивируемое растение, например, путем скрещивания и отбора (необязательно, с применением межвидового скрещивания, например, методом "спасения" эмбриона для передачи мутантного аллеля). Таким образом, мутантный аллель *acs4* может быть создан (путем антропогенной мутации с применением методов мутагенеза для мутагенизации целевого гена *acs4* или его варианта) и/или идентифицирован (в спонтанном или природном аллельном варианте) в растениях *Solanum lycopersicum* или в других растениях семейства пасленовых (*Solanum*), включая, например диких родственников томата, таких как *S. cheesmanii*, *S. chilense*, *S. habrochaites* (*L. hirsutum*), *S. chmielewskii*, *S. Solanum lycopersicum* x *S. peruvianum*, *S. glandulosum*, *S. hirsutum*, *S. minutum*, *S. parviflorum*, *S. pennellii*, *S. peruvianum*, *S. peruvianum* var. *humifusum* и *S. pimpinellifolium*, а затем перенесен в культивируемое пасленовое растение, например, *Solanum lycopersicum*, традиционными методами селекции. Используемый здесь термин "традиционные методы селекции" включает скрещивание, самоопыление, отбор, продуцирование двойного гаплоида, "спасение" эмбриона, слияние протопластов, перенос посредством мостиковых молекул и т.п., известные селекционерам, то есть, методы, отличающиеся от методов генетической модификации, посредством которых могут быть перенесены аллели.

В другом варианте осуществления изобретения растение, содержащее мутантный аллель *acs4* (например, растение томата), скрещивают с другим растением того же вида или близкородственного вида для получения гибридных растений (гибридных семян), содержащих мутантный аллель *acs4*. Такое гибридное растение также является вариантом настоящего изобретения.

В одном из своих вариантов настоящее изобретение относится к семенам гибридного растения томата F1 (то есть, семенам, из которых могут быть выращены гибридные растения томата F1), содержащим по меньшей мере один аллель *acs4* согласно изобретению. Гибридные семена F1 представляют собой семена, полученные путем скрещивания двух инбредных родительских растений томата. Такой гибрид F1 может содержать один или два мутантных аллеля *acs4* согласно изобретению. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения, растением согласно изобретению является родительское растение, используемое для продуцирования гибрида F1, плоды которого характеризуются пониженным уровнем этилена и/или замедленным созреванием и/или более длительным сроком хранения, чем *Acs4/Acs4*-растения дикого типа.

Настоящее изобретение также относится к способу переноса мутантного аллеля *acs4* в другое растение, где указанный способ включает получение растения, содержащего в своем геноме мутантный аллель *acs4*, сообщающий плодам такие свойства, как пониженный уровень продуцирования этилена и/или замедленное созревание плодов и/или более длительный срок их хранения по сравнению с растением *Solanum lycopersicum*, гомозиготным по аллелю *Acs4* дикого типа (как описано выше); скрещивание указанного растения с другим растением; и получение семян указанного кросса. Растения, выращенные из этих семян, могут быть, но необязательно, подвергнуты дополнительному самоопылению и/или скрещиванию и отбору потомства, имеющего мутантный аллель и дающего плоды с замедленным созреванием и/или с более длительным сроком хранения и/или с пониженным уровнем продуцирования этилена, что обусловлено присутствием мутантного аллеля по сравнению с растениями, содержащими аллель *Acs4* дикого типа.

Как уже упоминалось выше, для создания мутантных растений согласно изобретению в равной степени могут быть применены и другие методы мутагенеза и/или отбора. Семена могут быть, например, подвергнуты облучению или химической обработке с получением мутантных популяций. Для скрининга мутагенизированных популяций растений с мутантными аллелями может быть также применен прямой метод секвенирования гена *acs4*. Так, например, скрининг KeyPoint представляет собой метод на основе

последовательностей, который может быть применен для идентификации растений, содержащих мутантные аллели *acs4* (Rigola et al., PloS One, March 2009, Vol. 4(3):e4761).

Таким образом, настоящее изобретение относится к нетрансгенным мутантным растениям томата, в плодах которых продуцируются более низкие уровни белка *Acs4* дикого типа или полностью отсутствует белок *Acs4* дикого типа, а также продуцируется белок *acs4* с утраченной функцией или белок *Acs4* с пониженной функцией, что обусловлено присутствием одной или более мутаций в одном или более эндогенных аллелях *acs4*. Эти мутанты могут быть получены методами мутагенеза, такими как метод TILLING или его варианты, либо эти мутанты могут быть идентифицированы методом EcoTILLING или любым другим методом. Аллели *Acs4*, кодирующие белок *acs4* с утраченной функцией или белок *Acs4* с пониженной функцией, могут быть выделены и секвенированы, либо они могут быть перенесены в другие растения традиционными методами селекции.

Настоящее изобретение относится к любой части растения или его потомства, включая собранные плоды, собранные ткани или органы, семена, пыльцу, цветки, завязи и т.п., содержащие в своем геноме мутантный аллель *acs4* согласно изобретению. Настоящее изобретение также относится к клеточным или тканевым культурам растений, содержащих в своем геноме мутантный аллель *acs4*. Предпочтительно, клеточные или тканевые культуры растений могут быть регенерированы в целые растения, содержащие в своем геноме мутантный аллель *acs4*. В объем настоящего изобретения также входят двойные гаплоидные растения (и семена, из которых могут быть выращены двойные гаплоидные растения), полученные посредством удвоения гаплоидных клеток хромосом, содержащих мутантный аллель *acs4*, и гибридные растения (и семена, из которых могут быть выращены эти гибридные растения), содержащие в своем геноме мутантный аллель *acs4*, где указанные двойные гаплоидные растения и гибридные растения дают плоды с замедленным созреванием и/или с более длительным сроком хранения согласно изобретению.

Предпочтительно, чтобы мутантные растения также обладали другими хорошими агрономическими свойствами, то есть, предпочтительно, чтобы их урожайность и/или качество плодов не снижались по сравнению с растениями дикого типа. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, таким растением является растение томата, а плодами являются плоды томата, такие как переработанные томаты; и томаты, потребляемые в свежем виде и имеющие любую форму, любой размер или цвет. Таким образом, настоящее изобретение также относится к заготовленным продуктам из растений или из их частей, содержащих один или два мутантных аллеля *acs4*. Такими продуктами являются переработанные продукты, такие как томатная паста, кетчуп, томатный сок, нарезанные помидоры, консервированные плоды, высушенные плоды, очищенные плоды и т.п. Эти продукты могут быть идентифицированы по мутантному аллелю в их геномной ДНК.

#### Депонирование семян

Репрезентативные образцы семян пяти мутантов растений томата TILLING, описанные в примере 1, были депонированы Nunhems B.V. 21 августа 2012 в NCIMB Ltd. (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn Aberdeen, Scotland AB21 9YA, UK) в соответствии с Будапештским договором и согласно решению Экспертизы (EPC 2000, Rule 32(1)). Этим семенам были присвоены нижеследующие депозитарные номера: NCI MB 42034 (мутант 2477), NCIM 42037 (мутант 4043), NCIMB 42038 (мутант 4222), NCIMB 42039 (мутант 4691), NCIMB 42041 (мутант 5251).

Заявители требуют, чтобы образцы биологического материала и любого полученного из него материала выдавались только экспертам в соответствии со статьей 32(1) EPC (Европейской патентной конвенции) или согласно государственному законодательству или в соответствии с международными договорами, которые имеют аналогичные правовые и регуляторные нормы, до тех пор, пока не появится информация о выдаче патента, или в течение 20 лет с даты подачи заявки, если заявка отклонена, отозвана или считается отозванной.

Депозит будет доступен на время рассмотрения заявки лицом, определяемым директором Патентного ведомства США, который дает право доступа к данному депозиту по запросу. В соответствии с статьей 37 Кодекса законов США (C.F.R.) § 1.808(b), все ограничения, налагаемые вкладчиком на общедоступность депонированного материала, будут окончательно сняты после выдачи патента. Депозит будет сохраняться в течение 30 лет или в течение 5 лет после последнего запроса, или на протяжении всего срока действия патента, независимо от его продолжительности, и он может быть заменен, если в течение этого периода времени он не потеряет свою юридическую силу. Заявитель не отказывается от прав на выдачу патента на эту заявку или прав на защиту в соответствии с законом о защите прав селекционеров (7 USC 2321 и т.п.).

#### Примеры

##### Общие методы

Продукты ПЦР-амплификации были непосредственно секвенированы обслуживающей компанией (BaseClear, The Netherlands, <http://www.baseclear.com/>) с использованием тех же праймеров, которые были использованы для амплификации. Полученные последовательности были выровнены с помощью компьютерной программы (CLC Bio Main Work Bench, Denmark, [www.clcbio.com](http://www.clcbio.com)) для идентификации нуклеотидных модификаций.

##### Материалы

Для анализа и мутагенеза использовали водопроводную воду, отфильтрованную на интегральной системе Milli-Q, в которой используется вода Milli-Q типа Reference A+, и которая снабжена картриджем Q-gard T2 и картриджем Quantum TEX. Сопротивление воды составляло  $\geq 18$  МОм.

Этилметансульфонат (EMS) (чистый) был получен от Sigma, номер продукта M0880.

Определение созревания томатов и/или срока их годности или времени хранения

Созревание томатов и/или срок их годности или время хранения могут быть определены различными методами, известными специалистам, такими как, например, периодическая визуальная оценка плодов и/или измерение упругости или мягкости плодов, определение содержания ликопина в плодах томатов; оценка уровня продуцирования этилена этими плодами; определение цвета плодов или любой альтернативный метод или комбинация таких методов. Упругость плодов может быть, например, измерена путем оценки резистентности к деформации, выраженной в мм, например, 0,1 мм, и измеряемого на пенетрометре, снабженном подходящим зондом (например, 3 мм-зондом) (Mutschler et al., 1992, Hortic Science 27 pp 352-355) (Marinez et al 1995 Acta Horticulturae 412 pp 463-469). Специалистам известны и альтернативные методы, например, методы, проводимые с использованием текстурометра (Bui et al., 2010; International Journal of Food Properties, Volume 13, Issue 4).

Окраска плодов может быть классифицирована по стандартам США для оценки качества свежих помидоров (U.S. Dept of Agriculture, 1973, US standards for grades of fresh tomatoes, U.S. Dept Agr. Agr. Mktg. Serv., Washington D.C.) путем определения цвета на хромометре (Mutschler et al., 1992, Hortic Science 27 pp. 352-355) или путем сравнения цвета по цветовой шкале, утвержденной Королевским садоводческим обществом (RHS) ([www.rhs.org.uk](http://www.rhs.org.uk)).

Содержание ликопина может быть определено по снижению объемов органических растворителей методом, описанным Fish et al. (A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. J. Food Compos. Anal. 2002. 15, 309-317). Этот метод может быть применен для определения содержания ликопина непосредственно на неповрежденных плодах томатов с одновременной оценкой основных физико-химических свойств: цвета, упругости, содержание растворимых твердых веществ, кислотности и pH (Clement et al., J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 9813-9818).

Высвобождение этилена можно определить, поместив плоды в закрытое пространство, например, в 0,5-литровый стеклянный резервуар. Через один час, из этого резервуара может быть извлечен один миллилитр атмосферы, и количество продуцированного газа этилена может быть определено на газовом хроматографе (например, на Hewlett-Packard 5890), снабженном соответствующим устройством для детектирования, например, пламенно-ионизационным детектором и соответствующей колонкой (например, 3 м-колонкой из нержавеющей стали с внутренним диаметром 3,5 мм, содержащей активированную окись алюминия 80/100 меш). Продуцирование этилена может быть выражено как количество этилена (в нл), выделяемого на грамм плодов в час ( $\text{нл} \times \text{г}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$ ) (Marinez et al., 1995 Acta Horticulturae 412 pp. 463-469).

Альтернативно, продуцирование этилена может быть оценено как описано ниже путем измерения уровня этилена в реальном времени на лазерном детекторе (ETD-300, Sensor Sense B.V., Nijmegen, the Netherlands), снабженном механической системой обработки газов (Cristecu et al., 2008).

Пример 1. Мутагенез.

В высокой степени гомозиготную инбредную линию, используемую для коммерческой переработки выведенных томатов, подвергали мутагенезу в соответствии с нижеследующим протоколом. После проращивания семян на влажной бумаге Whatman® в течение 24 ч, ~20000 семян, разделенных на 8 партий по 2500 соответственно, замачивали в 100 мл ультрачистой воды и этилметансульфоната (EMS) в концентрации 1% в конических колбах. Эти колбы осторожно встряхивали в течение 16 ч при комнатной температуре. И наконец, EMS промывали проточной водой. После EMS-обработки, семена непосредственно высевали в теплицу. Из 60% проросших семян, 10600 саженцев были высажены в поле. Из этих 10600 саженцев, 1790 были либо стерильными, либо погибали еще до появления плодов. От каждого оставшегося мутантного растения M1 брали по одному плоду и выделяли семена. Полученная популяция, названная популяцией M2, состояла из 8810 семян, каждая партия которых представляла собой одно семейство M2. Из этих семейств, 585 семейств были исключены из популяции из-за низкого уровня семенных завязей.

ДНК выделяли из пула, состоящего из 10 семян, взятых из каждой партии семян M2. В мутантной линии, 10 семян объединяли в пробирках Micronic® deerwell (<http://www.micronic.com>) 96-луночного планшета с глубокими лунками, где в каждую пробирку были добавлены 2 шарика из нержавеющей стали. Пробирки и семена замораживали в жидком азоте в течение 1 мин, а затем семена сразу измельчали в мелкий порошок на шейкере Deerwell (Vaskon 96 grinder, Belgium; <http://www.vaskon.com>) в течение 2 мин на 16,8 Гц (80% от максимальной скорости). В планшет с образцами добавляли 300 мкл буфера Р для лизиса Agowa®, взятого из набора для выделения ДНК растений AGOWA® <http://www.agowa.de>, и порошок суспендировали в растворе при встряхивании в течение 1 мин на 16,8 Гц в шейкере Deerwell. Планшеты центрифугировали в течение 10 мин при 4000 оборотов в минуту. 75 мкл супернатанта пипетировали в 96-луночный планшет Kingfisher, находящийся на платформе Janus MDT® (Perkin Elmer,

USA; <http://www.perkinelmer.com>) (с головкой 96-го калибра). Следующие стадии проводили на жидкостном роботе Perkin Elmer Janus®, управляемом вручную, и на 96 Kingfisher® (Thermo labsystems, Finland; <http://www.thermo.com>).

Супернатант, содержащий ДНК, разводили буфером для связывания (150 мкл) и магнитными сферами (20 мкл). После связывания ДНК со сферами проводили две последовательные стадии промывки (промывочным буфером 1: промывочным буфером Agowa 1, 1/3; этанолом 1/3; изопропанолом 1/3; промывочным буфером 2: 70% этанолом, 30% промывочным буфером Agowa 2) и, наконец, элюировали элюирующим буфером (100 мкл MQ, 0,025 мкл твина).

После измельчения десяти семян *S.lycopersicum*, продуцирующих достаточное количество ДНК для насыщения магнитных сфер, были получены в высокой степени гомогенные и сопоставимые концентрации ДНК всех образцов. Каждый образец оценивали путем сравнения с эталонной ДНК-лямбда в концентрации 30 нг/мкл. Двукратно разведенная ДНК имела 4-складчатую структуру. 2 мкл собранной ДНК использовали в мультиплексных ПЦР для проведения анализа на присутствие мутаций.

Праймеры, используемые для амплификации генных фрагментов в целях проведения анализа HRM, конструировали с помощью компьютерной программы (Primer3, <http://primer3.sourceforge.net/>). Длина продукта амплификации ограничена 200-400 парами оснований. Качество праймеров определяли путем анализа с помощью ПЦР-реакции, которая должна обеспечивать выход одного продукта.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для амплификации генных фрагментов. 10 нг геномной ДНК смешивали с 4 мкл реакционного буфера (5× реакционного буфера), 2 мкл 10×LC красителя ((LCGreen+ dye, Idaho Technology Inc., UT, USA), 5 пмоль каждого прямого и обратного праймеров, 4 нмоль dNTPs (Life Technologies, NY, USA) и 1 единицей ДНК-полимеразы (ДНК-полимеразы "горячего старта" II) в общем объеме 10 мкл. Реакцию проводили в следующих условиях: 30 с при 98°C, а затем 40 циклов: 10 с при 98°C, 15 с при 60°C, 25 с при 72°C, и, наконец, 60 с при 72°C.

Было подтверждено, что высокоразрешающий анализ кривой плавления (HRM) является чувствительным и высокоэффективным методом, применяемым в генетике человека и растений. HRM представляет собой метод неферментативного скрининга. В процессе ПЦР-амплификации, молекулы красителя ((LCGreen+ dye, Idaho Technology Inc., UT, USA) интеркалируются между каждой гибридной парой оснований в двухцепочечной молекуле ДНК. При захвате красителя молекулой, краситель, после его возбуждения на 470 нм, испускает флуоресцентное излучение на 510 нм. Камера, установленная во флуоресцентном детекторе (LightScanner, Idaho Technology Inc., UT, USA), регистрирует интенсивность флуоресценции, при этом, образец ДНК постепенно нагревается. При температуре, от которой зависит последовательность-специфическая стабильность спиралей ДНК, двухцепочечный ПЦР-продукт начинает плавиться, что приводит к высвобождению красителя. Высвобождение красителя приводит к снижению интенсивности флуоресценции, которая регистрируется на кривой плавления посредством флуоресцентного детектора. Пулы, содержащие мутацию, образуют гетеродуплексы в смеси фрагментов после ПЦР. Эти фрагменты идентифицируют по дифференциальным кривым температуры плавления по сравнению с гомодуплексами.

Были отобраны мутанты с замедленным созреванием, и был определен тип мутации в гене *acs4*.

Наличие конкретной мутации в отдельных растениях было подтверждено путем повторного проведения HRM-анализа на ДНК, происходящей от соответствующим образом идентифицированного ДНК-пула отдельных партий семян M2. После подтверждения наличия мутаций, идентифицированных исходя из HRM-профиля, в одном из четырех образцов ДНК отдельного семейства M2, ПЦР-фрагменты были секвенированы для идентификации мутации в гене.

После обнаружения мутации, эффект такой мутации был предсказан с помощью компьютерной программы CODDLe (для поиска кодонов в целях оптимизации выявления нежелательных повреждений, <http://www.proweb.org/coddle/>), которая позволяет идентифицировать область(и) выбранного пользователем гена и его кодирующую последовательность, где предполагаемые точечные мутации с наибольшей вероятностью оказывают негативное влияние на генную функцию.

Семена от семейств M2, которые содержат мутации с прогнозируемым влиянием на активность белка, высевали для определения фенотипа растений.

Гомозиготные мутанты были отобраны или получены после самоопыления и последующего отбора. Затем определяли влияние мутации на соответствующий белок и фенотип растения.

Семена, содержащие различные идентифицированные мутации, проращивали, и растения культивировали в горшках с почвой для теплиц в режиме день/ночь = 16/8 при ночной температуре 18°C и при дневной температуре 22-25°C. Для каждого генотипа было получено 5 растений. Для анализа использовали второе, третье и четвертое соцветие. Соцветия обрезали, оставляя шесть цветков в соцветии, что позволяло получить плоды путем самоопыления. Время созревания плодов от первого и шестого цветка регистрировали как дату побурения и покраснения первого и шестого плода. На стадии побурения шестого плода, срезанную кисть хранили в открытом ящике в теплице. Состояние плодов регистрировали в течение всего периода созревания.

На более поздних стадиях, состояние плодов определяли путем их визуальной оценки, и регистри-

ровали дату, когда самый старый плод становился "испорченным", а затем регистрировали повреждения плода (определяемые путем оценки мягкости плода посредством протыкания плодов и визуальной оценки дегидратации/обезвоживания, повреждения кожуры и поражения грибом).

Были идентифицированы следующие мутанты: мутант 2477, мутант 4043, мутант 4222, мутант 4691 и мутант 5251, и семена были депонированы в NCIMB под регистрационными номерами, указанными выше.

В SEQ ID NO: 8 представлена кДНК Acs4 дикого типа, которая соответствует последовательности белка, представленной в SEQ ID NO: 1.

Мутант 2477 (NCIMB 42034).

В мутанте 2477, нуклеотид G в положении 836 заменен на A, как показано в SEQ ID NO: 9, если считать от A в старт-кодоне ATG в положении нуклеотида 1. Эта мутация приводит к замене серина на аспарагин в положении аминокислоты 279 в экспрессированном белке. Мутация S279N локализована в крупном домене белка ACS4. Последовательность мутантного белка 2477 представлена в SEQ ID NO: 2.

Мутант 4043 (NCIMB 42037).

В мутанте 4043, нуклеотид C в положении 743 заменен на T, как показано в SEQ ID NO: 10, если считать от A в старт-кодоне ATG в положении нуклеотида 1. Эта мутация приводит к замене аланина на валин в положении аминокислоты 248 в экспрессированном белке. Мутация A2 4 8V локализована в крупном домене белка ACS4. Последовательность мутантного белка 4043 представлена в SEQ ID NO: 3.

Мутант 4222 (NCIMB 42038).

В мутанте 4222, нуклеотид A в положении 610 заменен на T, как показано в SEQ ID NO: 11, если считать от A в старт-кодоне ATG в положении нуклеотида 1. Мутация A610T приводит к замене лизинового кодона (AAA) на стоп-кодон (TAA), и к образованию усеченного белка, состоящего из 203 аминокислотных остатков, во время трансляции, тогда как нативный белок имеет 476 аминокислотных остатков. Последовательность усеченного мутантного белка 4222 представлена в SEQ ID NO: 4.

Мутант 4303.

В мутанте 4303, нуклеотид G в положении 963 заменен на T, как показано в SEQ ID NO: 12, если считать от A в старт-кодоне ATG в положении нуклеотида 1. Эта мутация приводит к замене лейцина на фенилаланин в положении аминокислоты 321 в экспрессированном белке. Мутация L321F локализована во втором небольшом домене белка ACS4. Последовательность мутантного белка 4303 представлена в SEQ ID NO: 5.

Мутант 4691 (NCIMB 42039).

В мутанте 4691, нуклеотид T в положении 749 заменен на A, как показано в SEQ ID NO: 13, если считать от A в старт-кодоне ATG в положении нуклеотида 1. Эта мутация приводит к замене валина на глутаминовую кислоту в положении аминокислоты 250 в экспрессированном белке. Мутация V250E локализована в крупном домене белка ACS4. Последовательность мутантного белка 4691 представлена в SEQ ID NO: 6.

Мутант 5251 (NCIMB 42041).

В мутанте 5251, нуклеотид C в положении 947 заменен на T, как показано в SEQ ID NO: 14, если считать от A в старт-кодоне ATG в положении нуклеотида 1. Эта мутация приводит к замене треонина на изолейцин в положении аминокислоты 316 в экспрессированном белке. Мутация T316I локализована во втором небольшом домене белка ACS4. Последовательность мутантного белка 5251 представлена в SEQ ID NO: 7.

Растения, содержащие мутации в последовательности-мишени, например, вышеуказанные мутантные растения или происходящие от них растения (полученные, например, путем самоопыления или скрещивания) и растения, включающие мутантный аллель acs4, обнаруживали нормальный вегетативный рост всех частей по сравнению с растениями дикого типа, за исключением созревания плодов томатов. Растения, содержащие мутации в последовательности-мишени, скринировали на их фенотип в отношении созревания плодов, продуцирования этилена и срока хранения.

Пример 2. Характер созревания acs4-мутантов.

Семена, содержащие различные мутации, проращивали, и растения культивировали в горшках с почвой для теплиц в режиме день/ночь = 16/8 при ночной температуре 18°C и при дневной температуре 22-25°C. Для каждого генотипа было получено 5 растений. Для анализа использовали второе, третье и четвертое соцветие. Соцветия обрезали, оставляя шесть цветков в соцветии, что позволяло получить плоды путем самоопыления. Дату созревания плодов от первого и шестого цветка регистрировали как дату побурения и покраснения первого и шестого плода. На стадии покраснения 4-го плода, срезанную кисть хранили в открытом ящике в теплице. Состояние плодов регистрировали в течение всего периода созревания по фотографии каждой ветви. После сбора урожая делали фотографии растений в ящиках, содержащих все ветви растений одного генотипа.

На более поздних стадиях, состояние плодов определяли путем их визуальной оценки, и регистрировали дату, когда самый старый плод становился "испорченным", а затем регистрировали повреждения плода (определяемые путем оценки мягкости плода посредством протыкания плодов и визуальной оценки дегидратации/обезвоживания, повреждения кожуры и поражения грибом).

Характер созревания плодов проиллюстрирован на фиг. 3. В день, когда первый плод растения дикого типа становился бурым, регистрировали как день 1. И от этого дня отсчитывали последующие дни. Мутанты обнаруживали задержку в созревании, то есть, мутантам требовалось больше дней до достижения стадии покраснения плодов. В частности, мутанты 2477 и 4222 обнаруживали значительную задержку в созревании в несколько дней. Мутанту 4222, для перехода первого плода от состояния побурения до 100%-го покраснения требовалось больше времени.

Плоды растений согласно изобретению отличались тем, что у них стадия побурения начиналась позже (например, мутанты 2477, 4222, 4691, 5251). Характеристики плодов после сбора урожая приводятся ниже.

	Первый побуревший плод на день №	Все побуревшие плоды на день №	Первый покрасневший плод на день №	100%-ое покраснение плодов на день №
Дикого типа	1	25	2	27
2477 Но	11	35	14	39
4043 Но	1	24	6	29
4222 Но	11	39	16	46
4691 Но	8	32	10	35
5251 Но	8	24	41	28

Как видно из таблицы, стадия побурения мутантных плодов наступает позже (за исключением мутанта 4043), и время побурения всех плодов также наступает позже (за исключением мутанта 4043). Аналогичным образом, мутантные плоды вступают в стадию покраснения позже, и время покраснения всех плодов мутантной линии наступает гораздо позже, чем у растений дикого типа.

Пример 3. Высвобождение этилена.

Этилен, высвобождаемый плодами растений томата, измеряли в режиме реального времени на лазерном детекторе этилена (ETD-300, Sensor Sense B.V., Nijmegen, the Netherlands), снабженном механической системой обработки газов (Cristecu et al., Laser-based systems for trace gas detection in life sciences. Appl. Phys. B 2008; 92 pp. 343-9). В эксперименте использовали шесть стеклянных кювет (объемом 100 мл), причем, одна из них не содержала растительного материала и была использована в качестве контроля. Из лаборатории брали пробы воздуха и пропускали через платиновый катализатор (Sensor Sense B.V., Nijmegen, the Netherlands) для удаления следовых количеств этилена или других углеводородов. Между образцом и детекторами-скрубберами были введены KOH и CaCl<sub>2</sub> для уменьшения концентрации CO<sub>2</sub> (до менее, чем 1 м.д.) и снижения содержания воды в потоке газа, соответственно.

При сравнении уровней высвобождения этилена плодами мутантов 2477, 4043, 4222 и 5251 и плодами растений дикого типа (коммерческого сорта Тара) на стадии появления розового цвета и на стадии покраснения плодов было обнаружено, что на обеих стадиях, все мутанты продуцировали более низкий уровень этилена, чем растения дикого типа (коммерческий сорт Тара). Мутант 4303 на стадии появления розового цвета продуцировал на 28% меньше этилена, чем растение дикого типа, а мутанты 2477, 4043 и 4222 продуцировали на 50-60% меньше этилена, чем растение дикого типа. Мутант 5251 на стадии появления розового цвета продуцировал на более, чем 80% меньше этилена чем растение дикого типа, то есть, <1,0 нл/(ч×г) против 4,8 нл/(ч×г) для дикого типа. На стадии покраснения плодов, различия в продуцировании этилена были еще более значимыми, а именно, мутант 4303 на стадии покраснения продуцировал на 42% меньше этилена, чем растение дикого типа, а мутанты 2477, 4043 и 4222 продуцировали на 48-74% меньше этилена, чем растение дикого типа. Мутант 5251 на стадии покраснения продуцировал на более, чем 82% меньше этилена, чем растение дикого типа. Сокращение нл/(ч×г) означает нанолитры/час на грамм плода.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Культивируемое растение вида *Solanum lycopersicum*, включающее аллель 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота-синтазы 4 (*acs4*), имеющий одну или более мутаций, где указанные мутации приводят к синтезу мутантного белка *Acs4* с утраченной функцией или с пониженной функцией по сравнению с белком *Acs4* дикого типа и обеспечивают снижение уровня образования этилена, и/или замедление созревания плодов, и/или увеличение срока их хранения по сравнению с плодами растения *Solanum lycopersicum*, которое является гомозиготным по аллелю *ACS4* дикого типа; где указанная утрата функции или снижение функции мутантного белка *Acs4* обусловлены делецией, заменой и/или инсерцией одной или более аминокислот 65-327 последовательности SEQ ID NO: 1.

2. Культивируемое растение по п.1, где указанная мутация или указанные мутации приводят к тому, что 10% плодов томата достигают стадии покраснения по меньшей мере на 2 дня дольше, чем плоды растения *Solanum lycopersicum*, которое является гомозиготным по аллелю *ACS4* дикого типа.

3. Культивируемое растение по любому из пп.1, 2, где указанная мутация или указанные мутации приводят к образованию плодов томата указанного растения, в которых уровень образования этилена снижен на 20% по сравнению с растением *Solanum lycopersicum*, которое является гомозиготным по аллелю ACS4 дикого типа.

4. Растение по любому из пп.1-3, где указанный мутантный белок Acs4 имеет аминокислотные остатки 33-62 и/или 339-438 последовательности SEQ ID NO: 1.

5. Растение по любому из предшествующих пунктов, где указанные утрата функции или снижение функции мутантного белка Acs4 обусловлены заменой одной или более аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из Ala248, Val250, Ser279, Thr316 и Leu321 белка Acs4 дикого типа, на другую аминокислоту.

6. Растение по любому из пп.1-3 или 5, где в указанном мутантном белке Acs4 дополнительно отсутствуют все аминокислоты от 204 до 476 последовательности SEQ ID NO: 1.

7. Растение по п.5, где указанный мутантный белок Acs4 имеет одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из A248V, S279N, L321F, V250E и T316I.

8. Растение по пп.1-7, где указанным растением является гибридное растение F1, полученное путем скрещивания двух инбредных родительских линий.

9. Плод томата, семена или пыльца растения по любому из пп.1-8, содержащие аллель ACS4, имеющий одну или более мутаций, где указанные мутации приводят к синтезу мутантного белка Acs4 с утраченной функцией или с пониженной функцией по сравнению с белком Acs4 дикого типа; где указанный плод томата имеет сниженный уровень образования этилена, и/или замедленное созревание, и/или увеличенный срок хранения по сравнению с плодами растения *Solanum lycopersicum*, которое является гомозиготным по аллелю ACS4 дикого типа; где указанная утрата функции или снижение функции мутантного белка Acs4 обусловлены делецией, заменой и/или инсерцией одной или более аминокислот в положении 65-327 последовательности SEQ ID NO: 1.

10. Плод по п.9, срок хранения которого по меньшей мере на 2 дня превышает срок хранения плода томата, гомозиготного по аллелю ACS4 дикого типа.

11. Плод по п.9, где образование этилена по меньшей мере на 15% снижено по сравнению с растением *Solanum lycopersicum*, которое является гомозиготным по аллелю ACS4 дикого типа.

12. Пищевой продукт, содержащий или состоящий из плодов по любому из пп.9-11 или частей указанного плода.

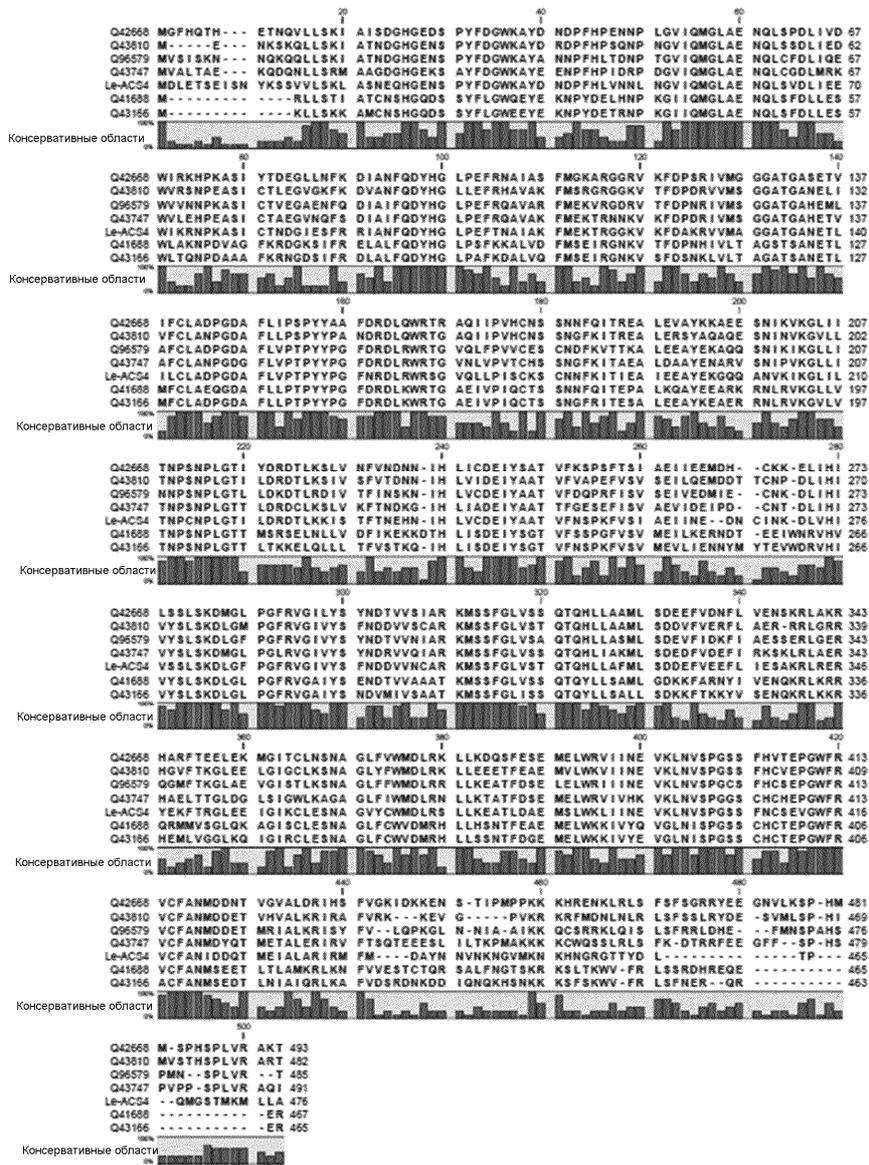
13. Потомство растения по любому из пп.1-8, содержащее аллель acs4, имеющий одну или более мутаций, где указанные мутации приводят к синтезу мутантного белка Acs4 с утраченной функцией или с пониженной функцией по сравнению с белком Acs4 дикого типа; где указанный плод томата имеет сниженный уровень образования этилена, и/или замедленное созревание, и/или увеличенный срок хранения по сравнению с плодами растения *Solanum lycopersicum*, которое является гомозиготным по аллелю ACS4 дикого типа; где указанная утрата функции или снижение функции мутантного белка Acs4 обусловлены делецией, заменой и/или инсерцией одной или более аминокислот в положении 65-327 последовательности SEQ ID NO: 1.

14. Способ получения гибридного растения *Solanum lycopersicum*, где указанный способ включает:

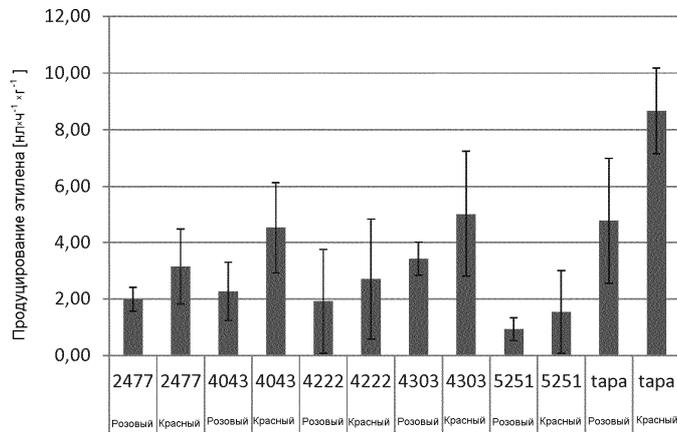
(a) получение первого растения *Solanum lycopersicum* по любому из пп.1-8 или из семян по п.9;

(b) скрещивание указанного первого растения *Solanum lycopersicum* со вторым растением *Solanum lycopersicum* с получением гибридных семян; где указанное гибридное растение *Solanum lycopersicum*, выращенное из указанных гибридных семян, содержит аллель ACS4, имеющий одну или более мутаций, где указанные мутации приводят к синтезу мутантного белка Acs4 с утраченной функцией или с пониженной функцией по сравнению с белком Acs4 дикого типа и обеспечивают снижение уровня образования этилена и/или замедление созревания плодов и/или увеличение срока их хранения по сравнению с плодами растения *Solanum lycopersicum*, которое является гомозиготным по аллелю ACS4 дикого типа; где указанная утрата функции или снижение функции мутантного белка acs4 обусловлены делецией, заменой и/или инсерцией одной или более аминокислот 65-327 последовательности SEQ ID NO: 1.

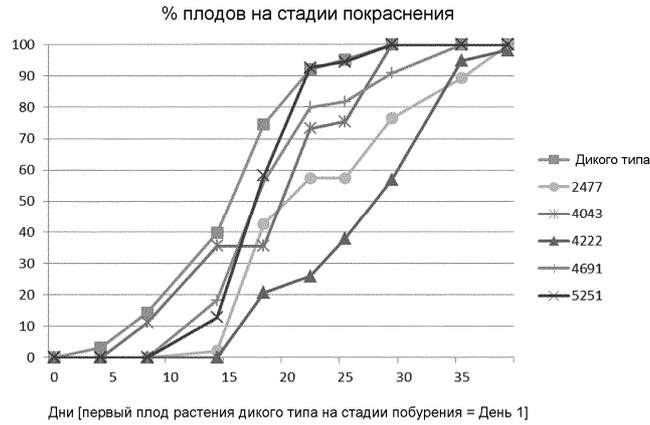
15. Пищевой продукт, содержащий или состоящий из плодов растения, полученного способом по п.14 или частей указанного плода.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

## Небольшой домен

ACS4_WT_ID1	MDLETSEISN YKSSVLSKL ASNEQHGENS PYFDGWKAYD <u>NDPFFLVNNL</u> 50
ACS4_2477_ID2	MDLETSEISN YKSSVLSKL ASNEQHGENS PYFDGWKAYD NDPFFLVNNL
ACS4_4043_ID3	MDLETSEISN YKSSVLSKL ASNEQHGENS PYFDGWKAYD NDPFFLVNNL
ACS4_4222_ID4	MDLETSEISN YKSSVLSKL ASNEQHGENS PYFDGWKAYD NDPFFLVNNL
ACS4_4303_ID5	MDLETSEISN YKSSVLSKL ASNEQHGENS PYFDGWKAYD NDPFFLVNNL
ACS4_4691_ID6	MDLETSEISN YKSSVLSKL ASNEQHGENS PYFDGWKAYD NDPFFLVNNL
ACS4_5251_ID7	MDLETSEISN YKSSVLSKL ASNEQHGENS PYFDGWKAYD NDPFFLVNNL

## Крупный домен

ACS4_WT_ID1	<u>NGVIQMGLAE NQLSVDLIEE WIKRNP KASI CTNDGIESFR RIANFQDYHG</u> 100
ACS4_2477_ID2	NGVIQMGLAE NQLSVDLIEE WIKRNP KASI CTNDGIESFR RIANFQDYHG
ACS4_4043_ID3	NGVIQMGLAE NQLSVDLIEE WIKRNP KASI CTNDGIESFR RIANFQDYHG
ACS4_4222_ID4	NGVIQMGLAE NQLSVDLIEE WIKRNP KASI CTNDGIESFR RIANFQDYHG
ACS4_4303_ID5	NGVIQMGLAE NQLSVDLIEE WIKRNP KASI CTNDGIESFR RIANFQDYHG
ACS4_4691_ID6	NGVIQMGLAE NQLSVDLIEE WIKRNP KASI CTNDGIESFR RIANFQDYHG
ACS4_5251_ID7	NGVIQMGLAE NQLSVDLIEE WIKRNP KASI CTNDGIESFR RIANFQDYHG
ACS4_WT_ID1	<u>LPEFTNAIAK FMEKTRGGKV KFDAKRVVMA GGATGANETL ILCLADPGDA</u> 150
ACS4_2477_ID2	LPEFTNAIAK FMEKTRGGKV KFDAKRVVMA GGATGANETL ILCLADPGDA
ACS4_4043_ID3	LPEFTNAIAK FMEKTRGGKV KFDAKRVVMA GGATGANETL ILCLADPGDA
ACS4_4222_ID4	LPEFTNAIAK FMEKTRGGKV KFDAKRVVMA GGATGANETL ILCLADPGDA
ACS4_4303_ID5	LPEFTNAIAK FMEKTRGGKV KFDAKRVVMA GGATGANETL ILCLADPGDA
ACS4_4691_ID6	LPEFTNAIAK FMEKTRGGKV KFDAKRVVMA GGATGANETL ILCLADPGDA
ACS4_5251_ID7	LPEFTNAIAK FMEKTRGGKV KFDAKRVVMA GGATGANETL ILCLADPGDA

032843

ACS4\_WT\_ID1 FLVPTPYYPG FNRDLRWRSQ VQLLPISCKS CNNFKITIEA IEEAYEKGGQ 200

ACS4\_2477\_ID2 FLVPTPYYPG FNRDLRWRSQ VQLLPISCKS CNNFKITIEA IEEAYEKGGQ

ACS4\_4043\_ID3 FLVPTPYYPG FNRDLRWRSQ VQLLPISCKS CNNFKITIEA IEEAYEKGGQ

ACS4\_4222\_ID4 FLVPTPYYPG FNRDLRWRSQ VQLLPISCKS CNNFKITIEA IEEAYEKGGQ

ACS4\_4303\_ID5 FLVPTPYYPG FNRDLRWRSQ VQLLPISCKS CNNFKITIEA IEEAYEKGGQ

ACS4\_4691\_ID6 FLVPTPYYPG FNRDLRWRSQ VQLLPISCKS CNNFKITIEA IEEAYEKGGQ

ACS4\_5251\_ID7 FLVPTPYYPG FNRDLRWRSQ VQLLPISCKS CNNFKITIEA IEEAYEKGGQ

ACS4\_WT\_ID1 ANVKIKGLIL TNPCNPLGTI LDRDTLKKIS TFTNEHNIHL VCDEIYAATV 250

ACS4\_2477\_ID2 ANVKIKGLIL TNPCNPLGTI LDRDTLKKIS TFTNEHNIHL VCDEIYAATV

ACS4\_4043\_ID3 ANVKIKGLIL TNPCNPLGTI LDRDTLKKIS TFTNEHNIHL VCDEIYAATV

ACS4\_4222\_ID4 ANV\*

ACS4\_4303\_ID5 ANVKIKGLIL TNPCNPLGTI LDRDTLKKIS TFTNEHNIHL VCDEIYAATV

ACS4\_4691\_ID6 ANVKIKGLIL TNPCNPLGTI LDRDTLKKIS TFTNEHNIHL VCDEIYAATV

ACS4\_5251\_ID7 ANVKIKGLIL TNPCNPLGTI LDRDTLKKIS TFTNEHNIHL VCDEIYAATV

ACS4\_WT\_ID1 FNSPKFVSIA EIINEDNCIN KDLVHIVSSL SKDLGPPGFR VGIVYSFNDD 300

ACS4\_2477\_ID2 FNSPKFVSIA EIINEDNCIN KDLVHIVSNL SKDLGPPGFR VGIVYSFNDD

ACS4\_4043\_ID3 FNSPKFVSIA EIINEDNCIN KDLVHIVSSL SKDLGPPGFR VGIVYSFNDD

ACS4\_4222\_ID4

ACS4\_4303\_ID5 FNSPKFVSIA EIINEDNCIN KDLVHIVSSL SKDLGPPGFR VGIVYSFNDD

ACS4\_4691\_ID6 FNSPKFVSIA EIINEDNCIN KDLVHIVSSL SKDLGPPGFR VGIVYSFNDD

ACS4\_5251\_ID7 FNSPKFVSIA EIINEDNCIN KDLVHIVSSL SKDLGPPGFR VGIVYSFNDD

## Небольшой домен

ACS4\_WT\_ID1 VVNCARKMSS FGLVSTQTOH LLAFMLSDEE FVEEFLIESA KRLRERYEKF 350  
 ACS4\_2477\_ID2 VVNCARKMSS FGLVSTQTOH LLAFMLSDEE FVEEFLIESA KRLRERYEKF  
 ACS4\_4043\_ID3 VVNCARKMSS FGLVSTQTOH LLAFMLSDEE FVEEFLIESA KRLRERYEKF  
 ACS4\_4222\_ID4  
 ACS4\_4303\_ID5 VVNCARKMSS FGLVSTQTOH LLAFMLSDEE FVEEFLIESA KRLRERYEKF  
 ACS4\_4691\_ID6 VVNCARKMSS FGLVSTQTOH LLAFMLSDEE FVEEFLIESA KRLRERYEKF  
 ACS4\_5251\_ID7 VVNCARKMSS FGLVSIQTOH LLAFMLSDEE FVEEFLIESA KRLRERYEKF

ACS4\_WT\_ID1 TRGLEEIGIK CLESNAGVYC WMDLRSLLEK ATLDAEMSLW KLIINEVKLN 400  
 ACS4\_2477\_ID2 TRGLEEIGIK CLESNAGVYC WMDLRSLLEK ATLDAEMSLW KLIINEVKLN  
 ACS4\_4043\_ID3 TRGLEEIGIK CLESNAGVYC WMDLRSLLEK ATLDAEMSLW KLIINEVKLN  
 ACS4\_4222\_ID4  
 ACS4\_4303\_ID5 TRGLEEIGIK CLESNAGVYC WMDLRSLLEK ATLDAEMSLW KLIINEVKLN  
 ACS4\_4691\_ID6 TRGLEEIGIK CLESNAGVYC WMDLRSLLEK ATLDAEMSLW KLIINEVKLN  
 ACS4\_5251\_ID7 TRGLEEIGIK CLESNAGVYC WMDLRSLLEK ATLDAEMSLW KLIINEVKLN

ACS4\_WT\_ID1 VSPGSSFNCS EVGWFRVCF A NIDDQTMEIA LARIRMFMDA YNNVNKNGVM 450  
 ACS4\_2477\_ID2 VSPGSSFNCS EVGWFRVCF A NIDDQTMEIA LARIRMFMDA YNNVNKNGVM  
 ACS4\_4043\_ID3 VSPGSSFNCS EVGWFRVCF A NIDDQTMEIA LARIRMFMDA YNNVNKNGVM  
 ACS4\_4222\_ID4  
 ACS4\_4303\_ID5 VSPGSSFNCS EVGWFRVCF A NIDDQTMEIA LARIRMFMDA YNNVNKNGVM  
 ACS4\_4691\_ID6 VSPGSSFNCS EVGWFRVCF A NIDDQTMEIA LARIRMFMDA YNNVNKNGVM  
 ACS4\_5251\_ID7 VSPGSSFNCS EVGWFRVCF A NIDDQTMEIA LARIRMFMDA YNNVNKNGVM  
 ACS4\_WT\_ID1 KNKHNGRGT YDLTPQMGST MKMLLA  
 ACS4\_2477\_ID2 KNKHNGRGT YDLTPQMGST MKMLLA  
 ACS4\_4043\_ID3 KNKHNGRGT YDLTPQMGST MKMLLA  
 ACS4\_4222\_ID4  
 ACS4\_4303\_ID5 KNKHNGRGT YDLTPQMGST MKMLLA  
 ACS4\_4691\_ID6 KNKHNGRGT YDLTPQMGST MKMLLA  
 ACS4\_5251\_ID7 KNKHNGRGT YDLTPQMGST MKMLLA

Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2